

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 923**

51 Int. Cl.:

C07K 14/82 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2015 PCT/EP2015/059861**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15169804**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2015 E 15720986 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3140320**

54 Título: **Vacuna peptídica que comprende péptido ras mutante y agente quimioterapéutico**

30 Prioridad:

06.05.2014 EP 14167265

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

18.06.2019

73 Titular/es:

TARGOVAX ASA (100.0%)

Lilleakerveien 2 C

0283 Oslo, NO

72 Inventor/es:

ERIKSEN, JON AMUND y

GAUDERNACK, GUSTAV

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 716 923 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna peptídica que comprende péptido ras mutante y agente quimioterapéutico

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona al menos un péptido de la proteína RAS para su uso en el tratamiento del cáncer. La invención también se refiere a una preparación farmacéutica de al menos un péptido para dicho uso.

Antecedentes de la invención

10 Los antecedentes genéticos para la aparición del cáncer son alteraciones en los protooncogenes, oncogenes y genes supresores de tumores. Los protooncogenes son genes normales de la célula que tienen el potencial de convertirse en oncogenes. Todos los oncogenes codifican y funcionan a través de una proteína. En la mayoría de los casos, se ha demostrado que son componentes de las vías de transducción de señales. Los oncogenes surgen en la naturaleza de los protooncogenes a través de mutaciones puntuales o translocaciones, lo que da como resultado un estado transformado de la célula que alberga la mutación. El cáncer se desarrolla a través de un proceso de varias etapas que involucra varios eventos mutacionales en oncogenes y células supresoras de tumores.

15 En su forma más simple, una sustitución de una única base en un protooncogén puede causar que la proteína codificada difiera en un aminoácido.

20 En modelos experimentales que involucran tumores murinos, se ha demostrado que las mutaciones puntuales en las proteínas "propias" intracelulares pueden dar lugar a antígenos de rechazo de tumores que consisten en péptidos que difieren en un solo aminoácido del péptido normal. Los linfocitos T que reconocen estos péptidos en el contexto de las principales moléculas de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células tumorales son capaces de destruir las células tumorales y, por lo tanto, rechazar el tumor del hospedador. (Boon, T. y col, Cell 1989, Vol. 58, p.293-303).

25 En las últimas tres décadas, se ha dedicado un esfuerzo particular al análisis de anticuerpos contra antígenos tumorales humanos. Se ha sugerido que dichos anticuerpos podrían usarse con fines tanto diagnósticos como terapéuticos, por ejemplo, en relación con un agente anticanceroso. Un problema es que los anticuerpos solo pueden unirse a los antígenos tumorales que están expuestos en la superficie de las células tumorales. Por esta razón, los esfuerzos para producir un tratamiento contra el cáncer basado en el sistema inmunitario del cuerpo han sido menos exitosos de lo esperado.

30 Los anticuerpos típicamente reconocen los antígenos libres en la conformación nativa y potencialmente pueden reconocer casi cualquier sitio expuesto en la superficie del antígeno. En contraste con los anticuerpos producidos por las células B, los linfocitos T reconocen antígenos solo en el contexto de las moléculas del MHC, designadas HLA (antígeno leucocitario humano) en humanos, y solo después del procesamiento apropiado del antígeno, que generalmente consiste en la fragmentación proteolítica de la proteína, lo que da como resultado péptidos que encajan en el surco de las moléculas del MHC. Esto permite a los linfocitos T reconocer péptidos derivados de proteínas intracelulares. Los linfocitos T pueden, por lo tanto, reconocer péptidos aberrantes derivados de cualquier parte de la célula tumoral, cuando se muestran en la superficie de la célula tumoral por moléculas del MHC. El linfocito T puede activarse posteriormente para eliminar la célula tumoral que alberga el péptido aberrante.

40 Los linfocitos T pueden controlar el desarrollo y el crecimiento del cáncer mediante una variedad de mecanismos. Los linfocitos T citotóxicos, tanto CD8 + restringido por HLA de clase I, como CD4 + restringido por HLA de clase II, pueden destruir directamente las células tumorales que portan los antígenos tumorales apropiados. Los linfocitos T CD4 + auxiliares son necesarias para la inducción y el mantenimiento de las respuestas de los linfocitos T citotóxicos, así como para las respuestas de los anticuerpos, y para inducir la destrucción de macrófagos y de linfocitos citolíticos activados por linfoquinas (células LAK).

45 Se han identificado muchos oncogenes y sus productos proteicos. Además, se ha demostrado que el repertorio de linfocitos T de una persona sana incluye linfocitos T con especificidad contra un fragmento de péptido sintético derivado de un producto p21 del oncogén RAS, cuando se presenta en una molécula de HLA apropiada. Además, se anticipa que aproximadamente el 20% de todos los cánceres están asociados con una mutación en el oncogén RAS.

50 El documento WO 92/14756 desvela péptidos sintéticos y fragmentos de productos de proteína oncogénica que provocan inmunidad de células T, para su uso en vacunas contra cánceres asociados con RAS y composiciones para el tratamiento del cáncer. Los péptidos corresponden a un fragmento activo del oncogén presentado por la célula cancerosa e incluyen una mutación en una o más posiciones correspondientes a la mutación oncogénica. Este documento desvela mutaciones en las posiciones 12, 13 y 61 de la proteína RAS y desvela específicamente las mutaciones G12A, G12V, G12C, G12S, G12K, G12D, G12R, Q61R, Q61K, Q61L, Q61H, G13V y G13D. Si bien este documento menciona que las vacunas pueden comprender una selección de péptidos que tienen las mutaciones más comunes encontradas en las proteínas oncogénicas, no sugiere ninguna combinación específica de péptidos.

55 El documento WO 00/66153 analiza mezclas de péptidos sintéticos que provocan inmunidad de linfocitos T para su

- 5 uso en vacunas contra el cáncer. Las mezclas de péptidos consisten en péptidos mutantes RAS p21 y el presente documento desvela específicamente las mutaciones G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, Q61H, Q61K, Q61L, Q61R y G13D. Este documento también desvela que la respuesta inmunitaria provocada por un cóctel de péptidos era significativamente mayor que la provocada por un solo péptido. Sin embargo, no sugiere el uso de una vacuna peptídica en un tratamiento combinado del cáncer con ninguna otra forma de terapia.
- 10 Gjertsen y col. (Int. J. Cancer 2001, 92, p.441-450) desvela un ensayo de fase I/II que involucra a pacientes con adenocarcinoma del páncreas vacunados con péptidos RAS mutantes sintéticos en combinación con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. Este ensayo utilizó vacunas de un solo péptido o una mezcla de cuatro péptidos mutantes. La vacuna combinada consistió en las cuatro mutaciones *K-RAS* más comunes encontradas en el adenocarcinoma de páncreas, a saber, los péptidos que tienen una mutación G12V, una G12D, una G12C o una G12R. Este documento no sugiere que la terapia de combinación con agentes quimioterapéuticos antimetabolitos pueda ser eficaz.
- 15 Wedén y col. (Int. J. Cancer 2010, 128 (5), pág. 1120-1128) informa el seguimiento a largo plazo de pacientes con adenocarcinoma de páncreas vacunados con péptidos RAS mutantes sintéticos. La vacuna consistía en un solo péptido RAS o un cóctel de siete péptidos RAS. En particular, los siete péptidos RAS utilizados en este ensayo tenían una mutación G12A, una G12C, una G12D, una G12R, una G12S, una G12V o una G13D. No se menciona una terapia de combinación con agentes quimioterapéuticos antimetabolitos.
- 20 Prior y col. (Cancer Res. 2012, 72 (10), p. 2457-2467) desvela que diferentes tipos de cáncer están vinculados con la mutación de una isoforma de RAS particular y que cada isoforma tiene una firma distintiva de mutación en el codón. Además, Prior y col. desvela que se producen un total de 18 mutaciones en las posiciones 12, 13 y 61 de la proteína RAS, con seis mutaciones que se producen en cada posición. Esta revisión también analiza los efectos de estas mutaciones en la función de RAS y los mecanismos potenciales que conducen a patrones diferenciales de mutaciones isoformas de RAS.
- 25 Un tratamiento no relacionado previamente de pacientes con cáncer ha sido la administración sistémica del agente quimioterapéutico gemcitabina. La gemcitabina es actualmente un tratamiento quimioterapéutico frecuente para pacientes con varios tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga y cáncer de mama. En particular, la gemcitabina se usa frecuentemente para tratar el cáncer de páncreas avanzado.
- 30 La gemcitabina es un agente quimioterapéutico antimetabolito, específicamente un análogo de pirimidina. El análogo de trifosfato de gemcitabina reemplaza a la citidina durante la replicación del ADN y la incorporación a la cadena de ADN alargada detiene la síntesis de ADN adicional después de la adición de un nucleótido más, ya que la ADN polimerasa no puede continuar. Se cree que otros mecanismos de acción incluyen la inhibición de la ribonucleósido reductasa, lo que lleva a un agotamiento de los grupos de desoxiribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN, y la competencia con la desoxicitidina trifosfato como inhibidor de la ADN polimerasa. Estas acciones dan como resultado la necrosis, lo que lleva a una detención del crecimiento del tumor. Esta acción también significa que los agentes quimioterapéuticos antimetabolitos son tóxicos para otras células que se dividen activamente tales como las células T. El régimen preferido consiste en usar primero la quimioterapia, seguida de la vacunación para mejorar la inducción posterior de las respuestas inmunitarias de las células cancerosas inactivadas.
- 35
- 40 Si bien algunas combinaciones de fármacos, como FOLFIRINOX, han demostrado ser más eficaces que la gemcitabina en pacientes con adenocarcinoma de páncreas metastásico, la terapia con esta combinación se asoció con una alta incidencia de efectos secundarios (Conroy y col., N Engl J Med 2011, vol. 364(19), P. 1817-1825). Es deseable, por lo tanto, encontrar nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer.
- 45 Oettle y col. (JAMA 2007, 297 (3), pág. 267-277) informa sobre una investigación del uso de gemcitabina como quimioterapia adyuvante en el cáncer de páncreas resecable, y desvela que el efecto de la gemcitabina en la supervivencia sin enfermedad fue significativo en pacientes con resección R0 o R1. En particular, este estudio desvela que la gemcitabina postoperatoria retrasó significativamente el desarrollo de la enfermedad recurrente después de la resección completa del cáncer de páncreas, en comparación con los pacientes a quienes no se administró la gemcitabina después de la resección. Sin embargo, este estudio no sugiere que la gemcitabina pueda ser útil en combinación con otros tratamientos farmacéuticos contra el cáncer.
- 50 Bauer y col. (Cancer Immunol. Immunother. 2014, 63, p. 321-333), desvela que la gemcitabina tiene una influencia negativa en la proliferación de linfocitos T inducida por la vacuna de células dendríticas (CD). En particular, este estudio demostró que la administración diferida de gemcitabina, en comparación con la vacuna de CD, no mejoró la respuesta inmunitaria del paciente, mientras que la administración conjunta de gemcitabina y la vacuna de CD dañó significativamente la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna.
- 55 Strimpakos y col. (Journal of the Pancreas 2013, vol. 14, no. 4, p. 354-358) revisa un estudio de fase I de un tratamiento para el cáncer de páncreas, en el que se administró localmente ARNip contra k-RAS en combinación con la gemcitabina intravenosa semanalmente. Este documento también informa sobre un estudio de fase Ib de gemcitabina más PEGPH20 (hialuronidasa humana recombinante pegilada) en pacientes con cáncer de páncreas en

estadio IV sin tratamiento previo, y un ensayo en fase I de GBS-01 para cáncer de páncreas avanzado refractario a gemcitabina.

5 Golan y col. (Journal of Clinical Oncology 2013, vol. 31, no. 15) informa el mismo estudio de fase I que Strimpakos y col., en el que se administró ARNip anti-RAS G12D en dosis crecientes con la administración semanal de gemcitabina.

Rejíba y col. (Cancer Science 2007, vol. 98, no. 7, p. 1128-1136) informa sobre un estudio con ratones sobre el efecto de una combinación de ARNip G12D k-ras con gemcitabina sobre el crecimiento y la supervivencia del tumor.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar tratamientos contra el cáncer adicionales y más eficaces.

Sumario de la invención

10 La presente invención surge porque actualmente se ha encontrado sorprendentemente que la administración de una vacuna peptídica RAS en combinación con un agente quimioterapéutico antimetabolito (gemcitabina) mejoraba significativamente la respuesta inmunitaria de los pacientes en comparación con la administración de la vacuna peptídica RAS sola. Esto fue inesperado porque anteriormente se había creído que la administración de un agente quimioterapéutico antimetabolito, como la gemcitabina, a un paciente causa la muerte celular de células inmunitarias en proliferación, incluidos los linfocitos T en proliferación, lo que reduciría, de este modo, la actividad del sistema inmunitario del paciente y, por lo tanto, disminuiría la respuesta inmunitaria del paciente a una vacuna peptídica que se administra de forma simultánea o secuencial. Aunque sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que, de hecho, la muerte celular causada por el agente quimioterapéutico antimetabolito puede dar como resultado la liberación de moléculas de señalización que crean un entorno inmunogénico sistémico, promoviendo así las respuestas inmunitarias ya inducidas y promoviendo las respuestas inmunitarias inducidas adicionalmente. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria a la vacuna peptídica en realidad se ve potenciada, en lugar de reducida, por el agente quimioterapéutico antimetabolito.

25 En un primer aspecto de la invención, se proporciona al menos un péptido, adecuado para provocar una respuesta inmunitaria, en el que el o cada péptido corresponde a un fragmento de la proteína RAS pero tiene una a tres sustituciones de aminoácidos de la misma, para su uso en el tratamiento del cáncer mediante administración simultánea o secuencial con un análogo de pirimidina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el o cada péptido comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 o 13 de la proteína RAS, y en el que la sustitución del aminoácido se selecciona de una sustitución G13A, G13C, G13D, G13R, G13S, G13V, G12A, G12C, G12D, G12R, G12S o G12V.

30 Preferentemente, el al menos un péptido comprende dos o más péptidos, teniendo cada péptido una sustitución de aminoácido diferente.

Ventajosamente, el al menos un péptido comprende:

35 un péptido que tiene una sustitución G13D
 un péptido que tiene una sustitución G12A
 un péptido que tiene una sustitución G12C
 un péptido que tiene una sustitución G12D
 un péptido que tiene una sustitución G12R
 un péptido que tiene una sustitución G12S y
 un péptido que tiene una sustitución G12V.

40 Preferentemente, el al menos un péptido comprende un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 13, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 14, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 15, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 16, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 17, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 18 y un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 19.

Convenientemente, el al menos un péptido comprende:

50 un péptido que tiene una sustitución G13D
 un péptido que tiene una sustitución G13C
 un péptido que tiene una sustitución G12A
 un péptido que tiene una sustitución G12C
 un péptido que tiene una sustitución G12D
 un péptido que tiene una sustitución G12R
 un péptido que tiene una sustitución G12S y
 un péptido que tiene una sustitución G12V.

55 Preferentemente, el al menos un péptido comprende un péptido que consiste en la secuencia representada por la

- SEQ ID NO: 13, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 14, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 15, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 16, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 17, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 18, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 19 y un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 20.
- 5 Ventajosamente, el análogo de pirimidina es gemcitabina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- Convenientemente, el cáncer comprende células que expresan una proteína RAS mutada.
- Preferentemente, el cáncer es cáncer de páncreas.
- Convenientemente, el cáncer de páncreas es cáncer de páncreas resecaado.
- 10 Ventajosamente, el análogo de pirimidina o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra por primera vez al menos tres semanas después de la primera dosis de al menos un péptido.
- Convenientemente, el análogo de pirimidina o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra por primera vez 12 semanas o menos después de la resección quirúrgica del cáncer de páncreas. Preferentemente, el análogo de pirimidina o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra dentro de las 24 horas de al menos un péptido.
- 15 Ventajosamente, el análogo de pirimidina o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra después de que se haya administrado al menos un péptido.
- Convenientemente, el al menos un péptido se administra a una dosis de 0,01-10 mg, preferentemente 0,1-2 mg, y más preferentemente 0,7 mg por dosis.
- 20 Preferentemente, el agente quimioterapéutico antimetabolito se administra a una dosis de 100-10.000 mg/m², preferentemente 500-2000 mg/m², y más preferentemente 1000 mg/m².
- Ventajosamente, el al menos un péptido y el análogo de pirimidina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran simultánea o secuencialmente en al menos dos ocasiones, en los que cada ocasión de administración se separa al menos por una semana, y más preferentemente al menos por 2 semanas.
- 25 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona al menos un linfocito T específico para el al menos un péptido de acuerdo con el primer aspecto descrito anteriormente, o una preparación de linfocitos T que comprende linfocitos T específicos para el al menos un péptido de acuerdo con el primer aspecto descrito anteriormente cuando se presenta en una molécula de MHC, para su uso en el tratamiento del cáncer por administración simultánea o secuencial con un análogo de pirimidina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 En un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido de acuerdo con el primer aspecto anterior, o al menos un linfocito T o preparación de linfocitos T de acuerdo con el segundo aspecto anterior, para su uso en el tratamiento del cáncer mediante administración combinada o secuencial con un análogo de pirimidina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 35 En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un análogo de pirimidina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer mediante administración simultánea o secuencial con al menos un péptido adecuado para provocar una respuesta inmunitaria, en el que el o cada péptido corresponde a un fragmento de una proteína RAS de tipo silvestre pero tiene una sustitución de aminoácido de la misma, en el que el o cada péptido comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 o 13 de la proteína RAS, y en el que la sustitución de aminoácido del o cada péptido se encuentra en dicha posición 12 o 13, respectivamente, y se selecciona de una sustitución G13A, G13C, G13D, G13R, G13S, G13V, G12A, G12C, G12D, G12R, G12S o G12V.
- 40 En el presente documento se desvela un kit que comprende un primer producto que comprende al menos un péptido, un linfocito T o una composición farmacéutica según el primer, segundo o tercer aspecto descritos anteriormente, respectivamente, y un segundo producto que comprende un suministro de un agente quimioterapéutico antimetabolito.
- 45 En el presente documento también se desvela un procedimiento de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesite al menos un péptido, un linfocito T o una composición farmacéutica, como se describe en el primer, segundo o tercer aspecto anterior, respectivamente y un agente quimioterapéutico antimetabolito.
- 50 El término "péptido" como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero de restos de aminoácidos que es (o tiene una secuencia que corresponde a) un fragmento de una proteína más larga. El término también se aplica a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un resto modificado, o un resto de origen no natural, tal como un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así

como a polímeros de aminoácidos de origen natural.

El porcentaje de "identidad" entre dos secuencias se puede determinar utilizando el algoritmo BLASTP versión 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402) utilizando parámetros predeterminados. En particular, Se puede acceder al algoritmo BLAST en Internet usando la URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

La expresión "respuesta inmunitaria", como se usa en el presente documento, se refiere en algunas realizaciones a una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T tras la presentación de un péptido por moléculas de histocompatibilidad (MHC) principales en la superficie de las células, y en particular se refiere a la activación de linfocitos T tras la presentación del péptido.

La expresión "proteína RAS", como se usa en el presente documento, se refiere a la clase de pequeñas proteínas GTPasa codificadas por el protooncogén ras e incluye las tres isoformas de la proteína RAS: HRAS, KRAS y NRAS. En algunas realizaciones, la expresión "proteína RAS" se refiere a la proteína correspondiente al número de referencia P01112.1 de UniProtKB/Swiss-Prot y como se muestra en la SEQ ID NO: 23.

La expresión "posición 13 de la proteína RAS", como se usa en el presente documento, se refiere al decimotercer aminoácido en la cadena de aminoácidos que forma la estructura primaria de la proteína RAS de tipo silvestre, contando desde el extremo N.

La expresión "posición 12 de la proteína RAS", como se usa en el presente documento, se refiere al decimosegundo aminoácido en la cadena de aminoácidos que forma la estructura primaria de la proteína RAS de tipo silvestre, contando desde el extremo N.

La expresión "el aminoácido correspondiente a la posición 13", como se usa en el presente documento, significa un aminoácido en un péptido de una proteína RAS ubicado en la cadena de aminoácidos del péptido en una posición correspondiente al decimotercer aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la proteína RAS, contando desde el extremo N. Un significado correspondiente se atribuye a la expresión "el aminoácido correspondiente a la posición 12".

La expresión "mutaciones de la proteína RAS", como se usa en el presente documento, se refiere a una o más mutaciones puntuales presentes en las proteínas RAS presentes en una muestra tomada de un sujeto.

La expresión "mutación puntual", como se usa en el presente documento, se refiere a la sustitución de un único resto de aminoácido en la cadena de polipéptido de un producto proteico con un resto de aminoácido diferente.

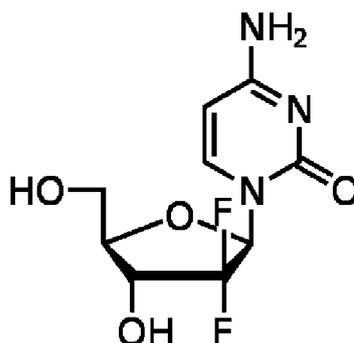
El término "de una a tres mutaciones puntuales", como se usa en el presente documento, significa una mutación puntual o dos mutaciones puntuales o tres mutaciones puntuales.

La expresión, por ejemplo, "una mutación G12V", como se usa en el presente documento, se refiere a una mutación puntual que ha dado como resultado que la glicina (G) en la posición 12 de la proteína RAS de tipo silvestre se reemplace con valina (V). Se aplican definiciones similares a términos similares, tales como G13C, G13R, etc.

La expresión "composición farmacéutica", como se usa en el presente documento, significa una preparación farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto humano o animal previsto para fines terapéuticos.

La expresión "agente quimioterapéutico antimetabolito", como se usa en el presente documento, significa un producto que tiene el efecto de inhibir el crecimiento celular o la división celular de un paciente y se usa como tratamiento terapéutico del cáncer.

El término "gemcitabina", como se usa en el presente documento, significa el compuesto que tiene el nombre IUPAC 4-amino-1- (2-desoxi-2,2-difluoro-β-D-*eritro*-pentofuranosil) pirimidin-2 (1*H*) -on, que tiene la siguiente fórmula estructural:



La expresión "una sal farmacéuticamente aceptable del mismo", como se usa en el presente documento, significa una sal formada permitiendo que el compuesto de forma libre reaccione con un ácido o base. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácido hidrohalegenado tales como hidrurofluoruros, clorhidratos, bromhidratos y yodhidratos; sales de ácidos inorgánicos, tales como clorhidratos, nitratos, percloratos, sulfatos y fosfatos; sales del ácido alcanosulfónico inferior tales como metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos y etanosulfonatos; sales del ácido aril sulfónico, tales como bencenosulfonatos y p-toluenosulfonatos; sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, malatos, fumaratos, succinatos, citratos, ascorbatos, tartratos, oxalatos y maleatos; sales de metales alcalinos, tales como sales sódicas, sales potásicas y sales de litio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sales cálcicas y sales de magnesio; sales metálicas tales como sales de aluminio y sales de hierro; sales inorgánicas, tales como sales de amonio; sales de aminas incluyendo sales orgánicas tales como sales de t-octilamina, sales de dibencilamina, sales de morfolina, sales de glucosamina, sales de alquil ésteres de fenilglicina, sales de etilendiamina, sales de N-metilglucamina, sales de guanidina, sales de dietilamina, sales de trietilamina, sales de dicitohexilamina, sales de N,N'-dibenciletilendiamina, sales de cloroprocaína, sales de procaína, sales de dietanolamina, sales de N-bencilfenetilamina, sales de piperazina, sales de tetrametilamonio y sales de tris(hidroximetil)aminometano; y sales de aminoácidos, tales como sales de glicina, sales de lisina, sales de arginina, sales de ornitina, glutamatos y aspartatos.

La expresión "administración secuencial", como se usa en el presente documento, significa la administración de dos productos a un paciente en el que los dos productos no se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, cada ocasión de administración secuencial significa que cada uno de los dos productos se administra con menos de 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día de diferencia.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 es una tabla que muestra el momento en el que se registró una respuesta DTH positiva en cada paciente. ¹DTH no evaluado; ²NT: Sin tratamiento.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto adyuvante sinérgico después del inicio de la gemcitabina en las respuestas DTH, durante la inducción de una respuesta inmunitaria.

Breve Descripción de los Listados de Secuencias

La SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G13C.
 La SEQ ID NO: 2 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G13R.
 La SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G13D.
 La SEQ ID NO: 4 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G13V.
 La SEQ ID NO: 5 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G13A.
 La SEQ ID NO: 6 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G13S.
 La SEQ ID NO: 7 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G12A.
 La SEQ ID NO: 8 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G12C.
 La SEQ ID NO: 9 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G12D.
 La SEQ ID NO: 10 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G12R.
 La SEQ ID NO: 11 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G12S.
 La SEQ ID NO: 12 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS que tiene una mutación G12V.
 La SEQ ID NO: 13 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS de TG01 y TG02 que tiene una mutación G13D.
 La SEQ ID NO: 14 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS de TG01 y TG02 que tiene una mutación G12A.
 La SEQ ID NO: 15 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS de TG01 y TG02 que tiene una mutación G12C.
 La SEQ ID NO: 16 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS de TG01 y TG02 que tiene una mutación G12D.
 La SEQ ID NO: 17 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS de TG01 y TG02 que tiene una mutación G12R.
 La SEQ ID NO: 18 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS de TG01 y TG02 que tiene una mutación G12S.
 La SEQ ID NO: 19 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS de TG01 y TG02 que tiene una mutación G12V.
 La SEQ ID NO: 20 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido RAS de TG02 que tiene una mutación G13C.
 La SEQ ID NO: 21 muestra una secuencia de aminoácidos alternativa del péptido RAS que tiene una mutación G13R.
 La SEQ ID NO: 22 muestra una secuencia de aminoácidos alternativa del péptido RAS que tiene una mutación G13V.
 La SEQ ID NO: 23 muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína RAS de tipo silvestre.

Descripción detallada de la Invención

- 5 La invención se refiere, en términos generales, a al menos un péptido de la proteína RAS para su uso en el tratamiento del cáncer mediante administración simultánea o secuencial con un análogo de pirimidina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Cada péptido de al menos un péptido puede tener de una a tres mutaciones puntuales de la proteína RAS.
- El o cada péptido para su uso de acuerdo con la invención puede ser un péptido correspondiente a cualquiera de HRAS, KRAS o NRAS. Las tres isoformas de RAS comparten la identidad de secuencia en todas las regiones responsables de la unión a GDP/GTP, es decir, las regiones sujetas a mutación en cáncer.
- 10 Al menos una de dichas una a tres mutaciones puntuales puede ser una mutación puntual que corresponde a una mutación codificada por un oncogén RAS, por ejemplo, en las posiciones 12, 13 o 61 de la proteína RAS.
- El o cada péptido puede comprender al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 20, al menos 24 o al menos 30 aminoácidos. En realizaciones preferidas, el o cada uno de el al menos un péptido comprende al menos 8 aminoácidos. En algunas ocasiones, el o cada uno de el al menos un péptido comprende al menos 17 aminoácidos.
- 15 El o cada péptido para su uso de acuerdo con la invención comprende una región de al menos 8 restos de aminoácidos que incluye la posición 12 o 13 de la proteína RAS, y la mutación puntual del o cada péptido está en el resto de aminoácido en dicha posición 12 o 13.
- El o cada péptido puede tener al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 37 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones distintas a la región que incluye la posición 13 con la proteína RAS. El o cada péptido puede tener al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye la posición 13 a una de las SEQ ID NO: 1-6. En algunas ocasiones, el o cada péptido puede tener al menos un 95% de identidad de secuencia en posiciones distintas a la región que incluye la posición 13 a una de las SEQ ID NO: 1-6. En otras ocasiones, el o cada péptido puede tener al menos un 100 % de identidad de secuencia en posiciones distintas a la región que incluye la posición 13 con una de las SEQ ID NO: 1-6.
- 20 25
- El al menos un péptido puede comprender un primer péptido que tiene un porcentaje de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye la posición 13 con una de las SEQ ID NO: 1-6 y un segundo péptido tiene un porcentaje diferente de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye la posición 13 con una secuencia diferente a las SEQ ID NO: 1-6. Como alternativa, un primer péptido puede tener un porcentaje de identidad de secuencia en posiciones distintas a la región que incluye la posición 13 con una de las SEQ ID NO: 1-6 y un segundo péptido puede tener el mismo porcentaje de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye la posición 13 con una secuencia diferente de las SEQ ID NO: 1-6. En todas las ocasiones, el o cada péptido es capaz de provocar una respuesta inmunitaria.
- 30 35
- Cada uno de los péptidos primero y segundo de el al menos un péptido descrito anteriormente puede tener una mutación puntual en la posición 13 de la proteína RAS, en el que la mutación puntual en el primer péptido es diferente de la mutación puntual en el segundo péptido. La proteína RAS de tipo silvestre comprende glicina (G) en la posición 13. Por lo tanto, la mutación en la posición 13 puede ser una mutación puntual de la glicina a cualquier otro aminoácido. Sin embargo, se ha encontrado que las mutaciones las mutaciones G13A, G13C, G13D, G13R, G13S y G13V están particularmente asociadas con el cáncer. Por lo tanto, la mutación puntual del o cada péptido puede ser independientemente una de una G13A, G13C, G13D, G13R, G13S o una G13V. En otras ocasiones, la mutación puntual en la posición 13 de uno de los péptidos primero y segundo puede ser independientemente una mutación G13C o una G13D. En otras ocasiones, la mutación puntual en la posición 13 de uno de los péptidos primero y segundo puede ser una mutación G13C. En otras ocasiones, la mutación puntual en la posición 13 de uno de los péptidos primero y segundo puede ser una mutación G13D.
- 40 45
- La mutación puntual en la posición 13 del primer o segundo péptido puede ser una mutación G13C y la mutación puntual en la posición 13 del otro péptido puede ser una mutación G13D.
- Como alternativa, la mutación puntual en la posición 13 del primer o segundo péptido puede ser una mutación G13R y la mutación puntual en la posición 13 del otro péptido puede ser una mutación G13V.
- 50
- En algunas realizaciones, hay dos o más péptidos de la proteína RAS, que tienen de una a tres mutaciones puntuales de la misma, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer mediante administración simultánea o secuencial con un agente quimioterapéutico antimetabolito. Cada uno de los péptidos segundo o más puede comprender independientemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 20, al menos 24 o al menos 30 aminoácidos. En algunas ocasiones, cada uno de los péptidos comprende al menos 8 aminoácidos. En otras ocasiones, cada uno de los péptidos comprende al menos 17 aminoácidos. En ocasiones adicionales, cada uno de los péptidos comprende al menos 18 aminoácidos. En general,
- 55

cada péptido en la mezcla de péptidos puede comprender un número diferente de aminoácidos a uno o más de los otros péptidos. Cada uno de los péptidos tiene al menos una mutación puntual que es diferente de la mutación puntual del(de los) otro(s) péptido(s).

5 El al menos un péptido puede comprender al menos un tercer péptido de la proteína RAS que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS. El al menos tercer péptido puede tener una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 13 de la proteína RAS que es diferente a las mutaciones en la posición 13 de los péptidos primero y segundo. La mutación puntual puede ser una de una G13A, G13C, G13D, G13R, G13S o una G13V, independientemente de las mutaciones puntuales de los péptidos primero y segundo.

10 El al menos un péptido puede comprender adicionalmente al menos un péptido adicional de la proteína RAS que comprende una región de al menos 8 aminoácidos. Dicha región del al menos un péptido adicional puede incluir la posición 12 de la proteína RAS.

15 Cuando el al menos un péptido comprende al menos un tercer péptido, cada uno de los péptidos puede comprender independientemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 20, al menos 24 o al menos 30 aminoácidos. En algunas ocasiones, cada uno de los péptidos comprende al menos 8 aminoácidos. En otras ocasiones, cada uno de los péptidos comprende al menos 17 aminoácidos. En ocasiones adicionales, cada uno de los péptidos comprende al menos 18 aminoácidos. En general, cada péptido del al menos un péptido puede comprender un número diferente de aminoácidos a uno o más de los otros péptidos del al menos péptido.

20 Cuando el al menos un péptido comprende al menos un péptido que comprende una región que incluye la posición 12 de la proteína RAS, el aminoácido correspondiente a la posición 12 de la proteína RAS tiene una mutación puntual. En la proteína RAS de tipo salvaje, el aminoácido de la posición 12 es glicina (G). Por lo tanto, la mutación puntual en la posición 12 puede ser un aminoácido distinto de la glicina. Cada mutación puede ser, independientemente, una mutación G12A, G12C, G12D, G12R, G12S o una G12V. El al menos un péptido adicional puede tener al menos un 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones distintas a la región que incluye la posición 12 con la proteína RAS. El al menos un péptido puede tener al menos un 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye la posición 12 con una de las SEQ ID NO: 7-12. En algunas ocasiones, puede haber más de un péptido de la proteína RAS que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 de la proteína RAS y que tiene una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 12 de la proteína RAS. En tales ocasiones, cada uno de los péptidos que tienen una mutación en la posición 12 puede tener una mutación puntual diferente.

35 El al menos un péptido puede comprender al menos dos péptidos de la proteína RAS, comprendiendo cada uno una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 de la proteína RAS. La mutación puntual en la posición 12 puede ser una de una mutación G12A, G12C, G12D, G12R, G12S o una G12V. Los al menos dos péptidos que incluyen la posición 12 de la proteína RAS pueden tener al menos el 20%, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones distintas a la región que incluye la posición 12 con la proteína RAS. En algunas ocasiones, los al menos dos péptidos que comprenden una región de al menos 8 aminoácidos que incluyen la posición 12, pueden tener al menos el 20%, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye la posición 12 con una de las SEQ ID NO: 7-12 y 14-19. Se puede contemplar cualquier combinación de las mutaciones mencionadas anteriormente y las SEQ ID NO en el al menos un péptido para su uso de acuerdo con las presentes divulgaciones.

50 En algunas realizaciones, el al menos un péptido consiste en un péptido que tiene una mutación G13D, un péptido que tiene una mutación G12A, un péptido que tiene una mutación G12C, un péptido que tiene una mutación G12D, un péptido que tiene una mutación G12R, un péptido que tiene una mutación G12S y un péptido que tiene una mutación G12V. El o cada al menos un péptido puede tener independientemente al menos un 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye las posiciones 12 o 13 respectivamente con las SEQ ID NO: 3, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. La mezcla de péptidos puede consistir en péptidos que tienen independientemente al menos el 20%, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye las posiciones 12 o 13 respectivamente con las SEQ ID NO: 13-19. Esta realización de la invención se denomina en el presente documento TG01 cuando hay un 100% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 13-19. La Tabla 3 muestra los péptidos que están preferentemente presentes en TG01.

En algunas realizaciones, el al menos un péptido consiste en un péptido que tiene una mutación G13C, un péptido que tiene una mutación G13D, un péptido que tiene una mutación G12A, un péptido que tiene una mutación G12C, un péptido que tiene una mutación G12D, un péptido que tiene una mutación G12R, un péptido que tiene una mutación G12S, y un péptido que tiene una mutación G12V. El o cada al menos un péptido puede tener independientemente al menos el 20%, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye las posiciones 12 o 13 respectivamente con las SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. La mezcla de péptidos puede consistir en péptidos que tienen independientemente al menos el 20%, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye las posiciones 12 o 13 respectivamente con las SEQ ID NO: 13-20. Esta realización de la invención se denomina en el presente documento TG02 cuando hay un 100% de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 13-20. La Tabla 4 muestra los péptidos que están preferentemente presentes en TG02.

En general, el o cada uno de el al menos un péptido para su uso, dentro de una región de 8 aminoácidos que incluye la posición 12 o 13, puede tener al menos 6 restos de aminoácidos, distintos del resto en la posición 12 o 13, respectivamente, que son idénticos a la región correspondiente de la proteína RAS. Además, en general, el o cada uno de el al menos un péptido para su uso, en posiciones distintas a la región que incluye la posición 12 o 13 de la proteína RAS puede tener al menos el 20%, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de una de las SEQ ID NO: 1-20, respectivamente.

El al menos un péptido puede consistir en un primer, segundo, tercer o cuarto péptido. Los péptidos primero y segundo pueden tener cada uno una mutación puntual en la posición 13 de la proteína RAS, en el que la mutación puntual en el primer péptido es diferente de la mutación puntual en el segundo péptido. La mutación puntual de cada uno de los péptidos primero y segundo puede ser independientemente una de una mutación G13A, G13C, G13D, G13R, G13S o una G13V. Cada uno de los péptidos tercero y cuarto puede comprender una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS, y cada uno de los péptidos tercero y cuarto puede tener independientemente al menos el 20%, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones distintas a la región que incluye la posición 13 con la proteína RAS. Cada uno de los péptidos tercero y cuarto puede tener independientemente al menos un 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye la posición 13 con una de las SEQ ID NO: 1, -6, 20, 13, 21 o 22. Cada uno de los péptidos tercero y cuarto puede tener una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 13 del péptido RAS, y cada uno de los péptidos primero, segundo, tercero y cuarto pueden tener una mutación puntual que es diferente de las mutaciones puntuales de los otros péptidos. En una ocasión, el primer péptido puede ser un péptido que tiene una mutación G13R, el segundo péptido puede ser un péptido que tiene una mutación G13A, el tercer péptido puede ser un péptido que tiene una mutación G13S y el cuarto péptido puede ser un péptido que tiene una mutación G13V.

El al menos un péptido puede consistir en un máximo de 8 péptidos diferentes. Como alternativa, puede haber un máximo de 10, 12, 14 o 16 péptidos diferentes. En ocasiones que comprenden más de un péptido, el al menos un péptido puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o 6 péptidos que comprenden una región de al menos 8 restos de aminoácidos que incluye la posición 12 de la proteína RAS. En otras ocasiones que comprenden más de un péptido, el al menos un péptido puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o 6 péptidos que comprenden una región de al menos 8 restos de aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS. En ocasiones adicionales, el al menos un péptido puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o 6 péptidos independientemente que comprenden una región de al menos 8 restos de aminoácidos que incluye la posición 12 o 13 de la proteína RAS.

El o cada péptido que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 del péptido RAS puede comprender las posiciones 1 a 30 de la proteína RAS. Como alternativa, el o cada péptido que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS puede comprender las posiciones 5 a 21 de la proteína RAS. En algunas ocasiones, el aminoácido correspondiente a la posición 13 de la proteína RAS puede estar en el extremo C de cada péptido, o el aminoácido correspondiente a la posición 13 de la proteína RAS puede estar en el extremo N del o de cada péptido. En general, la región que tiene al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS, puede consistir en cualquiera de las 8 posiciones de la proteína RAS incluyendo la posición 13. Por ejemplo, la región que tiene al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13, puede consistir en los aminoácidos de la posición 6 a la posición 13, posición 7 a la posición 14, posición 8 a la posición 15, posición 9 a la posición 16, posición 10 a la posición 17, posición 11 a la posición 18, posición 12 a la posición 19 o la posición 13 a la posición 20 de la proteína RAS.

Los péptidos que comprenden una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 del péptido RAS pueden comprender las posiciones 1 a 30 de la proteína RAS. Como alternativa, los péptidos que comprenden una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 de la proteína RAS puede comprender las posiciones 5

a 21 de la proteína RAS. El aminoácido correspondiente a la posición 12 de la proteína RAS puede estar en el extremo C del péptido, o el aminoácido correspondiente a la posición 12 de la proteína RAS puede estar en el extremo N del péptido. En general, la región que tiene al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 de la proteína RAS, puede consistir en cualquiera de las 8 posiciones de la proteína RAS incluyendo la posición 12. Por ejemplo, la región que tiene al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12, puede consistir en los aminoácidos de la posición 5 a la posición 12, posición 6 a la posición 13, posición 7 a la posición 14, posición 8 a la posición 15, posición 9 a la posición 16, posición 10 a la posición 17, posición 11 a la posición 18 o la posición 12 a la posición 19 de la proteína RAS.

Cuando hay más de un péptido, el más de un péptido puede comprender diferentes péptidos en proporciones iguales o diferentes. Por ejemplo, cuando hay un primer y un segundo péptido, los péptidos primero y el segundo se pueden usar en proporciones iguales, es decir, cada péptido comprende el 50% de los péptidos utilizados. Como alternativa, puede haber una mayor proporción del primer péptido que del segundo péptido. Por ejemplo, el primer péptido puede comprender al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80% o al menos el 90 % de los péptidos utilizados. En otras ocasiones, se puede usar una mayor proporción del segundo péptido que del primer péptido. Por ejemplo, el segundo péptido puede comprender al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80% o al menos el 90 % de los péptidos utilizados. Cuando se usan más de dos péptidos, los péptidos pueden usarse en proporciones iguales o diferentes entre sí. Por ejemplo, cada uno de los péptidos puede comprender independientemente al menos el 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, en al menos el 20 % o en al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80% o al menos el 90 % de los péptidos utilizados.

En el presente documento se desvela al menos un péptido que comprende al menos cinco péptidos de la proteína RAS en el que cada uno de los cinco péptidos comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS. Cada uno de los cinco péptidos puede tener independientemente al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones distintas a la región que incluye la posición 13 con la proteína RAS y/o independientemente tiene al menos el 20%, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye la posición 13 con una de las SEQ ID NO: 1, -6, 13, 20, 21 y 22. Cada uno de los al menos cinco péptidos puede tener una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 13 de la proteína RAS, independientemente seleccionada de una mutación G13A, G13C, G13D, G13R, G13S o G13V, y la mutación puntual de cada péptido puede ser diferente de la mutación puntual de los otros péptidos.

En el presente documento, también se desvela al menos un péptido adecuado para provocar una respuesta inmunitaria que consiste en seis péptidos de la proteína RAS en el que cada péptido comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 de la proteína RAS. Cada uno de los péptidos puede tener independientemente al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones distintas a la región que incluye la posición 12 con la proteína RAS y/o puede tener independientemente al menos el 20%, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye la posición 12 con una de las SEQ ID NO: 7-12 y 14-19. Cada uno de los péptidos puede tener una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 12 de la proteína RAS, que se selecciona de una mutación G12A, G12C, G12D, G12R, G12S o una G12V, y la mutación puntual de cada péptido puede ser diferente de la mutación puntual de los otros péptidos.

En el presente documento se desvela al menos un péptido adecuado para provocar una respuesta inmunitaria que consiste en un primer, segundo, tercer y cuarto péptido de la proteína RAS en el que cada uno de los péptidos primero, segundo y tercero comprende una región de al menos 8 aminoácidos, que incluye la posición 12 de la proteína RAS, y el cuarto péptido de la proteína RAS comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS. Cada uno de los péptidos primero, segundo, tercero y cuarto puede tener independientemente al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones distintas a la región que incluye la posición 12 o 13 respectivamente con la proteína RAS y/o puede tener independientemente al menos el 20%, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 66 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 %, al menos el 99% o el 100% de identidad de secuencia en posiciones diferentes a la región que incluye la posición 12 o 13 respectivamente con las SEQ ID NO: 7-12, 14-19, 1-6, 13, 20, 21 y 22 respectivamente. Cada uno de los péptidos primero, segundo, tercero y cuarto puede tener una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a dicha posición 12 o 13 de la proteína RAS, respectivamente. En algunas ocasiones, el primer péptido puede ser un péptido que tiene una mutación G12A, el segundo péptido puede ser en un péptido que tiene una mutación G12R, el tercer péptido puede ser un péptido que tiene una mutación G12S y el cuarto péptido puede ser un péptido que tiene una mutación G13C.

El al menos un péptido usado de acuerdo con la presente invención es un péptido que corresponde a los fragmentos de proteína RAS mostrados por las moléculas del MHC II en la superficie de las células. Por lo tanto, el al menos un péptido usado de acuerdo con la presente invención es un péptido que corresponde a los fragmentos de proteínas que resultan de la degradación proteolítica intracelular de las proteínas RAS, que a continuación pueden mostrarse en las moléculas HLA, y en las cuales los individuos generalmente tienen un linfocito T reactivo en su repertorio de linfocitos T.

En el presente documento se desvela al menos un linfocito T o una preparación de linfocitos T que comprende linfocitos T, específicos para al menos un péptido como se describe anteriormente, cuando se presenta en una molécula del MHC, para su uso en el tratamiento del cáncer por administración simultánea o secuencial con un agente quimioterapéutico antimetabolito. El al menos un linfocito T puede producirse estimulando al menos un linfocito T reactivo con al menos un péptido de la proteína RAS. Por ejemplo, el al menos un linfocito T puede comprender una pluralidad de linfocitos T en donde un primer y un segundo linfocito T son específicos para un primer y un segundo péptido, respectivamente, correspondientes a un fragmento de la proteína RAS, en el que cada péptido comprende un región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS, en el que cada uno de los linfocitos T primero y segundo es específico para una mutación puntual en el aminoácido del péptido correspondiente a dicha posición 13 y la mutación puntual para la cual es específico el primer linfocito T es diferente de la mutación puntual para la cual es específico el segundo linfocito T. El al menos un linfocito T puede comprender una pluralidad de linfocitos T específicos para un péptido correspondiente a un fragmento de la proteína RAS, en el que el péptido comprende un región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS, en el que cada linfocito T es específico para una mutación puntual en el aminoácido del péptido correspondiente a dicha posición 13.

El al menos un péptido, al menos un linfocito T o una de las preparaciones de linfocitos T descritos anteriormente pueden ser para su uso en el tratamiento del cáncer y pueden administrarse simultánea o secuencialmente con un agente quimioterapéutico antimetabolito. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico antimetabolito es un análogo de pirimidina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En realizaciones preferidas, el agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Una sal farmacéuticamente aceptable de gemcitabina puede ser clorhidrato de gemcitabina.

El al menos un péptido, al menos un linfocito T o una preparación de linfocitos T para su uso de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer que surge debido a una mutación en la proteína RAS, en particular una mutación que corresponde a la mutación puntual en el péptido o péptidos que se administran. El cáncer puede ser uno o más de cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de ovarios y cáncer de mama. En realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de páncreas. El cáncer puede ser cáncer de páncreas resecaado. El al menos un péptido puede comprender un péptido que tiene una mutación puntual G13C, el al menos un linfocito T puede ser específico para un péptido que tiene una mutación G13C o la preparación de linfocitos T puede comprender linfocitos T específicos para un péptido que tiene una mutación G13C, y puede ser para su uso en el tratamiento del cáncer por administración simultánea o secuencial con un agente quimioterapéutico antimetabolito. En tales ocasiones, el cáncer puede ser cáncer de páncreas. Como alternativa, el al menos un péptido puede comprender un péptido que tiene una mutación G13D, el al menos un linfocito T puede ser específico para un péptido que tiene una mutación G13D o la preparación de linfocitos T puede comprender linfocitos T específicos para un péptido que tiene una mutación G13D, y puede ser para su uso en el tratamiento del cáncer por administración simultánea o secuencial con un agente quimioterapéutico antimetabolito. En particular, se ha encontrado que el tratamiento del cáncer mediante la administración simultánea o secuencial de al menos un péptido mejora significativamente la respuesta inmunitaria a al menos un péptido después del siguiente régimen de dosificación en comparación con la administración de una vacuna peptídica sola: semana 1: péptido solamente; semana 2 - péptido solamente; semana 3 - péptido solamente; semana 4 - péptido y agente quimioterapéutico antimetabolito; semana 5 - agente quimioterapéutico antimetabolito solamente; semana 6 - péptido y agente quimioterapéutico antimetabolito; semana 7 - sin tratamiento; y semana 8 - péptido y agente quimioterapéutico antimetabolito.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el al menos un péptido, al menos un linfocito T o una preparación de linfocitos T descritos anteriormente también se proporcionan para su uso de acuerdo con la presente invención y las presentes divulgaciones. Dichas composiciones farmacéuticas también pueden comprender al menos un transportador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además uno o más principios activos y/o adyuvantes adicionales. La composición farmacéutica puede comprender además uno o más ingredientes terapéuticamente eficaces para la misma indicación de enfermedad. La composición farmacéutica también puede comprender el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

El agente quimioterapéutico antimetabolito puede administrarse simultáneamente con al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica. Por lo tanto, el agente quimioterapéutico antimetabolito se puede administrar al mismo tiempo que al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica.

El agente quimioterapéutico antimetabolito puede administrarse secuencialmente con al menos un péptido, al menos

un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica. El al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica pueden administrarse, y pueden ir seguidos de la administración del agente quimioterapéutico antimetabolito. En cada ocasión de administración secuencial, el agente quimioterapéutico antimetabolito puede administrarse dentro de las 6 horas de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica, o en cada ocasión de administración secuencial el agente quimioterapéutico antimetabolito puede administrarse dentro de las 12 horas de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica, o en cada ocasión de administración secuencial, el agente quimioterapéutico antimetabolito puede administrarse dentro de las 18 horas de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica, o en cada ocasión de administración secuencial, el agente quimioterapéutico antimetabolito puede administrarse dentro de las 24 horas de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica, o en cada ocasión de administración secuencial el agente quimioterapéutico antimetabolito puede administrarse dentro de las 24 horas inmediatamente después de la administración de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica.

El al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica y el agente quimioterapéutico antimetabolito se pueden administrar de simultánea o secuencialmente más de una vez al mismo paciente. Por ejemplo, el al menos un péptido y el agente quimioterapéutico antimetabolito pueden administrarse al menos dos veces (es decir, al menos en dos ocasiones), o el al menos un péptido y el agente quimioterapéutico antimetabolito pueden administrarse al menos tres veces (es decir, al menos en tres ocasiones). El al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica y el agente quimioterapéutico antimetabolito pueden administrarse más de tres veces (es decir, en más de tres ocasiones). En algunas ocasiones, en cada ocasión de administración de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica y el agente quimioterapéutico antimetabolito puede estar separado por al menos una semana. Como alternativa, cada ocasión de administración de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica y el agente quimioterapéutico antimetabolito pueden separarse al menos dos semanas. En algunas ocasiones, cada ocasión de administración puede estar separada por más de dos semanas.

El agente quimioterapéutico antimetabolito se puede administrar solo, una o más veces, antes o después de la administración simultánea o secuencial con al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica de la invención. Como alternativa, el al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica se puede administrar sola, una o más veces, antes o después de la administración simultánea o secuencial con el agente quimioterapéutico antimetabolito.

Por lo tanto, la primera administración del agente quimioterapéutico antimetabolito puede retrasarse con respecto a la primera administración de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica. En algunas ocasiones, la primera administración del agente quimioterapéutico antimetabolito puede ser al menos una semana después de la primera administración de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica. En otras ocasiones, la primera administración del agente quimioterapéutico antimetabolito puede ser al menos dos semanas después de la primera administración de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica. Como alternativa, la primera administración del agente quimioterapéutico antimetabolito puede ser al menos tres semanas después de la primera administración de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica. En algunas ocasiones, independientemente del retraso entre la primera administración de cada uno de los al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica y el agente quimioterapéutico antimetabolito, el agente quimioterapéutico antimetabolito puede administrarse dentro de las 24 horas de la administración de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica. En particular, se ha encontrado que un retraso de tres semanas entre la primera administración de al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica y la primera administración del agente quimioterapéutico antimetabolito tiene efectos significativos sobre la respuesta inmunitaria registrada.

Cuando el cáncer es cáncer de páncreas reseado, la primera administración del agente quimioterapéutico antimetabolito puede ser de 12 semanas o menos después de la resección quirúrgica del cáncer de páncreas. En algunas ocasiones, la primera administración puede ser de 10 semanas o menos después de la resección quirúrgica del cáncer de páncreas. En otras ocasiones, la primera administración del agente quimioterapéutico antimetabolito puede ser de 8 semanas o menos después de la resección quirúrgica del cáncer de páncreas.

El al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención, se puede administrar a un sujeto mediante cualquier técnica de suministro adecuada conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, entre otras técnicas, el al menos un péptido, al menos un linfocito T, la preparación de linfocitos T o la composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto por inyección, en forma de una solución, en forma de liposomas o en forma seca (por ejemplo, en forma de partículas recubiertas, etc.). El al menos un péptido o la composición farmacéutica se administra en una cantidad de entre 0,01 mg y 10 mg del al menos un péptido, por dosis. En otras ocasiones, el al menos un péptido o la composición farmacéutica puede administrarse en una cantidad de entre 0,1 mg y 2 mg del al menos un péptido, por

5 dosis, o en una cantidad de 0,1 mg de al menos un péptido, por dosis. Como alternativa, el al menos un péptido o la composición farmacéutica se administra en una cantidad de entre 0,7 mg del al menos un péptido, por dosis. La dosificación depende del número de péptidos diferentes administrados al paciente. Por ejemplo, cuando el al menos un péptido consiste en un solo tipo de mutación puntual, el al menos un péptido o la composición farmacéutica se administra en una cantidad de entre 0,1 mg del al menos un péptido, por dosis. En otro ejemplo, cuando el al menos un péptido comprende siete o más tipos de mutación puntual, el al menos un péptido o composición farmacéutica puede administrarse en una cantidad de 0,7 mg del al menos un péptido, por dosis.

10 El al menos un linfocito T o preparación de linfocito T, puede administrarse mediante inyección intravenosa y/o infusión, y puede administrarse en una cantidad, por ejemplo, de entre 10^6 y 10^{12} de cada linfocito T específico para un péptido. de la invención.

15 El agente quimioterapéutico antimetabolito se puede administrar a un sujeto mediante cualquier técnica de suministro conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico antimetabolito se puede administrar por cánula, vía central o por catéter central de inserción periférica. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico antimetabolito se administra en una cantidad de entre 100 y 10.000 mg/m² de superficie corporal. Como alternativa, el agente quimioterapéutico antimetabolito se puede administrar en una cantidad de entre 500 y 2.000 mg/m² de superficie corporal. En otras ocasiones, el agente quimioterapéutico antimetabolito se puede administrar en una cantidad de 1.000 mg/m² de superficie corporal.

20 En el presente documento se desvela un kit que comprende un primer producto que comprende al menos un péptido, un linfocito T o una composición farmacéutica, como se describe anteriormente y un segundo producto que comprende un suministro de un agente quimioterapéutico antimetabolito como se describe anteriormente. Los productos primero y segundo pueden proporcionarse en viales o compartimentos separados. En algunas ocasiones, el kit puede comprender además instrucciones para la administración de los productos primero y segundo.

Tablas

Tabla 1. Posición 13 péptidos RAS mutados de las SEQ ID NO: 1-6

1	13	30
MTEYKLVVVGAG	C VGKSALTIQLIQNHFVD	
MTEYKLVVVGAG	R VGKSALTIQLIQNHFVD	
MTEYKLVVVGAG	D VGKSALTIQLIQNHFVD	
MTEYKLVVVGAG	V VGKSALTIQLIQNHFVD	
MTEYKLVVVGAG	A VGKSALTIQLIQNHFVD	
MTEYKLVVVGAG	S VGKSALTIQLIQNHFVD	

25

Tabla 2. Posición 12 péptidos RAS mutados de las SEQ ID NO: 7-12

1	12	30
MTEYKLVVVGAG	A GVGKSALTIQLIQNHFVD	
MTEYKLVVVGAG	C GVGKSALTIQLIQNHFVD	
MTEYKLVVVGAG	D GVGKSALTIQLIQNHFVD	
MTEYKLVVVGAG	R GVGKSALTIQLIQNHFVD	
MTEYKLVVVGAG	S GVGKSALTIQLIQNHFVD	
MTEYKLVVVGAG	V GVGKSALTIQLIQNHFVD	

Tabla 3. Péptidos contenidos en TG01 de las SEQ ID NO: 13-19

ES 2 716 923 T3

5 21
KLVVVGAG**D**VGKSALTI
KLVVVGAA**A**GVGKSALTI
KLVVVGAC**C**GVGKSALTI
KLVVVGAD**D**GVGKSALTI
KLVVVGAR**R**GVGKSALTI
KLVVVGAS**S**GVGKSALTI
KLVVVGAV**V**GVGKSALTI

Tabla 4. Péptidos contenidos en TG02 de las SEQ ID NO: 13-20

5 21
KLVVVGAG**C**VGKSALTI
KLVVVGAG**D**VGKSALTI
KLVVVGAA**A**GVGKSALTI
KLVVVGAC**C**GVGKSALTI
KLVVVGAD**D**GVGKSALTI
KLVVVGAR**R**GVGKSALTI
KLVVVGAS**S**GVGKSALTI
KLVVVGAV**V**GVGKSALTI

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Se realizó un ensayo de fase I/II para investigar la seguridad y la respuesta inmunológica del tratamiento adyuvante del cáncer de páncreas resecao con vacunación con péptido RAS (TG01) solo y luego combinado con quimioterapia adyuvante con gemcitabina.

Los pacientes recibieron TG01 junto con un modulador inmunitario, GM-CSF, dentro de las 1-8 semanas posteriores a la cirugía. Entre 3-7 semanas después de comenzar el tratamiento con TG01/GM-CSF, los pacientes también recibieron gemcitabina. Los paciente fueron evaluados para la seguridad y las respuestas inmunitarias en la semana 11 después de recibir al menos un ciclo de gemcitabina.

10 Inicialmente, seis pacientes se trataron con TG01 y GM-CSF y, en la semana 11, se utilizaron la seguridad y las respuestas inmunitarias para evaluar cómo continuaría el estudio, como se establece a continuación.

Si, en la semana 11:

- 0 de 6 pacientes mostraban una respuesta inmunitaria, y/o 3 de 6 pacientes mostraban una toxicidad limitante de dosis (DLT), terminaría el estudio,
- 15 - 1-3 de 6 pacientes mostraban una respuesta inmunitaria y/o 3 de 6 pacientes mostraban una DLT, entonces, se incluirían 6 pacientes adicionales en el estudio,
- 4 o más de 6 pacientes mostraban una respuesta inmunitaria y/o 2 o menos de 6 pacientes mostraban una DLT, entonces se iniciaría el estudio de fase II.

Se decidió que, si la inscripción en la fase I se ampliaba a 12 pacientes, entonces, en la semana 11, si:

- 20 - menos de 4 de 12 pacientes mostraban una respuesta inmunitaria y/o más de 4 de 12 pacientes mostraban una DLT, entonces, terminaría el estudio,
- 4 o más de 12 pacientes mostraban una respuesta inmunitaria y/o 4 o menos de 12 pacientes mostraban una DLT, se iniciaría un estudio de fase II.

Por lo tanto, se iniciaría un estudio de fase II si:

- 25 a) 4 o más de 6 pacientes mostraban una respuesta inmunitaria y o 2 o menos de 6 pacientes mostraban una DLT en la semana 11, o
- b) 4 o más de 12 pacientes mostraban una respuesta inmunitaria y/o 4 o menos de 12 pacientes mostraban una DLT en la semana 11.

Preparación del tratamiento de prueba

30 Se proporcionó TG01 en viales de vidrio 2R que contenían 2,1 mg de TG01 y se disolvió el contenido de un vial de TG01 en 0,3 ml de agua estéril para inyección (7 mg/ml). La solución se utilizó dentro de las 6 horas posteriores a la reconstitución.

Se proporcionó GM-CSF en viales que contenían 0,1 mg y se disolvió el contenido de un vial en 0,33 ml de agua estéril para inyección (0,30 mg/ml). La solución se utilizó dentro de las 6 horas posteriores a la reconstitución.

35 Se administró la gemcitabina a una dosis de 1000 mg/m². El fármaco se suministró en viales de 200 mg y 1 g para la reconstitución en solución salina para administrarse mediante inyección intravenosa.

Para DTH, se disolvió el contenido de un vial de TG01 en 0,3 ml de agua estéril para inyección. La solución se utilizó dentro de las 6 horas posteriores a la reconstitución.

Dosis y administración de TG01 y GM-CSF

40 Se administraron TG01 y GM-CSF los días 1,3, 5, 8, 15, 22 y cada 2 semanas hasta el final de la quimioterapia (con el día 1 definido como el primer día de tratamiento TG01, que fue de 1-8 semanas después de la cirugía). Después del final de la quimioterapia, en pacientes que no mostraron recurrencia y/o tuvieron una respuesta inmunitaria positiva durante el período de tratamiento de estudio, se administraron más inyecciones de refuerzo cada 4 semanas hasta la semana 52 y a continuación, cada 12 semanas hasta 2 años o más hasta la retirada del consentimiento o la toxicidad, lo que fuera lo primero.

45 La dosis de TG01 fue de 0,70 mg (inyección de 0,10 ml de una solución de TG01 a 7 mg/ml reconstituida en agua para inyección). La dosis de GM-CSF fue de 0,03 mg (- inyección de 0,10 ml de una solución de GM-CSF a 0,3 mg/ml reconstituida en agua para inyección).

50 Ambos fármacos del estudio se administraron mediante inyecciones intradérmicas en la parte posterior de la parte superior del brazo y GM-CSF se administró 10-15 minutos antes de la inyección de TG01.

Dosificación y administración de quimioterapia

Los pacientes recibieron gemcitabina comenzando al menos 3 semanas después del inicio de TG01 y GM-CSF (Día 22, 36 o 50 del período de tratamiento inicial), pero a más tardar 12 semanas después de la fecha de la cirugía. El día de la primera dosis de TG01 y GM-CSF se consideró como el Día 1 del período de tratamiento con quimioterapia. La gemcitabina se administró como 1000 mg/m², por vía intravenosa, durante 30 minutos en los días 1, 8 y 15 de un ciclo de cuatro semanas durante seis ciclos en total.

Dosificación y administración de DTH

Se administró TG01 los días 1, 8, 15, 22, 36, 50 y 64 en la zona inferior del brazo contralateral.

La dosis de prueba de DTH se preparó el día del tratamiento y fue de 0,10 ml de TG01 a 7 mg/ml de agua para solución de inyección, preparada para inyección intradérmica en una jeringa estéril.

Criterios de dosificación de quimioterapia

Gemcitabina:

Antes de la administración de gemcitabina, al inicio de cada nuevo ciclo de tratamiento, se evaluó a los pacientes para asegurarse de que cumplieran con la información de prescripción de gemcitabina de los fabricantes del producto.

15 Resultados y análisis

Se amplió el estudio de 6 a 9 pacientes, y los resultados obtenidos del mismo se explican a continuación.

Se encontraron respuestas inmunitarias específicas de TG01 en los 9 sujetos en la semana 11, y no se presentaron DLT.

El perfil de seguridad fue el esperado para los pacientes después de la cirugía de páncreas que recibieron quimioterapia. Se consideró que hubo solo un evento adverso relacionado con TG01/GM-CSF, que fue una reacción en el lugar de la inyección. Un paciente experimentó tres eventos relacionados con TG01/GM-CSF y gemcitabina (náuseas, vómitos y síntomas similares a los de la gripe). Los eventos adversos relacionados con la gemcitabina fueron los esperados, siendo el principal evento adverso relacionado la neutropenia de grado 3/4. En estas ocasiones se requirieron interrupciones o reducciones en la dosis de gemcitabina.

Se informaron cuatro eventos adversos graves en dos pacientes. Un paciente experimentó una infección pulmonar y dos episodios de fiebre, todos considerados relacionados con la gemcitabina. Un paciente experimentó náuseas también consideradas no relacionadas con el tratamiento con TG01 y gemcitabina.

Al no haber reacción DTH al inicio del estudio (semana 1), cuatro pacientes (44%) desarrollaron una reacción DTH antes del inicio de gemcitabina al final de la semana 3 (Figuras 1 y 2). Esto aumentó a siete los pacientes (77%) con DTH positiva después del primer ciclo de gemcitabina (semana 6), y a los nueve pacientes (100%) después de la primera dosis de gemcitabina en el segundo ciclo (semana 8) (Figuras 1 y 2). Esto demuestra que se indujo una respuesta polarizada Th1 a TG01 en todos los pacientes después del tratamiento concomitante con TG01 y gemcitabina en la semana 8.

También se encontró que no hubo reducción ni anulación de las respuestas inmunitarias establecidas, de manera que las respuestas inmunitarias inducidas fueron persistentes (Figura 2). De hecho, el número de pacientes que mostraron una respuesta inmunitaria después de la administración tanto de TG01 como de gemcitabina en el segundo ciclo (semana 8) fue significativamente mayor que cuando se administró TG01 solo (Figura 2).

Estos resultados demuestran el hallazgo inesperado de que la combinación de TG01 y gemcitabina es eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en pacientes con cáncer, y que la respuesta inmunitaria de respuesta inducida es consistente. En particular, el algoritmo para continuar el estudio a la fase II (es decir, en la semana 11, si 4 o más de 6 pacientes mostraban una respuesta inmunitaria y/o 2 o menos de 6 pacientes mostraban una DLT, entonces se iniciaría el estudio de fase II) demuestra que la expectativa era que quizás el 50% de los pacientes mostrarían una respuesta inmunitaria en la semana 11. Que todos los pacientes demostraran tener una respuesta inmunitaria en la semana 11 fue, por lo tanto, muy sorprendente para los diseñadores del estudio.

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Targovax AS

<120> Vacuna peptídica

<130> PN814035WO

<150> EP14167265.9

50 <151> 06/05/2014

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 30

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Cys Val Gly Lys
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
20 25 30

<210> 2

10 <211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
20 25 30

<210> 3

15 <211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
20 25 30

<210> 4

20 <211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Val Val Gly Lys
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
20 25 30

<210> 5

30 <211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 716 923 T3

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Ala Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

5 <210> 6
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

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

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

10 <210> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ala Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

15 <210> 8
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

20 <210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

25 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

<210> 10
 <211> 30

ES 2 716 923 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

5 <210> 11
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

10 <210> 12
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

15 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

20 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ala Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

<210> 15

ES 2 716 923 T3

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

5 Ile

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 16

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

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

15 <400> 17

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Arg Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 18

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 19

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT

30

ES 2 716 923 T3

<213> Homo sapiens

<400> 20

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Cys Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

5

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Arg Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

10

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Val Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

15

<210> 23
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 23

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr
 85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
 100 105 110

ES 2 716 923 T3

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg
115 120 125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr
130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu
165 170 175

Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser
180 185

REIVINDICACIONES

1. Al menos un péptido, adecuado para provocar una respuesta inmunitaria, en el que el o cada péptido corresponde a un fragmento de una proteína RAS de tipo silvestre pero tiene una sustitución de aminoácido de la misma, para su uso en el tratamiento del cáncer mediante administración simultánea o secuencial con un análogo de pirimidina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el o cada péptido comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 o 13 de la proteína RAS, y en el que la sustitución de aminoácido del o cada péptido se encuentra en dicha posición 12 o 13, respectivamente, y se selecciona de una sustitución G13A, G13C, G13D, G13R, G13S, G13V, G12A, G12C, G12D, G12R, G12S o G12V.
2. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el al menos un péptido comprende dos o más péptidos, teniendo cada péptido una sustitución de aminoácido diferente.
3. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el al menos un péptido comprende:
- un péptido que tiene una sustitución G13D
 - un péptido que tiene una sustitución G12A
 - un péptido que tiene una sustitución G12C
 - un péptido que tiene una sustitución G12D
 - un péptido que tiene una sustitución G12R
 - un péptido que tiene una sustitución G12S y
 - un péptido que tiene una sustitución G12V.
4. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el al menos un péptido comprende un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 13, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 14, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 15, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 16, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 17, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 18 y un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 19.
5. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el al menos un péptido comprende:
- un péptido que tiene una sustitución G13D
 - un péptido que tiene una sustitución G13C
 - un péptido que tiene una sustitución G12A
 - un péptido que tiene una sustitución G12C
 - un péptido que tiene una sustitución G12D
 - un péptido que tiene una sustitución G12R
 - un péptido que tiene una sustitución G12S y
 - un péptido que tiene una sustitución G12V.
6. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el al menos un péptido comprende un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 13, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 14, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 15, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 16, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 17, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 18, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 19 y un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 20.
7. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el análogo de pirimidina es gemcitabina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
8. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el al menos un péptido comprende un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 13, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 14, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 15, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 16, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 17, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 18, un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 19 y un péptido que consiste en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 20, y en el que el análogo de pirimidina es gemcitabina.
9. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el cáncer comprende células que expresan una proteína RAS mutada.
10. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el cáncer es cáncer de páncreas.

11. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el análogo de pirimidina o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra por primera vez al menos tres semanas después de la primera dosis del al menos un péptido.
- 5 12. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el cáncer es cáncer de páncreas resecaado y el análogo de pirimidina o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra por primera vez 12 semanas o menos después de la resección quirúrgica del cáncer de páncreas.
13. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el análogo de pirimidina o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra dentro de las 24 horas del al menos un péptido.
- 10 14. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el análogo de pirimidina se administra después de que se haya administrado el al menos un péptido.
- 15 15. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el al menos un péptido se administra a una dosis de 0,01-10 mg.
16. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el análogo de pirimidina o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a una dosis de 100-10.000 mg/m².
17. El al menos un péptido para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el al menos un péptido y el análogo de pirimidina se administran simultánea o secuencialmente en al menos dos ocasiones, en el que cada ocasión de administración está separada por al menos una semana.
- 20 18. Al menos un linfocito T específico para el al menos un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o una preparación de linfocitos T que comprende linfocitos T específicos para el al menos un péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes cuando se presenta en una molécula del MHC, para su uso en el tratamiento del cáncer mediante administración simultánea o secuencial con un análogo de pirimidina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 19. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-17, o al menos un linfocito T o una preparación de linfocitos T, como se define en la reivindicación 18, para su uso en el tratamiento del cáncer mediante administración combinada o secuencial con un análogo de pirimidina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 20. Un análogo de pirimidina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer mediante administración simultánea o secuencial con al menos un péptido adecuado para provocar una respuesta inmunitaria, en el que el o cada péptido corresponde a un fragmento de una proteína RAS de tipo silvestre pero tiene una sustitución de aminoácido de la misma, en el que el o cada péptido comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 o 13 de la proteína RAS, y en el que la sustitución de aminoácido del o cada péptido se encuentra en dicha posición 12 o 13, respectivamente, y se selecciona de una sustitución G13A, G13C, G13D, G13R, G13S, G13V, G12A, G12C, G12D, G12R, G12S o G12V.

35

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Paciente	TG01	TG01	TG01	TG01+Gem	Gem ¹	TG01+Gem	NT ²	TG01+Gem
1						+		+
2								+
3						+		+
4			+	+		+		+
5			+	+		+		+
6								+
7		+	+	+		+		+
8			+			+		+
9				+		+		+

Fig. 1

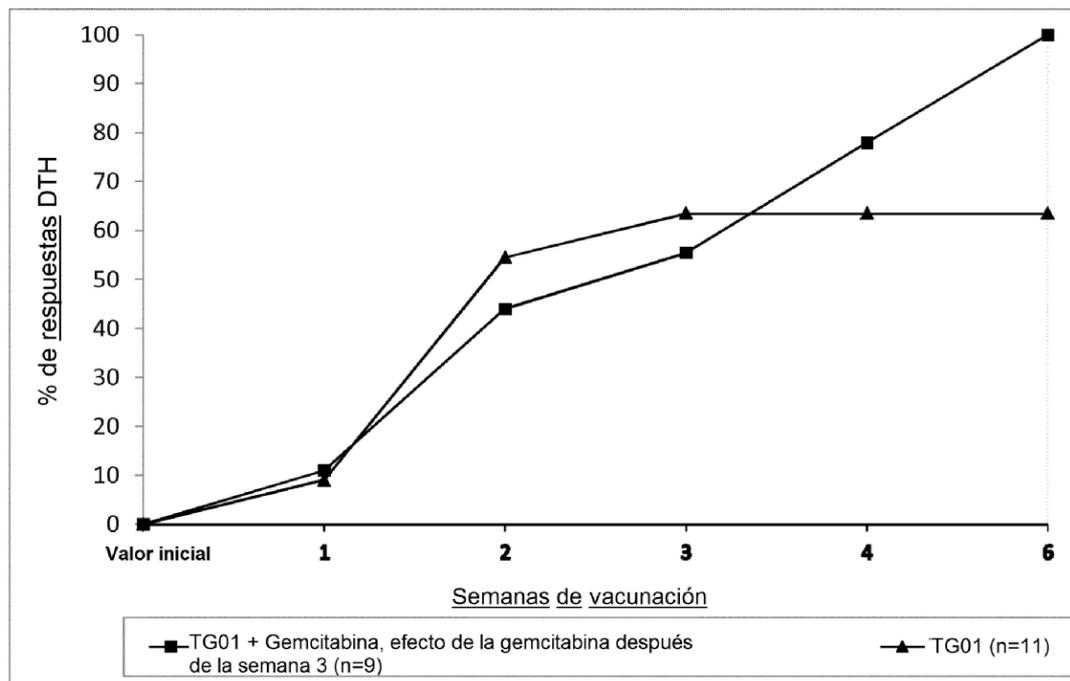


Fig. 2