

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 092**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2011** **PCT/EP2011/000980**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011** **WO11101173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2011** **E 11707345 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019** **EP 2536830**

54 Título: **Polipéptidos**

30 Prioridad:

16.02.2010 EP 10250265

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

30.03.2020

73 Titular/es:

ULTIMOVACS ASA (100.0%)
Ullernchausséen 64
0379 Oslo, NO

72 Inventor/es:

GAUDERNACK, GUSTAV;
RASMUSSEN, ANNE-MARIE y
SUSO, ELSE, MARIT, INDERBERG

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 751 092 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

Polipéptidos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido y a una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos. La invención también se refiere a un cóctel de polipéptidos y a un cóctel de moléculas de ácido nucleico. La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido, molécula de ácido nucleico o cóctel de los mismos. Además, la presente invención se refiere al polipéptido, molécula de ácido nucleico, cóctel o composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o profilaxis de cáncer.

Antecedentes de la invención

El cáncer es una enfermedad caracterizada por un crecimiento nuevo y anormal de células dentro de un individuo. El cáncer se desarrolla a través de un proceso de varias etapas que implica varios eventos mutacionales que permiten que se desarrollen células cancerosas, es decir, células que muestran las propiedades de invasión y metástasis. En términos generales, existen dos clases de genes en los que se puede producir mutaciones y provocar cáncer: los oncogenes y los genes supresores de tumores. La activación de los oncogenes da lugar a nuevas propiedades de la célula, tal como el crecimiento y la división hiperactivos, la protección contra la muerte celular programada, la pérdida de respeto por los límites normales de los tejidos y la capacidad de establecerse en diversos entornos tisulares. Los genes supresores de tumores se pueden inactivar, lo que permite la pérdida de funciones normales en la célula, tales como la replicación precisa del ADN, el control sobre el ciclo celular, la orientación y la adhesión dentro de los tejidos y la interacción con las células protectoras del sistema inmunitario.

Se han propuesto numerosos enfoques para el tratamiento y la profilaxis del cáncer. Un enfoque es el uso de péptidos antigénicos que comprenden fragmentos de antígenos tumorales específicos. Dichos péptidos antigénicos, cuando se administran a un individuo, provocan una respuesta de linfocitos T restringida por MHC de clase I o clase II contra células que expresan los antígenos tumorales específicos.

Debe tenerse en cuenta que para que se produzca dicha respuesta de linfocitos T, el polipéptido antigénico debe presentarse en una molécula MHC. Existe una amplia gama de variabilidad en las moléculas MHC en poblaciones humanas. En particular, diferentes individuos tienen diferentes alelos HLA que tienen una afinidad de unión variable por los polipéptidos, dependiendo de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos. Por lo tanto, un individuo que tiene un alelo HLA particular puede tener moléculas MHC que se unirán a un polipéptido de una secuencia concreta, mientras que otros individuos que carecen del alelo HLA tendrán moléculas MHC incapaces de unirse y presentar el polipéptido (o, al menos, sus moléculas MHC tendrán una afinidad muy baja por el polipéptido y lo presentan en un nivel relativamente bajo).

También se ha propuesto proporcionar una vacuna que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica dicho péptido antigénico. Dicha vacuna funciona mediante un principio similar, excepto que después de la administración de la vacuna a un individuo que necesita tratamiento, la molécula de ácido nucleico se transcribe (si es una molécula de ADN) y se traduce para sintetizar el péptido que después se une a y se presenta por una molécula de MHC como se describe anteriormente.

La telomerasa es una enzima que tiene la función de replicar el extremo 3' de las regiones de los telómeros de las cadenas de ADN lineales en las células eucariotas, ya que estas regiones no se pueden extender por la enzima ADN polimerasa de la manera normal. La enzima telomerasa comprende una subunidad telomerasa transcriptasa inversa ("*TERT*" o "*hTERT*" para seres humanos) y ARN de telomerasa. Al utilizar el ARN de la telomerasa como molde, la subunidad telomerasa transcriptasa inversa agrega una secuencia repetitiva al extremo 3' de los cromosomas en las células eucariotas para extender el extremo 3' de la cadena de ADN.

Se ha observado que la enzima telomerasa se activa en la gran mayoría de todos los tumores humanos. Se cree que esto ocurre porque, sin la expresión de la enzima telomerasa, los telómeros de las células se pierden gradualmente y la integridad de los cromosomas disminuye con cada ronda de división celular de una célula, lo que finalmente da como resultado la apoptosis de las células. Por lo tanto, la expresión de la enzima telomerasa es generalmente necesaria para que se desarrolle una célula cancerosa porque sin dicha expresión, con frecuencia, la muerte celular programada ocurrirá de manera predeterminada. En vista del papel de la activación de la telomerasa en el cáncer, la telomerasa se ha considerado como un antígeno tumoral específico y, por lo tanto, como una posible diana para la terapia contra el cáncer.

El documento WO03/038047 divulga un péptido designado como T672 que se informa que provoca una respuesta proliferativa de linfocitos T a partir de células de donantes sanos. También se divulgan otros péptidos de hTERT, pero no se sometieron a ninguna prueba experimental.

El documento WO00/02581 divulga polipéptidos de telomerasa que provocan una respuesta de linfocitos T restringida por MHC de clase I y/o clase II. Uno de los polipéptidos divulgados (que tiene la secuencia de aminoácidos EARPALLTSRLRFIPK, que también se conoce como GV1001) se está sometiendo a un ensayo clínico de fase III (Telo Vac) en el Reino Unido en pacientes con cáncer de páncreas como tratamiento de vacuna. R. Schroers et al. (Cancer Research, 62, 2600-2605, 1 de mayo de 2002) divulga un epítipo de hTERT restringido por HLA DR7.

El documento WO02/094312 divulga determinados polipéptidos derivados de hTERT.

Liu JP et al (2009, Telomerase in cancer immunotherapy Biochim Biophys Acta. 12 de septiembre) revisó 26 péptidos hTERT que habían demostrado inducir respuestas inmunitarias eficaces en células tumorales positivas para hTERT.

Las células dendríticas transfectadas con ARNm de hTERT también se han empleado anteriormente para tratar pacientes con cáncer de próstata metastásico (Su et al, 2005, Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. J Immunol. 174(6):3798-807). Su et al demostraron una generación exitosa de respuestas de linfocitos T específicos de hTERT medidas como linfocitos T CD8+ secretores de IFN γ y destrucción mediada por LTC de dianas de hTERT. Cuatro pacientes también experimentaron respuestas clínicas parciales. Sin embargo, no se caracterizaron epítipos de hTERT en estos estudios.

Siempre existe la necesidad de más polipéptidos antigénicos (y moléculas de ácido nucleico que codifiquen dichos polipéptidos) para el tratamiento del cáncer, tal como los polipéptidos que pueden provocar una respuesta inmunitaria más eficaz en individuos y/o polipéptidos que se presentan por alelos HLA presentes en una mayor proporción de la población.

La presente invención busca satisfacer uno o más de los problemas anteriores.

Sumario de la invención

La presente invención se define de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

Se aísla el polipéptido, es decir que no forma parte de la proteína (hTERT) en la que se produce de forma natural.

El polipéptido es capaz de provocar una respuesta de linfocitos T en un paciente sano con un alelo HLA apropiado para mostrar el polipéptido.

El polipéptido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 que incorpora las secuencias de las SEQ ID NO: 2 y 3 y no es necesario que sea adicional a las secuencias de las SEQ ID NO: 2 y 3.

Ventajosamente, el polipéptido tiene menos o igual a 80 o 50 o igual a 30 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

Se aísla la molécula de ácido nucleico, es decir que no forma parte del gen (el gen de la telomerasa) en el que se produce de forma natural.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un cóctel de polipéptidos que comprende al menos dos polipéptidos diferentes que comprenden secuencias seleccionadas del grupo que consiste en:

- i) SEQ ID NO: 2 o 7, en donde cada polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud. Se prefiere que dichos al menos dos polipéptidos sean diferentes en el sentido de que la secuencia definida en i) es diferente para cada polipéptido.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un cóctel de polipéptidos que comprende al menos dos polipéptidos diferentes, en donde los al menos dos polipéptidos diferentes comprenden un cóctel de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en:

- i) un cóctel de: un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7; y un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9;
- ii) un cóctel de: un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8; y un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9; y

iii) un cóctel de: un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8; y un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 10, en donde cada polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un cóctel de moléculas de ácido nucleico que comprende al menos dos moléculas de ácido nucleico diferentes, en donde las al menos dos moléculas de ácido nucleico diferentes comprenden un cóctel de moléculas de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en:

i) un cóctel de: una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7; y una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9;

ii) un cóctel de: una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8; y una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9; y

iii) un cóctel de: una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8; y una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 10, en donde cada polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención, una molécula de ácido nucleico de la invención, un cóctel de polipéptidos de la invención o un cóctel de moléculas de ácido nucleico de la invención y un adyuvante, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otro ingrediente terapéutico.

Preferentemente, el polipéptido, molécula de ácido nucleico, cóctel de polipéptidos o cóctel de moléculas de ácido nucleico está presente en una cantidad de entre 1 y 500 µg.

De manera conveniente, el polipéptido, la molécula de ácido nucleico, un polipéptido del cóctel de polipéptidos o una molécula de ácido nucleico del cóctel de moléculas de ácido nucleico está acoplado a un vehículo inmunogénico.

Preferentemente, el polipéptido o un polipéptido del cóctel de polipéptidos está unido a una sustancia adicional.

De manera conveniente, la sustancia adicional se selecciona del grupo que consiste en: un lípido, un azúcar, una cadena de azúcar, un grupo acetilo, un polímero natural y un polímero sintético.

Ventajosamente, el polipéptido o un polipéptido del cóctel de polipéptidos tiene la forma de un conjugado de lipopéptido.

De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido de la invención, una molécula de ácido nucleico de la invención, un cóctel de polipéptidos de la invención, un cóctel de moléculas de ácido nucleico de la invención o una composición farmacéutica de la invención para su uso en medicina.

De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido para su uso en medicina que comprende una secuencia seleccionada de: las SEQ ID NO: 2, 7, u 8, en donde el polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con un noveno aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico para su uso en medicina en donde la molécula de ácido nucleico consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 2 u 8, en donde el polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

Ventajosamente, el polipéptido, molécula de ácido nucleico, cóctel de polipéptidos, cóctel de moléculas de ácido nucleico o composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento o profilaxis de cáncer.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican 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 los polímeros de aminoácidos de origen natural.

El término "aminoácido" como se usa en el presente documento, se refiere a aminoácidos de origen natural y sintético, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que tienen una función que es similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados mediante el código genético, así como los modificados después de la traducción en células (por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina). La expresión "análogo de aminoácido" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica (un carbono alfa unido a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) como un aminoácido de origen natural pero tiene un grupo R modificado o cadenas principales modificadas (por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio). La expresión "mimético de aminoácidos" se refiere a compuestos químicos que tienen estructuras diferentes pero que tienen funciones similares a los aminoácidos de origen natural.

El término "fragmento" como se usa en el presente documento, en relación con un polipéptido significa una serie consecutiva de aminoácidos que forman parte del polipéptido. Un "fragmento inmunogénico" de un polipéptido es un fragmento como se define previamente que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta de linfocitos T, cuando se administra a un individuo.

Los términos "gen", "polinucleótidos" y "moléculas de ácido nucleico" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de múltiples nucleótidos. Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender ácidos nucleicos de origen natural o pueden comprender ácidos nucleicos artificiales tales como ácidos nucleicos peptídicos, morfina y ácido nucleico bloqueado, así como ácido nucleico de glicerol y ácido nucleico de treosa.

El término "nucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a nucleótidos de origen natural y análogos de nucleótidos sintéticos que son reconocidos por enzimas celulares.

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tratamiento parcial o completo e incluye: inhibir la enfermedad o síntoma, es decir, detener su desarrollo; y aliviar la enfermedad o síntoma, es decir, causar regresión de la enfermedad o síntoma.

En la presente memoria descriptiva, el porcentaje de "identidad" entre dos secuencias se determina 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 and 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 utilizando la URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico de barras que resume las respuestas de linfocitos T a hTERT detectadas en pacientes con cáncer de páncreas vacunados con CD transfectadas con ARNm de hTERT. En muestras de varios momentos a lo largo de un programa de vacunación, se detectaron respuestas de linfocitos T contra 24 péptidos hTERT solapantes de 15 meros. Se midió la proliferación en respuesta a las PBMC cargadas con péptido mediante la incorporación de ³H-timidina. Un índice de estimulación de > 2 se considera una respuesta inmunitaria.

La Figura 2 es una serie de diagramas que muestran la detección de linfocitos T CD8+ restringidos por HLA-A2 específicos de hTERT mediante citometría de flujo en pacientes con cáncer vacunados. Las PBMC se tiñeron directamente después del aislamiento sin estimulación previa con antígeno. La tinción con pentámeros se muestra en linfocitos seleccionados de linfocitos CD8+ CD3+. La tinción de fondo se muestra en la gráfica con pentámero irrelevante (péptido de VIH), las gráficas de pentámeros hTERT muestran la tinción para dos nuevos péptidos hTERT en un paciente con cáncer de páncreas (A) (el péptido denominado 720GLL corresponde a la SEQ ID NO: 3; el péptido denominado 728PLT corresponde a la SEQ ID NO: 6) y para un tercer péptido hTERT detectado en un paciente con cáncer de pulmón (B) (el péptido denominado 613RPA corresponde a SEQ ID NO: 5), este último en dos momentos diferentes, con cinco años de diferencia. Se analizaron 45 000 linfocitos T CD8+.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la proliferación de linfocitos T en respuesta al péptido GV1001 (SEQ ID NO: 10), 663-677 (15 meros) (SEQ ID NO: 2) y 660-689 (30 meros) (SEQ ID NO: 1). El índice de estimulación es una medida de cuántas veces por encima del fondo es la proliferación específica de péptidos.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de los clones de linfocitos T CD4+ que demuestran la proliferación específica de péptidos en respuesta a la disminución de las concentraciones de péptidos. Un valor superior a 2 se considera una respuesta positiva.

La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de la detección de linfocitos T CD8+ específicos para los péptidos de 9 o 10 meros de las SEQ ID NO: 3, 4 y 6 directamente en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre de pacientes. El péptido 615-624 (SEQ ID NO: 4) no se probó en los

dos últimos pacientes. Los pacientes son HLA-A2+. La tinción de fondo con pentámero irrelevante fue $< 0,05\%$.

La Figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de la detección de linfocitos T CD8+ específicos para el péptido de 9 meros 613-621 (SEQ ID NO: 5) en un paciente con cáncer de pulmón que ha estado en remisión completa durante varios años después de la vacunación con GV1001 (SEQ ID NO: 10). El paciente es HLA-B7+. Posteriormente, el paciente ha sido vacunado cada 6 meses y todavía se puede detectar una población estable de linfocitos T CD8+ específicos para el péptido hTERT 613-621 seis años después de que el paciente experimentara la remisión completa. Se detectó una segunda población menor de LTC específicos para otro epítipo de LTC, 672-681 (SEQ ID NO: 25), en algunos momentos.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la respuesta de linfocitos T contra la biblioteca de péptidos solapantes hTERT en un paciente con melanoma después de la vacunación con GV1001 (SEQ ID NO: 10).

La Figura 8 es un gráfico que muestra la respuesta de linfocitos T contra la biblioteca de péptidos solapantes hTERT en un paciente con cáncer de pulmón después de la vacunación con GV1001 (SEQ ID NO: 10).

La Figura 9 es un gráfico que muestra la respuesta de linfocitos T contra la biblioteca de péptidos solapantes hTERT en un paciente con cáncer de colon después de la vacunación con GV1001 (SEQ ID NO: 10).

La Figura 10 es un gráfico que muestra la respuesta de linfocitos T contra la biblioteca de péptidos solapantes hTERT en un segundo paciente con melanoma después de la vacunación con GV1001 (SEQ ID NO: 10).

La Figura 11 es un gráfico que muestra la respuesta de linfocitos T contra la biblioteca de péptidos solapantes hTERT en un paciente con cáncer de páncreas después de la vacunación con CD transfectadas con ARNm de hTERT. Los resultados mostrados son para el mismo paciente que en la Figura 1.

La Figura 12 es un gráfico que muestra la respuesta de linfocitos T contra la biblioteca de péptidos solapantes hTERT en un paciente con cáncer de pulmón después de la vacunación con CD transfectadas con ARNm de hTERT.

La Figura 13 es un gráfico que muestra la respuesta espontánea de linfocitos T contra la biblioteca de péptidos solapantes hTERT en un tercer paciente con melanoma que no ha sido vacunado.

La Figura 14 es un gráfico que muestra un resumen de los resultados de las Figuras 7 a 13 para péptidos hTERT seleccionados.

La Figura 15 es un gráfico que muestra las respuestas de linfocitos T contra péptidos hTERT seleccionados en cuatro pacientes con cáncer de pulmón.

La Figura 16 es un gráfico que muestra las respuestas de linfocitos T contra péptidos hTERT seleccionados en seis pacientes con melanoma.

La Figura 17 es un diagrama de dispersión que muestra el número de meses de supervivencia de cada paciente frente al número de péptidos que inducen una respuesta inmunitaria.

La Figura 18 es un gráfico que muestra la supervivencia de los diferentes pacientes probados y divididos en dos grupos dependiendo de sus respuestas inmunitarias contra las secuencias peptídicas contra péptidos hTERT seleccionados. Los que respondieron contra 0-1 péptidos además de GV1001 se colocaron en un grupo y los que respondieron contra 2 o más péptidos se colocaron en el otro grupo. Se analizó la supervivencia de los dos grupos usando una prueba t de grupo independiente. Una prueba preliminar para la igualdad de supervivencia indica que la supervivencia de los dos grupos es significativamente diferente. Por lo tanto, se realizó una prueba t de dos muestras que no supone una supervivencia igual. Usando la prueba t de varianzas desiguales, $t(6,1) = -3,22$, $p = 0,018$. Las estadísticas se realizaron con el software WINKS SDA (Texassoft, Cedar Hill, TX.) Las decisiones estadísticas se tomaron en $p = 0,05$. Para estos datos, la supervivencia Media (DE) para el grupo de 0-1 péptidos es 10,7 (3,9455), $N = 10$, y la Media (DE) para el grupo de ≥ 2 péptidos es 51,5714 (33,3909), $N = 7$.

Descripción detallada de la invención

En términos generales, la invención se refiere a un polipéptido de la proteína telomerasa que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud. También se divulgan en el presente documento polipéptidos de la proteína telomerasa que comprenden una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 4, 7, 8 y 9, en donde el polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud y no comprende la secuencia del polipéptido GV1001 (es decir, la SEQ ID NO: 10), la SEQ ID NO: 56 (indicada por Schroers *et al.* 2002) cualquiera de las SEQ ID NO: 46, 57 o 59 a 61 (indicadas en el documento WO03/038047) o la SEQ ID NO: 62 (indicada en el documento WO00/02581). El polipéptido tampoco consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 58 (indicada en el documento WO03/038047).

La SEQ ID NO: 1 incorpora las secuencias de las SEQ ID NO: 2 y 3. También se divulgan en el presente documento, polipéptidos que comprenden la secuencia de la SEQ ID NO: 6 (que incorpora las secuencias de las SEQ ID NO: 8 y 9) y la SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, el polipéptido consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1. También se divulgan en el presente documento, polipéptidos que consisten en las secuencias expuestas en una de las SEQ ID NO: 2 a 9. De acuerdo con la presente invención, el polipéptido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1. También se divulgan en el presente documento, polipéptidos que comprenden una de las secuencias expuestas en una de las SEQ ID NO: 2 a 9. En algunas realizaciones, cualquier aminoácido adicional en los extremos N y/o C es diferente de los presentes en la enzima telomerasa de origen natural.

Como se describe en el presente documento, se proporcionan fragmentos inmunogénicos del polipéptido mencionado anteriormente, cuyos fragmentos comprenden al menos ocho aminoácidos y en donde los fragmentos no son ninguno de los polipéptidos de las SEQ ID NO: 6 u 11 a 16 ni los fragmentos de polipéptidos tienen la secuencia de la SEQ ID NO: 56. Los posibles fragmentos inmunogénicos incluyen los expuestos en las SEQ ID NO: 17 a 40, que se predice que tienen afinidad de unión por moléculas MHC de ciertos alelos HLA de clase I. Debe apreciarse que los polipéptidos de las SEQ ID NO: 17 a 40 son todos fragmentos inmunogénicos del polipéptido de la SEQ ID NO: 1.

La secuencia de la enzima telomerasa humana (hTERT) se expone en el número de registro de GenBank AF015950. Debe observarse que cada una de las SEQ ID NO: 1 a 9 está presente dentro de los aminoácidos en las posiciones 660 a 705 de la enzima telomerasa. Esto corresponde al sitio activo de la subunidad telomerasa transcriptasa inversa humana. Se cree que, una vez que se provoca una respuesta inmunitaria a los epítomos en esta región de la subunidad transcriptasa inversa, cualquier célula en un tumor en el que la sección del gen de la telomerasa que codifica esta región haya mutado y que podría así evitar la respuesta inmunitaria, también habría comprometido la actividad enzimática de la proteína telomerasa codificada. Por lo tanto, al dirigir esta región de la enzima telomerasa, es menos probable que una colonia de células cancerosas pueda sobrevivir mediante la mutación del gen de la telomerasa.

En algunas realizaciones, una pluralidad de polipéptidos como se define anteriormente están unidos covalentemente entre sí para formar un polipéptido grande o incluso un polipéptido cíclico.

En las realizaciones de la invención descritas anteriormente, se proporciona un polipéptido de una única secuencia. Sin embargo, en otras realizaciones, se proporciona un cóctel (es decir, una mezcla) de polipéptidos donde el cóctel comprende al menos dos polipéptidos diferentes que comprenden las secuencias de las SEQ ID NO: 2 o 7. También se describe en el presente documento un cóctel que comprende al menos dos polipéptidos diferentes que comprenden las secuencias de las SEQ ID NO: 2 a 7. En el presente documento también se describe un cóctel que comprende fragmentos inmunogénicos de dichos polipéptidos, en el que los fragmentos inmunogénicos comprenden al menos ocho aminoácidos. Los polipéptidos tienen menos de 100 aminoácidos de longitud.

Se prefiere particularmente que los polipéptidos del cóctel comprendan las secuencias de las SEQ ID NO: 1, 7, 8 o 9. Se prefiere especialmente que los polipéptidos del cóctel comprendan las secuencias de las SEQ ID NO: 1, 7 y 9; SEQ ID NO: 1, 8 y 9; o las SEQ ID NO: 1, 8 y 10. Por lo tanto, está dentro del alcance de la invención que uno de los polipéptidos del cóctel comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (es decir, la secuencia del péptido denominado GV1001). Como se describe en el presente documento, los fragmentos inmunogénicos pueden ser los de las SEQ ID NO: 17 a 40.

Se prefiere que los al menos dos polipéptidos sean diferentes en el sentido de estar basados en diferentes secuencias seleccionadas de las SEQ ID NO: 2 o 7.

Se prefiere particularmente que en el cóctel de polipéptidos, los polipéptidos del cóctel sean capaces de estar unidos por moléculas MHC de más de un alelo HLA. Por ejemplo, en una realización, el cóctel comprende un primer polipéptido que es capaz de estar unido por moléculas MHC de alelo HLA-A*0201 y un segundo polipéptido que es capaz de estar unido por moléculas MHC de alelo HLA-A-A*03. También debe entenderse que en algunas realizaciones el cóctel comprende más de dos polipéptidos que tienen diferentes secuencias (por ejemplo, 3, 4 o 5 polipéptidos).

También se divulga en el presente documento que el o cada polipéptido proporcionado no tiene identidad de secuencia exacta con uno de los polipéptidos mencionados anteriormente. En cambio, el polipéptido tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con el polipéptido expuesto anteriormente. Como se describe en el presente documento, la secuencia variante puede tener al menos un 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con la expuesta anteriormente. Como se describe en el presente documento, cualquier adición o sustitución de la secuencia de aminoácidos puede dar como resultado la conservación de las propiedades de la cadena lateral de aminoácidos original. Es decir, la sustitución o modificación es "conservativa".

Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Ejemplos de propiedades de las cadenas laterales de aminoácidos son los aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q)
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M).

También se divulga en el presente documento que la secuencia del o de cada polipéptido se altera para cambiar (por ejemplo, aumentar) la afinidad de unión de un polipéptido a una molécula MHC de un alelo HLA particular. En algunas realizaciones, el polipéptido tiene aminoácidos adicionales, además de los expuestos anteriormente, en el extremo N y/o C del mismo. Dichos aminoácidos adicionales también pueden usarse para alterar (por ejemplo, aumentar) la afinidad de unión de un polipéptido a una molécula MHC.

En algunas realizaciones, el o cada polipéptido es capaz de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos ("LTC"). También se divulga en el presente documento un polipéptido cuya secuencia se ha alterado como se expone anteriormente y que es capaz de inducir una respuesta de LTC. Es decir, el polipéptido debería ser capaz de inducir LTC cuando el polipéptido es presentado por células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas).

La confirmación de la inducibilidad de LTC se puede lograr induciendo células presentadoras de antígeno que portan antígenos MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos o células dendríticas) o más específicamente células dendríticas derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana, y después de la estimulación con los polipéptidos, mezclando con linfocitos CD8+, y después midiendo el IFN-gamma producido y liberado por LTC contra las células diana. Como sistema de reacción, se pueden usar los animales transgénicos que se han producido para expresar un antígeno HLA humano (por ejemplo, los descritos en Ben-Mohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 61(8): 764-79, Agosto de 2000, Artículos relacionados, Libros, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response). Por ejemplo, las células diana pueden radiomarcarse con ⁵¹Cr y se puede calcular la actividad citotóxica a partir de la radioactividad liberada por las células diana. De manera alternativa, la inducibilidad de LTC se puede examinar midiendo IFN-gamma producido y liberado por LTC en presencia de células presentadoras de antígeno que portan péptidos inmovilizados, y visualizando la zona de inhibición en los medios usando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

En algunas realizaciones adicionales de la presente invención, el o cada polipéptido está unido a otras sustancias, al tiempo que conserva su capacidad de inducir una respuesta de LTC. Dichas otras sustancias incluyen lípidos, azúcares y cadenas de azúcares, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos y similares. El polipéptido, en determinadas realizaciones, contiene modificaciones tales como glucosilación, oxidación o fosforilación de la cadena lateral.

En algunas realizaciones, el o cada polipéptido se produce mediante procesos convencionales conocidos en la técnica. De manera alternativa, el polipéptido es un fragmento de una proteína telomerasa producida por escisión, por ejemplo, usando bromuro de cianógeno y posterior purificación. También se puede utilizar la escisión enzimática. En realizaciones adicionales, el polipéptido está en forma de un polipéptido recombinante expresado. Por ejemplo, se prepara un vector adecuado que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido en una forma expresable (por ejemplo, cadena abajo de una secuencia reguladora correspondiente a una secuencia promotora) y se transforma en una célula hospedadora adecuada. La célula hospedadora se cultiva después para producir el polipéptido de interés. En otras realizaciones, el polipéptido se produce *in vitro* utilizando sistemas de traducción *in vitro*.

En una realización alternativa de la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se expone anteriormente.

En el presente documento se divulga un cóctel (es decir, una mezcla) de moléculas de ácido nucleico en el que el cóctel comprende al menos dos moléculas de ácido nucleico diferentes que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la secuencia de las SEQ ID NO: 2 a 7. El polipéptido puede ser un

fragmento de una de las SEQ ID NO: 2 a 7 que comprende al menos ocho aminoácidos. Como se describe de manera alternativa en el presente documento, la secuencia del polipéptido no es idéntica a la mencionada anteriormente, sino que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la misma. En cualquier caso, el polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud. También se divulga en el presente documento en que el polipéptido codificado comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 7, 8 o 9. Los polipéptidos codificados en el cóctel comprenden las secuencias de las SEQ ID NO: 1, 7 y 9; SEQ ID NO: 1, 8 y 9 o SEQ ID NO: 1, 8 y 10. En algunas realizaciones, un polipéptido codificado comprende, por lo tanto, la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (es decir, la secuencia del péptido GV1001). Como se describe en el presente documento, los fragmentos inmunogénicos que pueden codificarse son de las secuencias de las SEQ ID NO: 17 a 40. También se divulga en el presente documento que las al menos dos moléculas de ácido nucleico son diferentes en el sentido de estar basadas en diferentes secuencias seleccionadas de las SEQ ID NO: 1 a 10.

Debe apreciarse que, debido a la degeneración del código genético, las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido concreto pueden tener varias secuencias de polinucleótidos. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCT codifican, todos ellos, el aminoácido alanina.

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser ADN o ARN o derivados de los mismos.

En realizaciones adicionales de la presente invención, hay una composición farmacéutica que comprende un polipéptido, una molécula de ácido nucleico o un cóctel de polipéptidos o moléculas de ácido nucleico como se describe anteriormente. Además, la composición farmacéutica comprende un adyuvante, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una mezcla de un polipéptido de la invención y una molécula de ácido nucleico de la invención.

Adyuvantes a modo de ejemplo incluyen el adyuvante completo o incompleto de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina del cólera y toxina de la salmonela. Un adyuvante particularmente preferido es GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos). Los diluyentes y excipientes a modo de ejemplo incluyen agua esterilizada, solución salina fisiológica, líquido de cultivo y tampón fosfato.

El polipéptido o molécula de ácido nucleico se encuentra, en determinadas realizaciones, acoplado a un vehículo inmunogénico. Vehículos inmunogénicos a modo de ejemplo incluyen hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina e inmunoglobulina de ave.

La composición farmacéutica, en algunas realizaciones, también comprende un ingrediente terapéutico adicional. Ingredientes terapéuticos a modo de ejemplo adicionales incluyen interleucina-2 (IL2), interleucina-12 (IL12), un polipéptido de telomerasa adicional (es decir, un polipéptido de la enzima telomerasa aparte de los analizados anteriormente) agentes quimioterapéuticos, analgésicos, agentes antiinflamatorios y otros agentes anticancerígenos. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende un polipéptido se proporciona en forma de un conjugado de lipopéptido que se sabe que induce una respuesta de linfocitos T citotóxicos de alta afinidad (Deres, 1989, Nature 342).

Se pueden encontrar más detalles de componentes adicionales de la composición farmacéutica en Remington's Pharmaceutical Sciences and US Pharmacopoeia, 1984, Mack Publishing Company, Easton, PA, EE. UU.

Cuando está en uso, el polipéptido, molécula de ácido nucleico, el cóctel de péptidos, el cóctel de moléculas de ácido nucleico o la composición farmacéutica, como se explica anteriormente (en lo sucesivo, el "medicamento") se administra a un paciente que necesita tratamiento. De manera alternativa, el producto se administra a un individuo antes de cualquier síntoma de cáncer para proporcionar inmunidad protectora contra el cáncer.

En realizaciones en las que el medicamento comprende un polipéptido, el polipéptido es endocitado por células presentadoras de antígeno, puede estar sujeto a procesamiento de antígeno y después se presenta en complejo con una molécula MHC de clase I o clase II sobre la superficie celular. A través de la interacción con los receptores de linfocitos T sobre la superficie de los linfocitos T, se provoca una respuesta de linfocitos T CD4+ o CD8+. En realizaciones en las que el medicamento comprende una molécula de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico también se endocita y después se transcribe (si la molécula de ácido nucleico es ADN) y el polipéptido codificado se sintetiza a través de vías celulares endógenas. Posteriormente, el polipéptido codificado se procesa y se presenta sobre una molécula MHC para provocar la respuesta de los linfocitos T, como se describe anteriormente. Por lo tanto, el medicamento se puede usar como una vacuna para provocar inmunidad por linfocitos T CD4+ o CD8+.

En principio, se puede usar cualquier modo de administración del medicamento, pero se prefiere particularmente la inyección. Por ejemplo, el medicamento puede inyectarse directamente en un tumor en un paciente. Sin embargo, si el cáncer a tratar se encuentra en la nariz o la boca de un paciente, entonces, en algunas realizaciones, el medicamento se administra por pulverización e inhalación.

Una dosis adecuada para el medicamento es de 50-200 µg, aunque ocasionalmente se pueden requerir dosis fuera de este intervalo (por ejemplo, de 1-500 µg). Se prefiere particularmente una dosis de entre 100 y 150 µg. El

medicamento es, en algunas realizaciones, administrado al paciente semanalmente o mensualmente. En determinadas realizaciones, se busca un régimen de tratamiento "agresivo" que comprende tres administraciones del medicamento en la primera semana de tratamiento, después administraciones semanales durante un mes, después administraciones mensuales durante seis meses seguidos de una única administración cada seis meses.

En principio, el medicamento puede estar admitido para un paciente que padezca cualquier tipo de cáncer en el que se active el gen de la telomerasa. Tales cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, melanoma maligno, leucemias, linfomas, cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero y carcinomas del tracto biliar. Como se indica anteriormente, la enzima telomerasa se expresa en la gran mayoría de los cánceres, por lo que la eficacia del medicamento de la presente invención no se limita a ningún tipo particular de cáncer.

Debe apreciarse que, dependiendo de la clase de respuesta de linfocitos T que se provoque, se prefieren diferentes longitudes de polipéptidos. Más específicamente, para provocar una respuesta de linfocitos T CD8+, el polipéptido debe presentarse sobre moléculas de MHC de clase I que generalmente solamente se unirán a polipéptidos que tienen entre 8 y 10 restos de aminoácidos de longitud. Por otro lado, para provocar una respuesta de linfocitos T CD4+, es necesario que el polipéptido se presente en una molécula MHC de clase II para lo cual los polipéptidos pueden ser generalmente más largos, generalmente entre 15 y 24 restos de aminoácidos de longitud. Cabe señalar que algunos de los polipéptidos divulgados en el presente documento (por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NO: 1) son más largos de los que normalmente se alojarían en una molécula MHC de clase I o clase II. Se ha demostrado que los péptidos de esta longitud inducen respuestas inmunitarias más fuertes, por ejemplo, por grupos que trabajan en la vacunación contra el VPH y el cáncer de cuello uterino (Welters et al, 2008). Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se cree que tales polipéptidos, después de su administración a un paciente, son endocitados por las células, sometidos a degradación proteolítica en el proteasoma y después presentados sobre una molécula MHC de clase I o clase II. Por lo tanto, tales polipéptidos pueden dar lugar a una respuesta de linfocitos T restringida por MHC de clase I y/o MHC de clase II. También debe apreciarse que los polipéptidos más largos permanecen conservados en un paciente durante un período de tiempo mayor que los polipéptidos más cortos y, por lo tanto, hay un período de tiempo más largo durante el cual pueden provocar una respuesta inmunitaria. Esto es particularmente significativo con respecto a aquellos polipéptidos que tienen una afinidad de unión a MHC relativamente baja.

También debe apreciarse que la enzima telomerasa es una "autoproteína", es decir, la enzima es una proteína de origen natural en el cuerpo humano. En consecuencia, los individuos generalmente habrán desarrollado cierto grado de tolerancia inmunitaria a los polipéptidos de la enzima telomerasa a través de un proceso mediante el cual los linfocitos T reactivos con dichos polipéptidos se destruyen en el timo del individuo durante el desarrollo de los linfocitos T. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, se desean los polipéptidos de la presente invención con una afinidad de unión a MHC relativamente baja. Esto se debe a que los polipéptidos con menor afinidad de unión a MHC se habrán expuesto a los linfocitos T en maduración a una tasa menor y, por lo tanto, es menos probable que se hayan eliminado todos los linfocitos T del individuo reactivos con el polipéptido del repertorio de linfocitos T del individuo. Así, los polipéptidos que tienen una afinidad de unión a MHC relativamente baja son, en algunas realizaciones, capaces de superar la tolerancia inmunitaria más fácilmente.

En algunas realizaciones de la invención, la administración de uno de los polipéptidos de la invención da como resultado la "propagación del epítipo" por lo que se provoca una respuesta inmunitaria contra otros polipéptidos de la proteína de la telomerasa que son adyacentes al polipéptido administrado en la proteína telomerasa.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se caracterizaron los epítipos de hTERT que fueron reconocidos por los linfocitos T de un paciente después de la vacunación con CD transfectadas con hTERT. La vacunación dio como resultado una respuesta inmunitaria diversa y amplia que implica tanto a linfocitos Th CD4+ como a linfocitos T CD8+. Se cree que esta respuesta es responsable de la regresión tumoral y la supervivencia a largo plazo observada en el paciente.

Material y métodos

Paciente

Se vacunó a una mujer de 62 años con adenocarcinoma ductal recurrente del páncreas con células dendríticas cargadas con ARNm de hTERT sobre una base de uso compasivo. El tratamiento fue aprobado por la Agencia de Medicamentos de Noruega y el Comité Regional de Ética en la Investigación Médica. Se realizó de conformidad con la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito del paciente.

Producción de CD transfectadas con ARNm

Las CD se generaron como se describe anteriormente (Kyte et al, 2006 y Mu LJ et al 2003). Brevemente, los monocitos obtenidos del producto de leucoféresis se cultivaron durante 5 días con factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e interleucina-4 (IL-4). Las CD inmaduras resultantes se transfectaron con ARNm de hTERT mediante electroporación de onda cuadrada (Kyte et al, 2006, Sæbøe-Larssen S et al 2002) y después se cultivaron durante 2 días con citocinas que facilitan la maduración (interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF α) y prostaglandina E₂ (PGE₂)). Para obtener las CD de control adecuadas, se transfectó de forma simulada una fracción de las CD, es decir, se electroporó sin ARNm. El fenotipo de las CD se evaluó mediante citometría de flujo, como se describe previamente (Kyte et al, 2006). Las CD tenían un fenotipo DC maduro, que expresaba HLA de clase II, CD86 y CD83, pero no CD14. La viabilidad de las CD fue > 85 %, según lo evaluado por tinción con azul de tripano.

El segundo y tercer lote de vacunas fueron CD rápidas (Alldawi et al 2005, Tanaka et al 2006, Ho et al 2006). Los monocitos se cultivaron durante 2 días con GM-CSF e IL-4, después se maduraron durante 1 día de la misma manera que para CD convencionales antes de la electroporación. Los CD se dejaron toda la noche antes de congelarlas.

Vacuna

La vacuna consistía en 5 x 10⁶ células dendríticas autólogas derivadas de monocitos cargadas con ARNm de hTERT. La paciente recibió 4 inyecciones semanales seguidas de inyecciones de refuerzo mensuales.

Control clínico

Los eventos adversos se registraron y clasificaron de acuerdo con los criterios de toxicidad comunes del NCI, tal como se indica anteriormente (Kyte et al, 2006 Gene therapy). Solo se observaron efectos secundarios menores, sin toxicidad de grado III-IV relacionada con el tratamiento. La respuesta objetiva del tumor se evaluó mediante examen clínico y tomografías computarizadas antes del inicio de la vacunación y cada 3 meses durante la vacunación. La respuesta tumoral se clasificó de acuerdo con los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) (Therasse P et al, 2000).

DTH

Inmunomonitorización

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes de las cuatro vacunas convencionales, después de 5 semanas y después de 12 semanas. También se obtuvieron PBMC antes de cada vacuna de refuerzo mensual. Las PBMC se aislaron y congelaron como se describe anteriormente (Kyte et al, 2005). Las PBMC descongeladas se estimularon una vez *in vitro* con CDt (no con CDsim) y se cultivaron y después se probaron en ensayos de proliferación de linfocitos T (timidina ³H) como se describe previamente (Kyte et al 2006). Los linfocitos T se probaron por triplicado. Se usaron CDt irradiadas y controles de CD transfectadas de forma simulada (CDsim) o PBMC con o sin péptido hTERT como CPA. Se incluyeron controles negativos solamente con linfocitos T.

Las PBMC de varios momentos se estimularon con una biblioteca de péptidos hTERT de 15 meros solapantes o un péptido hTERT de 30 meros, todos de Prolimmune y después se probaron en ensayos de proliferación como anteriormente usando PBMC irradiadas como CPA como se describe en (Bernhardt et al 2006).

Citometría de flujo

La tinción con pentámeros se realizó en PBMC de la paciente frescas o congeladas. Los pentámeros conjugados con ficoeritrina se fabricaron por Prolimmune y se probaron para la tinción inespecífica sobre líneas de linfocitos T HLA-A2 positivos específicos para el péptido NLVPMTATV del Virus de la Coriomeningitis (CMV). Se utilizó la concentración de trabajo recomendada por el fabricante. Se utilizó como control negativo pentámero con el péptido SLYNTVATL-A*0201 de VIH. Las células se tiñeron con pentámeros durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT), se lavaron en tampón de tinción que consistía en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía albúmina sérica humana al 0,1 % (HSA) y azida de sodio al 0,1 %. Después, las células se tiñeron con isotiocianato de fluoresceína anti-CD4 (FITC), anti-CD19-FITC (eBioscience), anti-CD8-PerCP y anti-CD3-Azul Pacífico (PB) (eBioscience) durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron una vez en tampón de tinción y se resuspendieron en el mismo buffer antes de la obtención. Para la tinción intracelular, los linfocitos T estimulados con péptidos de 12 días se estimularon durante la noche en presencia de Brefeldin A (BD Bioscience) a 10 ug/ml y BD Golgistop (BD Biosciences) a una dilución 1/1000 con una línea celular linfoblastoide B transformada con el virus Epstein Barr autólogo (EBV-LCL) cargado con péptido en una proporción de linfocitos T a diana de 5:1. Las células diana no cargadas con péptidos y los linfocitos T solos se usaron como controles negativos. Después, las células se tiñeron para CD3 (eBioscience), CD4, CD8, IFN- γ (eBioscience), IL-2 y TNF- α usando el kit BD Cytfix/Cytoperm de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, las células se resuspendieron en tampón de tinción que contenía paraformaldehído al 1%. Todos los anticuerpos y todos los reactivos para la tinción intracelular de citocinas se adquirieron de BD Pharmingen, excepto donde se indique. Se adquirieron 250.000 linfocitos por muestra usando

un citómetro de flujo BD LSR II y los datos se analizaron usando el software FlowJo (Treestar Inc., Ashland, OR, EE. UU.).

Resultados

La paciente experimentó la estabilización de la enfermedad con el tratamiento con gemcitabina, pero después de 5 meses el tratamiento se suspendió debido a los efectos adversos. Después le ofrecieron la vacuna con CD como tratamiento alternativo. Después de 18 meses de vacunación, experimentó una remisión completa que se mantiene después de 30 meses de vacunación (44 meses después del diagnóstico). La paciente se volvió a diagnosticar y examinar por un patólogo independiente que confirmó el diagnóstico de adenocarcinoma ductal.

La mediana de supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas inoperable es de 8-10 meses, que en este caso se supera con creces. El primer lote de vacunas consistió en 5×10^6 CD convencionales (Kyte et al 2006) y a la paciente se le administraron 15 vacunas. Debido a la demostración de una respuesta inmunitaria contra la vacuna y la enfermedad estable, se hicieron nuevos lotes de vacunas y los lotes 2 y 3 fueron vacunas de CD rápidas y las vacunas 10 y 17, respectivamente, de 5×10^6 CD cargadas con ARNm de hTERT.

Una respuesta proliferativa de linfocitos T a la vacuna de CD podría medirse *in vitro* 3 meses después de la vacunación y estabilizarse a partir del mes 6. Habiendo documentado la presencia de una respuesta inmunitaria a las CD transfectadas con hTERT, se deseaba investigar qué epítomos de hTERT eran responsables de inducir la respuesta inmunitaria. Esto se probó midiendo la proliferación de linfocitos T en una biblioteca de péptidos hTERT (Figura 1) y tiñendo *ex vivo* pentámeros de PBMC.

Se detectaron respuestas proliferativas de linfocitos T en seis de los péptidos hTERT de 15 meros de la biblioteca de péptidos solapantes y un péptido hTERT de 30 meros. La presencia de linfocitos T CD8+ positivos para pentámeros de hTERT se detectó tanto antes como después de la vacunación con porcentajes que varían de 0,15 % a 1,25 % en PBMC no estimuladas. Se demostró que una población del 1,25 % de los linfocitos T CD8+ era positiva para pentámeros en PBMC recientes 24 meses después de la vacunación (Figura 2A) y aumentó a aproximadamente el 3 % después de la estimulación con péptidos *in vitro* (datos no mostrados).

Después de una ronda de estimulación *in vitro* con el péptido hTERT de 30 meros que contenía al menos dos epítomos de T auxiliares, así como los epítomos de LCT en el pentámero 720GLL, se pudo detectar una pequeña población de linfocitos T CD4+ multifuncionales, que secretaban IFN- γ , IL-4 y TNF- α en respuesta a linfocitos B autólogos transformados con EBV cargados con el mismo péptido. No hubo diferencia en la población de linfocitos T CD8+ después de la estimulación con las células diana cargadas con péptido en comparación con las estimuladas con dianas no cargadas con péptido (datos no mostrados). Los altos niveles de fondo de IL-2 observados pueden deberse a cierta estimulación dada por la línea de linfocitos B transformados que podría expresar hTERT. Desafortunadamente, debido a la cantidad limitada de linfocitos T en cada experimento, no se pudieron realizar ensayos funcionales adicionales.

Análisis

En este ejemplo, se indicó un paciente con cáncer de páncreas con un curso extraordinario de la enfermedad después del tratamiento con quimioterapia y la vacunación con CD autólogas transfectadas con ARNm de hTERT.

El paciente descrito en este caso ha sobrevivido durante más de 4 años con un adenocarcinoma pancreático recurrente después de una cirugía radical. Para confirmar que el diagnóstico original era correcto, un patólogo independiente diagnosticó de nuevo el tumor primario.

Después de una cirugía radical en enero de 2006, la paciente recayó en diciembre de 2006 con ganglios linfáticos agrandados localizados en hilio hepático, tronco ilíaco y en el retroperitoneo, según lo evaluado por TC.

La paciente respondió bien a la quimioterapia y las tomografías computarizadas revelaron contracción del tumor. Sin embargo, después de 5 meses con quimioterapia, la paciente desarrolló efectos adversos graves y se detuvo el tratamiento.

En este contexto clínico, se le ofreció al paciente tratamiento con CD autólogas cargadas con vacuna con ARNm de hTERT sobre una base de uso compasivo para consolidar el efecto beneficioso de la quimioterapia.

Curiosamente, en lugar de desarrollar una enfermedad progresiva después de que finalizara la quimioterapia, se obtuvo una estabilización de la enfermedad a largo plazo y una remisión potencialmente completa. Dos exploraciones PET consecutivas con 6 meses de diferencia, revelaron un tejido tumoral metabólicamente silencioso en el sitio de las lesiones pancreáticas y metastásicas. Estos hallazgos interesantes indican que la estrategia inmunoterapéutica utilizada ha inducido una respuesta inmunitaria clínicamente relevante en esta paciente. Por lo tanto, era importante documentar y estudiar en profundidad la respuesta inmunitaria contra la hTERT en la paciente. Asimismo, como existe una falta completa de información sobre la respuesta inmunitaria detallada a hTERT de los

estudios que utilizan ARNm de hTERT de longitud completa para la vacunación, es importante identificar epítomos de hTERT clínicamente relevantes para el desarrollo de la próxima generación de vacunas de hTERT.

Se encontró una alta frecuencia de pentámeros de unión a linfocitos T CD8+ con nuevos epítomos de LTC. Estos dos epítomos estaban restringidos a HLA-A*0201 y no se han descrito previamente. Curiosamente, el epítomo de 9 meros (720GLL, SEQ ID NO: 3) está incluido en un péptido de 15 meros (720, PGLLGASVLGLDDIH - SEQ ID NO: 55) que tiene la misma longitud que el péptido R672 (SEQ ID NO: 56) descrito previamente por Schroers et al 2002, pero desplazó un amino ácido hacia el extremo C de hTERT. Es posible, por lo tanto, que los mismos restos de aminoácidos dentro de ambos péptidos de 15 meros sean responsables de la respuesta de los linfocitos T. Es importante destacar que, el mismo péptido de 15 meros (720) también fue reconocido por los linfocitos T de la paciente indicada en este caso en los ensayos de proliferación, lo que indica que este fragmento de péptido de hTERT puede haber provocado una respuesta de linfocitos T tanto CD4+ como CD8+ en esta paciente. Además, los linfocitos T de esta paciente reconocieron otros cinco péptidos de 15 meros. Tres de estos péptidos no se han indicado previamente. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que esta vacuna ha inducido respuestas de linfocitos T a al menos 10 epítomos de hTERT diferentes en esta paciente. El número de epítomos puede ser considerablemente mayor ya que solo se usó un número limitado de péptidos de una biblioteca de péptidos solapantes que no cubre la secuencia completa y solo unos pocos pentámeros limitados a HLA-A*0201 presentaron péptidos.

Esto indica que no existe una tolerancia generalizada contra los péptidos hTERT y que la estrategia de vacunación que usa CD transfectadas con ARNm de hTERT es muy potente.

Los resultados anteriores también demuestran que los linfocitos T de esta paciente, capaces de reconocer un péptido hTERT de 30 meros que abarca dos de los péptidos de 15 meros y uno de 9 meros, producen tres citocinas asociadas a Th1 simultáneamente. Este tipo de multifuncionalidad ha demostrado previamente que brinda una mejor protección contra la infección. Darrah et al, 2007 demostraron que el grado de protección contra la infección por *Leishmania major* en ratones vacunados se predice por la frecuencia de las linfocitos T CD4+ que producen simultáneamente interferón-γ (IFN-γ, interleucina-2 y TNF-α).

El curso clínico muy inusual de esta paciente indica que la vacunación y la respuesta inmunitaria resultante pueden haber tenido un impacto sobre el tumor y las metástasis. Esto es altamente concebible ya que se ha demostrado que la vacuna de CD con ARNm de hTERT provocó una respuesta inmunitaria amplia y compuesta contra hTERT. Como resultado, un ataque inmunitario sobre las células tumorales restantes puede haber implicado la muerte directa de las células tumorales por LTC específicos de hTERT, efectos de la producción de citocinas de linfocitos T auxiliares (IFN-γ, TNF-α) sobre las células cancerosas y el estroma asociado al tumor y la neovascularización tumoral y amplificación de una respuesta inmunitaria espontánea en curso contra otros antígenos tumorales presentes en el adenocarcinoma. Esto puede ocurrir cuando los linfocitos Th específicos para hTERT se encuentran con células presentadoras de antígeno positivas para MHC de clase II que han captado antígenos tumorales *in situ* o en los ganglios linfáticos que drenan el tumor.

Ejemplo 2

Se vacunó a un paciente con cáncer de pulmón en estadio IV con CD autólogas derivadas de monocitos transfectadas con ARNm que codifica hTERT para investigar la seguridad, la tolerabilidad y la respuesta inmunitaria antes del inicio de un nuevo ensayo clínico de fase I/II. El paciente recibió primero cuatro vacunas semanales seguidas de vacunas mensuales de refuerzo de 5×10^6 CD inyectadas por vía intradérmica. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes de las cuatro vacunas convencionales, después de 5 semanas, 12 semanas y mensualmente a partir de entonces. Las PBMC descongeladas se estimularon *in vitro* con CD transfectadas. Los ensayos de proliferación de linfocitos T se realizaron con CD transfectadas irradiadas y transfectadas de forma simulada como CD control. Además, Los linfocitos T CD8+ específicos de hTERT se monitorizaron mediante tinción con pentámeros. El tratamiento fue bien tolerado con efectos secundarios menores y el paciente experimentó una supervivencia prolongada (72 semanas) en comparación con lo que se esperaría (12 semanas). El paciente mostró una proliferación específica de linfocitos T en respuesta a las CD cargadas con ARNm *in vitro* después de la vacunación. Se detectaron poblaciones estables de linfocitos T CD8+ específicos de hTERT mediante tinción con pentámeros en muestras posteriores a la vacunación. Las muestras de diferentes momentos después de la vacunación se analizaron adicionalmente contra un grupo de 24 péptidos hTERT solapantes y se detectaron respuestas de linfocitos T contra múltiples péptidos (Figura 12). Las respuestas de los linfocitos T a estos epítomos también se han identificado tanto en pacientes con cáncer no vacunados como en pacientes con cáncer previamente vacunados con el péptido de telomerasa GV1001 (SEQ ID NO: 10), lo que indica un alto grado de inmunogenicidad y promiscuidad de HLA. Estas experiencias clínicas en los Ejemplos 1 y 2 muestran que la vacunación con CD transfectadas con ARNm de hTERT es segura y capaz de inducir respuestas inmunitarias fuertes a varios epítomos de telomerasa de linfocitos T tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+.

Ejemplo 3

Los péptidos de la enzima telomerasa adecuados para provocar respuestas de linfocitos T se identificaron y

clasificaron mediante el examen de datos de varios pacientes vacunados (vacunados con el péptido GV1001 o con células dendríticas transfectadas con ARNm que codifica hTERT) y un paciente con cáncer no vacunado, para identificar péptidos que podrían inducir respuestas inmunitarias antitumorales útiles. En la Tabla 9 se proporciona un resumen de los pacientes seleccionados, su estado de vacunación y su respuesta clínica. En un paciente vacunado con GV1001 (SEQ ID NO: 10), la respuesta de los linfocitos T al péptido 660-689 (30-meros) (SEQ ID NO: 1) es incluso más fuerte que al propio péptido de la vacuna en ciertos momentos (ver Figura 3), pero también los otros pacientes muestran respuestas inmunitarias fuertes a este péptido. Los péptidos identificados se exponen en la Tabla 1. Las respuestas de los linfocitos T contra estos péptidos no se encontraron en ninguno de los seis donantes de sangre normales que se analizaron para determinar su reactividad.

Tabla 1

SEQ ID NO:	Nombre del Péptido	Secuencia Peptídica	Nombre del Péptido Anterior	Número de aminoácidos en el péptido
1	660-689	ALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRA	719-20	30
2	663-677	SVLNYERARRPGLLG	719	15
3	674-683	GLLGASVLGL	720GLL	10
4	615-624	ALLTSRLRFI	615ALL	10
5	613-621	RPALLTSRL	613RPA	9
6	653-661	RLTSRVKAL	728RLT	9
7	691-705	RTFVLRVRAQDPPE	725	15
8	653-667	RLTSRVKALFSVLNY	718	15
9	651-665	AERLTSRVKALFSVL	728	15

Los clones de linfocitos T específicos para todos los péptidos de 15 o 30 aminoácidos que se muestran en la Tabla 1 también se han obtenido de pacientes. Se ha demostrado que estos clones reconocen péptidos procesados de manera natural (datos no mostrados) y responden a concentraciones muy bajas de péptidos de hasta 10 ng/ml (véase la Figura 4), lo que significa que tienen una alta afinidad por su diana. Esto es importante para poder inducir una fuerte respuesta inmunitaria *in vivo* donde las concentraciones de péptidos son más bajas.

El polipéptido de 30 meros de la SEQ ID NO: 1 ha mostrado reactividad en casi todos los pacientes con cáncer probados y, por lo tanto, parece muy inmunogénico. Este péptido contiene ambos motivos que pueden ser reconocidos por los linfocitos T CD4+ auxiliares como la vacuna GV1001 (SEQ ID NO: 10) y también motivos reconocibles por los linfocitos T CD8+ citotóxicos (LTC). Ambos tipos de respuestas se han detectado *in vitro* en linfocitos T de pacientes estimulados con el péptido.

Utilizando reactivos marcados con fluorocromo (pentámeros) capaces de unir linfocitos T CD8+ específicos para los péptidos de 9 o 10 meros mencionados anteriormente, se ha detectado la presencia de estas células en numerosos pacientes con cáncer, principalmente vacunados con GV1001 (SEQ ID NO: 10). Estos péptidos de 9 o 10 meros se reconocen cuando se presentan sobre moléculas HLA-A2 (Figura 5) que están presentes en aproximadamente el 50 % de la población caucásica y sobre moléculas HLA-B7 (Figura 6) presentes en el 20 % de la misma población, lo que significa que juntos cubren a la mayoría de la población caucásica.

Además, los péptidos de 15 y 30 meros enumerados en la Tabla 1 muestran reactividad en casi todos los pacientes evaluados, lo que significa que son promiscuos con respecto a los alelos HLA de clase II sobre en los que se presentan y que son aplicables a casi toda la población sin ningún tipo de necesidad de selección de HLA (véase la Tabla 2).

Tabla 2

Alelo HLA de clase II	Frecuencia en Caucásicos	Clones específicos	Especificidad de péptidos	Pacientes	Cáncer
DR*01	22,6 %	líneas de linfocitos T	663-677	2	Melanoma maligno
DR*04	33,9 %	3	653-667, 663-677	3	Melanoma maligno
DR*07	30,1 %	3	Parte de 660-689	1	Cáncer de colon, Schroers et al, 2003
DR*08	4,3 %	>85	663-677	2	Melanoma Maligno y Cáncer de pulmón
DR*14	2,9 %	6 clones	660-689	2	Cáncer de colon, Cáncer de pulmón

Además de inducir reactividad en pacientes vacunados con GV1001 (SEQ ID NO: 10), estos péptidos también han inducido respuestas de linfocitos T en células de un paciente con cáncer de pulmón y un paciente con cáncer de páncreas vacunados con células dendríticas transfectadas con ARNm de hTERT. El ARNm utilizado no proporcionará la traducción de la proteína hTERT de longitud completa, pero cubre la mayor parte, y los péptidos enumerados en la Tabla 1 inducen algunas de las respuestas más fuertes en estos pacientes.

Ejemplo 4

Se determinaron las respuestas de linfocitos T a una biblioteca de péptidos hTERT (incluidos los polipéptidos de la Tabla 1) para linfocitos T de 5 pacientes además de los pacientes indicados en los Ejemplos 1 y 2. Los métodos fueron los mismos que se describieron previamente en el Ejemplo 1 o en Bernhardt et al 2006. En resumen, Las PBMC de varios momentos durante la vacunación se estimularon con la biblioteca de péptidos hTERT solapantes antes de probar respuestas de linfocitos T específicos en ensayos de proliferación. Los resultados se muestran en las Figuras 7 a 13. En la Tabla 3 se muestra un listado completo de péptidos.

Tabla 3

SEQ ID NO:	Posición en hTERT Secuencia de Aminoácidos	Secuencia peptídica	Nombre del Péptido Anterior	Número de aminoácidos en la secuencia del péptido
42	563-577	VTETTFQKNRLFFYR	710	15
43	573-587	LFFYRKSVWSKLQSI	711	15
44	583-597	KLQSIGIRQH LKRVQ	712	15
45	603-617	EAEVRQHREARPALL	713	15
46	613-627	RPALLTSRLRFIPKP	714	15
47	623-637	FIPKPDGLRPVNMMD	715	15
48	643-657	RTFRREKRAERLT SR	717	15
49	653-667	RLTSRVKALF SVLNY	718	15
2	663-677	SVLNYERARRPGLLG	719	15
50	683-697	LDDIHRWRTFVLRV	721	15
51	693-707	FVLRVRAQDPPELY	722	15
52	721-735	PQDRLTEVIASIIKP	723	15
53	578-592	KSVWSKLQSIGIRQH	724	15
7	691-705	RTFVLRVRAQDPPE	725	15
9	651-665	AERLT SRVKALF SVL	728	15
54	593-608	LKRVQLRELSEAEVRQ	731	16
1	660-689	ALF SVLNYERARRPGLLGASV LGLDDIHR	719-20	30
3	674-683	GLLGASV LGL	720GLL	10
6	653-661	RLTSRVKAL	728RLT	9
4	615-624	ALL TSRLRFI	615ALL	10
5	613-621	RPALLTSRL	613RPA	9

Los histogramas en las Figuras 7 a 13 muestran respuestas contra la biblioteca de péptidos solapantes hTERT en 7 pacientes (la paciente con cáncer de páncreas fue la indicada en el Ejemplo 1).

El péptido 613-627 tiene una secuencia muy similar a GV1001 (SEQ ID NO: 10) y se supone que es reconocido por las mismas células que reconocen GV1001, pero el péptido 613-627 no es idéntico al péptido de la vacuna.

Los últimos dos pacientes no se han probado para determinar las respuestas contra el 660-689 de 30 meros (SEQ ID NO: 1) ya que este péptido se sintetizó después de las pruebas. El péptido de la SEQ ID NO: 1 dio respuestas muy fuertes en el paciente con cáncer de pulmón vacunado con GV1001. El 75 % de los clones de linfocitos T

derivados del cultivo con este péptido fueron específicos, lo que indica que este clon está presente en el paciente con una elevada frecuencia. Este es el mismo paciente con cáncer de pulmón cuyos linfocitos T CD8+ específicos para hTERT se muestran en el histograma de la Figura 6.

- 5 Como los pacientes probados (excepto el paciente no vacunado que se muestra) han sido seleccionados debido a sus evoluciones clínicas extraordinarias, las fuertes respuestas detectadas contra los péptidos enumerados en la Tabla 1 indican que estos péptidos son epítomos clínicamente relevantes.

Ejemplo 5

- 10 La secuencia del polipéptido de la SEQ ID NO: 1 (el 660-689 de 30 meros) se analizó en busca de fragmentos inmunogénicos predichos para unirse a diferentes alelos HLA de clase I (la predicción se realiza utilizando la base de datos SYFPEITHI para ligandos de MHC y motivos peptídicos). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

15 Tabla 4

SEQ ID NO:	Secuencia Peptídica	Posición del Péptido	Número de aminoácidos	Unión prevista a alelos HLA de clase I
3	GLLGASVLGL	674-683	10	HLA-A*0201, HLA-A*03
17	VLGLDDIHR	680-689	10	HLA-A*0201,
18	GASVLGLDDI	677-686	10	HLA-A*0201,
19	ALFSVLNYER	663-672	10	HLA-A*0201, HLA-A*03, HLA-A*1101
20	SVLNYERARR	663-672	10	HLA-A*03, HLA-A*1101, HLA-A*6801
21	SVLGLDDIHR	679-688	10	HLA-A*03, HLA-A*1101, HLA-A*6801
22	FSVLNYERAR	662-671	10	HLA-A*1101
23	NYERARRPGL	677-675	10	HLA-A*2402
24	YERARRPGLL	667-676	10	HLA-B*4402, HLA-B*18
25	RPGLLGASVL	672-681	10	HLA-B*0702, HLA-B*5101
26	ERARRPGLL	668-676	9	HLA-A*26, HLA-B*1402, HLA-B*2705, HLA-B*2709, HLA-B*08
27	VLGLDDIHR	680-688	9	HLA-A*6801
28	SVLNYERAR	663-671	9	HLA-A*6801, HLA-A*0
29	VLNYERARR	664-672	9	HLA-A*6801, HLA-A*03
30	ARRPGLLGA	670-678	9	HLA-B*1402, HLA_B*4501
31	PGLLGASVL	673-681	9	HLA-B*1402, HLA-B*5101, HLA-B*2705
12	LLGASVLGL	675-683	9	HLA-B*1402
11	YERARRPGL	667-675	9	HLA-B*18, HLA-B*37, HLA-B*4001, HLA_B*4402, HLA-B*4901, HLA-B*08
32	RRPGLLGAS	671-679	9	HLA-B*2705
33	ALFSVLNVE	660-668	9	HLA-A*0201,
34	GLLGASVLG	674-682	9	HLA-A*0201, HLA-A*03
35	SVLGLDDIH	679-687	9	HLA-A*03
36	ERARRPGL	668-675	8	HLA-B*1402, HLA-B*08
37	ARRPGLLG	670-677	8	HLA-B*1402
38	GLLGASVL	674-681	8	HLA-B*1402, HLA-B*08
39	RARRPGLL	669-676	8	HLA-B*5101, HLA-B*08
40	LGASVLGL	676-683	8	HLA-B*5101

Ejemplo 6

- 20 Se realizó una comparación de los pacientes estudiados en el Ejemplo 4. En resumen, se identificaron siete pacientes como respondedores clínicos después de un diagnóstico de cáncer y la vacunación con una vacuna de hTERT. Se identificaron estos pacientes basándose en una combinación de supervivencia prolongada y respuesta clínica. La respuesta clínica podría ser enfermedad estable (EE), respuesta parcial (RP) o respuesta completa (RC). Los pacientes con melanoma vacunados fueron diagnosticados con estadio IV al momento de la inclusión en el ensayo clínico, pero no tenían metástasis cerebrales. El paciente con cáncer de pulmón P5 fue diagnosticado con
- 25 estadio IV, cáncer de pulmón inoperable y el paciente con cáncer de colon P1 con cáncer de colon inoperable en etapa tardía. El paciente con cáncer de pulmón P6 era un paciente con cáncer de pulmón en estadio IV con una esperanza de vida de 12 semanas. El paciente con cáncer de páncreas P1 tenía cáncer de páncreas recurrente e inoperable y una esperanza de vida de 8-10 meses. Cuatro de los pacientes (designados P7-P8 con melanoma, P5 con cáncer de pulmón y P1 con cáncer de colon) habían sido vacunados con el péptido GV1001 (SEC ID NO: 10). El
- 30 quinto paciente (designado P6 con cáncer de pulmón) y el sexto paciente (designado P1 con cáncer de páncreas) habían sido vacunados con células dendríticas transfectadas con ARNm que codifica hTERT. El séptimo paciente, el paciente P9 con melanoma, no había sido vacunado en el momento del estudio y en su lugar desarrolló una respuesta espontánea después del desarrollo del cáncer. (Un octavo y último paciente también fue identificado como

un respondedor clínico, pero las muestras de este paciente no estaban disponibles para su estudio).

Las respuestas proliferativas de linfocitos T de cada paciente a una serie de péptidos se determinaron después como se explica en el Ejemplo 1. Los resultados se tabulan en la Tabla 5 y se muestran gráficamente en la Figura 14 en la que las designaciones de péptidos se mencionan en la Tabla 6 (los resultados para los péptidos 726 y GV1001 se muestran solo para comparación).

Tabla 5

Paciente	Péptidos hTERT					
	718	725	726	728	719-20	GV1001
P7 con Melanoma	4,8	4,9	5,8	3,2	44,5	76,5
P8 con Melanoma	6,3	2,8	0,9	1	5,7	13,2
P9 con Melanoma	4,2	5,7	3,7	5,9	6,9	1,7
P5 con cáncer de pulmón	0,8	1,1	31	1,2	44,5	20,1
P6 con cáncer de pulmón	2,1	0,8	0,6	0,7	2,5	7,1
P1 con cáncer de colon	2,6	20,6	4	13,9	27,2	105,1
P1 con cáncer de páncreas	1,3	2,5	2,5	1	17,1	2,2

Tabla 6

Nombre del Péptido Anterior	SEQ ID NO:
719-20	1
725	7
718	8
728	9
GV1001	10

Se observó que todos los pacientes respondieron a GV1001 (es decir, tenían SI > 2). Debido a los altos niveles de fondo causados por auto-MLC en los pacientes vacunados con células dendríticas (P7 con cáncer de pulmón y P1 con cáncer de páncreas), los valores de SI son bajos en comparación con los encontrados en otros pacientes.

Ejemplo 7

Se estudiaron cuatro pacientes que eran no respondedores clínicos tras un diagnóstico de cáncer de pulmón y una vacuna de péptidos GV1001 (SEQ ID NO: 10). Todos estos pacientes eran pacientes con cáncer de pulmón en estadio IV vacunados con GV1001. Estos pacientes fueron seleccionados al azar entre aquellos pacientes que tenían una respuesta inmunitaria contra GV1001 pero que aún experimentaban enfermedad progresiva y supervivencia a corto plazo en comparación con otros pacientes con una respuesta inmunitaria contra la vacuna. Las respuestas proliferativas de linfocitos T de cada paciente a una serie de péptidos se determinaron de la misma manera como en el Ejemplo 1, en un momento dado. También se muestra la respuesta máxima de cada paciente durante el período de estudio al péptido GV1001, lo que confirma que cada paciente respondió inmunitariamente a la vacuna GV1001.

Los resultados se tabulan en la Tabla 7 y se muestran gráficamente en la Figura 15 y las designaciones de péptidos se mencionan en la Tabla 6.

Tabla 7

Paciente	Péptidos hTERT						Respuesta máxima a GV1001
	718	725	726	728	719-20	GV1001	
P1 con cáncer de pulmón	1,2	1,3	1,2	0,8	1	0,9	60,95
P2 con cáncer de pulmón	0,9	1	0,8	0,6	1,1	122,8	122,8
P3 con cáncer de pulmón	1,1	1,2	1,1	0,8	0,9	1,4	161,6
P4 con cáncer de pulmón	1,1	0,4	1,1	0,7	1,5	1,2	13,3

Los cuatro pacientes mostraron una respuesta muy baja o nula a los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 7, 8 y 9.

5 Ejemplo 8

Se estudiaron seis pacientes que eran no respondedores clínicos tras un diagnóstico de melanoma y una vacuna de péptido GV1001 (SEQ ID NO: 10). Todos estos pacientes eran pacientes con melanoma en estadio IV e incluidos en el mismo ensayo de vacunación GV1001 que los pacientes con melanoma P7 y P8 que fueron supervivientes a largo plazo (véase el Ejemplo 6). Estos pacientes fueron seleccionados al azar entre aquellos pacientes que mostraron una respuesta inmunitaria contra la vacuna, pero aun así experimentaron una supervivencia a corto plazo. Cinco de los pacientes también experimentaron una enfermedad progresiva y un paciente, denominado P3 con Melanoma, experimentó cierta estabilización de la enfermedad, pero aun así tuvo una corta supervivencia. Las respuestas proliferativas de linfocitos T de cada paciente a una serie de péptidos se determinaron de la misma manera como en el Ejemplo 1, en un momento dado. También se muestra la respuesta máxima de cada paciente durante el período de estudio al péptido GV1001, lo que confirma que cada paciente respondió inmunitariamente a la vacuna GV1001.

Los resultados se tabulan en la Tabla 8 y se muestran gráficamente en la Figura 16 y las designaciones de péptidos se mencionan en la Tabla 6.

Tabla 8

Paciente	Péptidos hTERT						Respuesta máxima a GV1001
	718	725	726	728	719-20	GV1001	
P1 con Melanoma	0,9	0,9	0,9	0,8	1,6	1,4	26,0
P2 con Melanoma	0,8	1	1	0,6	5,3	0,9	38,7
P3 con Melanoma	0,6	0,7	0,5	0,5	0,3	1,8	3,7
P4 con Melanoma	1,1	1	1,2	0,8	1	1,2	10,7
P5 con Melanoma	7,1	1,2	1,9	0,9	1,9	25,2	35,4
P6 con Melanoma	0,8	4,8	n.t.	1,3	1,8	21,4	122,0

Los seis pacientes mostraron una respuesta muy baja o nula a los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 7, 8 y 9.

25 Conclusión de los Ejemplos 1 a 8

En la tabla 9 se proporciona un resumen de los pacientes estudiados en los Ejemplos 1 a 8. Todos los pacientes respondieron inmunológicamente al péptido GV1001. Los pacientes se clasificaron como respondedores clínicos o no respondedores clínicos basándose en su respuesta clínica, que incluía enfermedad estable (EE), regresión tumoral (RP o RC) y un tiempo de supervivencia inesperadamente largo. Tanto los respondedores clínicos como los no respondedores clínicos fueron seleccionados de los mismos o similares ensayos de vacunación.

Tabla 9

Paciente	Cáncer	Vacuna	Respuesta de linfocitos T específica de la vacuna en el momento probado	Supervivencia (Meses)	Respuesta Clínica	Respondedor Clínico
P4 con cáncer de pulmón	Cáncer de pulmón	GV1001	Sí	10	EP	No
P3 con cáncer de pulmón	Cáncer de pulmón	GV1001	Sí	20	EP	No
P1 con cáncer de pulmón	Cáncer de pulmón	GV1001	Sí	14	EP	No
P2 con cáncer de pulmón	Cáncer de pulmón	GV1001	Sí	6	EP	No
P4 con Melanoma	Melanoma	GV1001	Sí	8	EP	No
P6 con Melanoma	Melanoma	GV1001	Sí	8	EP	No
P5 con Melanoma	Melanoma	GV1001	Sí	12	EP	No
P1 con Melanoma	Melanoma	GV1001	Sí	10	EP	No
P3 con Melanoma	Melanoma	GV1001	Sí	10	EE	No
P2 con Melanoma	Melanoma	GV1001	Sí	9	EP	No
P7 con Melanoma	Melanoma	GV1001	Sí	65+	vivo, RP	Sí
P8 con Melanoma	Melanoma	GV1001	Sí	21	TTP aumentado, RP	Sí
P9 con Melanoma	Melanoma	Respuesta espontánea, no vacunado	Sí	30+	vivo, EE	Sí
P5 con cáncer de pulmón	Cáncer de pulmón	GV1001	Sí	106+	vivo, RC	Sí
P6 con cáncer de pulmón	Cáncer de pulmón	CD/ ARNm de hTERT	Sí	16	RP	Sí
P1 con cáncer de colon	Cáncer de colon	GV1001	Sí	80+	vivo, RC	Sí
P1 con cáncer de páncreas	Cáncer de páncreas	CD/ ARNm de hTERT	Sí	43+	vivo, RC	Sí
+ significa que el paciente todavía está vivo EP= Enfermedad progresiva EE= Enfermedad estable RP= Respuesta parcial RC= Respuesta completa TTP= tiempo de progresión						

Los datos presentados en este caso indican fuertemente que la administración de cualquiera de los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 9 inducirá respuestas de linfocitos T al péptido administrado en al menos algunos individuos. La

presencia de respuestas de linfocitos T a los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 9 en pacientes a los que se les han administrado otras vacunas de péptidos hTERT o células dendríticas transfectadas demuestra que los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 9 pueden unirse y presentarse por las moléculas MHC de los pacientes y que los pacientes tienen linfocitos T dentro de sus repertorios capaces de unir los péptidos cuando se presentan. Por lo tanto, cuando los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 9 se administran a individuos, cabe esperar respuestas de linfocitos T a los péptidos.

Además, los datos proporcionados en los Ejemplos 6 a 8 demuestran que las respuestas de los linfocitos T contra los péptidos hTERT de las SEQ ID NO: 1, 7, 8 y 9 descritos en el presente documento, están asociadas con respuestas clínicas favorables en pacientes con diferentes formas de cáncer. En varios supervivientes a corto plazo que habían sido tratados de la misma manera con una vacuna de hTERT y que habían respondido a esta vacuna, las respuestas a los péptidos hTERT de las SEQ ID NO: 1, 7, 8 y 9 solo se observaron esporádicamente. También cabe destacar que en algunos de estos supervivientes a corto plazo, la respuesta al péptido GV1001 fue fuerte. Se interpreta que estos resultados significan que la respuesta a un solo péptido (es decir, GV1001) por sí solo no es suficiente para proporcionar respuesta clínica/supervivencia a largo plazo, ya que en la mayoría de los pacientes con una respuesta inmunitaria a este péptido, la supervivencia fue corta.

Esto se confirma mediante el análisis de diagrama de dispersión que se muestra en la Figura 17 que compara el número de péptidos hTERT a los que los pacientes demostraron una respuesta inmunitaria con la duración de la supervivencia de los pacientes. Tal como puede observarse en la Figura 17, existe una clara correlación entre tiempos de supervivencia más largos y respuestas inmunitarias a un mayor número de péptidos hTERT.

Además, el análisis que se muestra en la Figura 18 demuestra que aquellos pacientes que respondieron contra 2 o más péptidos hTERT además de GV1001 tuvieron una mayor duración de supervivencia que fue estadísticamente significativa en comparación con aquellos pacientes que mostraron una respuesta inmunitaria a 0 o 1 péptido hTERT además de GV1001.

Asimismo, los datos divulgados en el presente documento proporcionan una fuerte evidencia que apunta a un papel crucial para los péptidos hTERT de las SEQ ID NO: 1, 7, 8 y 9 en las respuestas inmunitarias beneficiosas. Por lo tanto, la inmunización activa con estos nuevos péptidos debería inducir respuestas inmunitarias clínicamente relevantes en un mayor número de pacientes y, por lo tanto, dar como resultado una supervivencia prolongada en una mayor proporción de pacientes que la que se puede lograr mediante la vacunación con el péptido GV1001 solo.

Se demostró que las respuestas contra los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 7, 8 y 9 surgen de forma natural después de la vacunación con péptidos no relacionados en respondedores clínicos contrarios a los pacientes que no tienen buenos resultados clínicos. Se cree que el mecanismo detrás de esta inmunización natural es la presentación de estos péptidos por las células presentadoras de antígenos que han engullido las células tumorales muertas que portan hTERT y han procesado la proteína hTERT mediante su maquinaria proteolítica para producir una serie de péptidos hTERT procesados de forma natural que corresponden a los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 7, 8 y 9 descritas en el presente documento. La demostración de que muchos de los mismos péptidos son reconocidos por las linfocitos T tomados de pacientes que han sido inmunizados por células presentadoras de antígeno transfectadas con ARNm de hTERT (células dendríticas), y que estos pacientes lo han hecho excepcionalmente bien después de la vacunación, fortalecen aún más esta noción. Al reforzar o inducir estas respuestas mediante la vacunación con un péptido de la presente invención o un cóctel de dichos péptidos que ya han sido clínicamente validados, será posible inducir respuestas clínicas y una supervivencia prolongada en una proporción mucho mayor de pacientes.

Ejemplo 9

Los resultados de los Ejemplos 1 a 8 también se examinaron para determinar la combinación más eficaz de péptidos que, por lo tanto, sería adecuada para combinar para producir un cóctel de péptidos. Se observó que los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 9 tenían efectos complementarios por las siguientes razones.

Los motivos de unión a MHC de cada una de las SEQ ID NO: 1, 7 y 9 y los fragmentos inmunogénicos de las secuencias se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Péptido	Secuencia	Motivo de Unión a MHC
SEQ ID NO: 1	ALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRA	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
	SVLNYERARRPGLLG	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
	FSVLNYERARRPGLL	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
	ARRPGLLGASVLGLD	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
	RARRPGLLGASVLGL	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
	VLNYERARRPGLLGA	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
	RPGLLGASVLGLDDI	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
	VLNYERARRPGLLGA	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)

(continuación)

Péptido	Secuencia	Motivo de Unión a MHC
	GLLGASVLGL	LTC (HLA-A2, -B7)
	GLLGASVLG	LTC (HLA-A2, -B7)
	LLGASVLGL	LTC (HLA-A2, -B7)
	ALFSVLNVE	LTC (HLA-A2, -B7)
	RPGLLGASVL	LTC (HLA-A2, -B7)
	RPGLLGASV	LTC (HLA-A2, -B7)
SEQ ID NO: 7	RTFVLRVRAQDPPPE	Th (HLA-DR*01, 11, 15)
	RVRAQDPPPE	LTC (HLA-A3)
	FVLRVRAQD	LTC (HLA-A3)
SEQ ID NO: 9	AERLTSRVKALFSVL	Th (HLA-DR*03, 11)
	RLTSRVKAL	LTC (HLA-A2, -A3, -B44)
	RVKALFSVL	LTC (HLA-A2, -A3, -B44)
	AERLTSRVK	LTC (HLA-A2, -A3, -B44)
	ERLTSRVKAL	LTC (HLA-A2, -A3, -B44)

Como puede observarse en la Tabla 10, los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 9 y sus fragmentos inmunogénicos son capaces de unirse a una amplia gama de moléculas HLA que presentan epítomos de Th o LTC. Por lo tanto, estos péptidos son capaces de generar respuestas inmunitarias en una población de pacientes muy amplia.

Además, los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 9 tienen una inmunogenicidad comprobada en los pacientes respondedores clínicos indicados en el Ejemplo 6 y una respuesta inmunitaria relativamente mayor en los respondedores clínicos que en los no respondedores clínicos.

Más específicamente, para el péptido de la SEQ ID NO: 1 hubo respuestas inmunitarias en 7/7 respondedores clínicos en comparación con las respuestas inmunitarias en 1/10 no respondedores clínicos. Varios de los supervivientes a largo plazo que respondieron también mostraron respuestas de LTC por análisis con pentámeros.

Para el péptido de la SEQ ID NO: 7 hubo respuestas inmunitarias en 5/7 respondedores clínicos en comparación con las respuestas inmunitarias en 1/10 no respondedores clínicos.

Para el péptido de la SEQ ID NO: 9 hubo respuestas inmunitarias en 3/7 respondedores clínicos en comparación con las respuestas inmunitarias en 0/10 no respondedores clínicos además de las respuestas de LTC mostradas por análisis con pentámeros en 3 de los pacientes, uno de ellos fue adicional a los 3 que muestran respuestas proliferativas.

En consecuencia, este análisis de los resultados demuestra que se espera que un cóctel de péptidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 9 tenga un alto nivel de eficacia en un amplio abanico de la población humana.

Referencias

Alldawi L, Takahashi M, Narita M, Ayres F, Tsukada N, Osman Y, Furukawa T, Aizawa Y (2005). Effect of prostaglandin E2, lipopolysaccharide, IFN-gamma and cytokines on the generation and function of fast-DC. *Cytotherapy* 7(2):195-202.

Aloysius MM, Mc Kechie AJ, Robins RA, Verma C, Eremin JM, Farzaneh F, Habib NA, Bhalla J, Hardwick NR, Sathaporn S, Sreenivasan T, El-Sheemy M, Eremin O. (2009). Generation *in vivo* of peptide-specific cytotoxic T cells and presence of regulatory T cells during vaccination with hTERT (class I and II) peptide-pulsed DCs. *J Transl Med.* 19 de marzo;7:18.

Beatty GL, Vonderheide RH. (2008) Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines.* Sep;7(7):881-7.

Bernhardt SL, Gjertsen MK, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Meo M, Buanes T, Gaudernack G. 2006. Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: A dose escalating phase I/II study. *Br J Cancer.* 95(11):1474-82.

Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Gaudernack G. 2006.

Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 55(12):1553-64.

Carpelan-Holmström M, Nordling S, Pukkala E, Sankila R, Lüttges J, Klöppel G, Haglund C. (2005). Does anyone

survive pancreatic ductal adenocarcinoma? A nationwide study rel-evaluating the data of the Finnish Cancer Registry. Gut. Mar;54(3):385-7.

Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, Hoff ST, Andersen P, Reed SG, Morris SL, Roederer M, Seder RA. (2007). Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major. Nat Med. Jul;13(7):843-50.

Domchek SM, Recio A, Mick R, Clark CE, Carpenter EL, Fox KR, DeMichele A, Schuchter LM, Leibowitz MS, Wexler MH, Vance BA, Beatty GL, Veloso E, Feldman MD, Vonderheide RH. 2007. Telomerase-specific T-cell immunity in breast cancer: effect of vaccination on tumor immunosurveillance. Cancer Res. 67(21):10546-55.

Ho WY, Nguyen HN, Wolfl M, Kuball J, Greenberg PD (2006). *In vitro* methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire. J Immunol Methods. Mar 20;310(1-2):40-52.

Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, Jungbluth A, Gnjjatic S, Thompson JA, Yee C. 2008. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. N Engl J Med. 358(25):2698-703.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science. 23 de diciembre;266(5193):2011-5.

Kyte JA, Mu L, Aamdal S, Kvalheim G, Dueland S, Hauser M, Gullestad HP, Ryder T, Lislerrud K, Hammerstad H, Gaudernack G. 2006. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. Cancer Gene Ther. 13(10):905-18.

Liu JP, Chen W, Schwarzer AP, Li H. (2009) Telomerase in cancer immunotherapy. Biochim Biophys Acta. Sep 12;7

Mu LJ, Gaudernack G, Saebøe-Larssen S, Hammerstad H, Tierens A, Kvalheim G. (2003). A protocol for generation of clinical grade mRNA-transfected monocyte-derived dendritic cells for cancer vaccines. Scand J Immunol. Nov;58(5):578-86.

Saebøe-Larssen S, Fossberg E, Gaudernack G. 2002. mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT). J Immunol Methods. 259(1-2): 191-203.

Schroers R, Huang XF, Hammer J, Zhang J, Chen SY. 2002. Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4+ T-helper cells. Cancer Res. 1 de mayo;62(9):2600-5.

Schroers R, Shen L, Rollins L, Rooney CM, Slawin K, Sonderstrup G, Huang XF, Chen SY. (2003).

Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes. Clin Cancer Res, 15 de oct;9(13):4743-55.

Shay JW. (1997). Telomerase in human development and cancer. J Cell Physiol. Nov;173(2):266-70.

Su Z, Dannull J, Yang BK, Dahm P, Coleman D, Yancey D, Sichi S, Niedzwiecki D, Boczkowski D, Gilboa E, Vieweg J. 2005. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. J Immunol. 174(6):3798-807.

Tanaka F, Yamaguchi H, Haraguchi N, Mashino K, Ohta M, Inoue H, Mori M. (2006) Efficient induction of specific cytotoxic T lymphocytes to tumor rejection peptide using functional matured 2 day-cultured dendritic cells derived from human monocytes. Int J Oncol. Nov;29(5):1263-8.

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. (2000). New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. J Natl Cancer Inst. 2 de febrero de 2000;92(3):205-16.

Welters MJ, Kenter GG, Piersma SJ, Vloon AP, Löwik MJ, Berends-van der Meer DM, Drijfhout JW, Valentijn AR, Wafelman AR, Oostendorp J, Fleuren GJ, Offringa R, Melief CJ, van der Burg SH. Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. Clin Cancer Res. 1 de enero de 2008;14(1):178-87.

Wobser M, Keikavoussi P, Kunzmann V, Weininger M, Andersen MH, Becker JC. (2006) Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted peptide derived from the universal tumor antigen survivin. *Cancer Immunol Immunother.* Oct;55(10): 1294-8.

- 5 Wong HH, Lemoine NR. 2008. Biological approaches to therapy of pancreatic cancer. *Pancreatology.* 8(4-5):431-61.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Oslo University Hospital HF
Gaudernack, Gustav
Rasmussen, Anne-Marie
Suso, Else Marit I
- 15 <120> Polipéptidos

<130> PN791356WO

<150> EP10250265.5
20 <151> 16-02-2010

<160> 62

<170 > PatentIn versión 3.3
- 25 <210> 1
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 1

Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu
1 5 10 15

Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala
20 25 30
- 35 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- 40 <400> 2

Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu Leu Gly
1 5 10 15
- 45 <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- 50 <400> 3

Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu
1 5 10
- 55 <210> 4
<211> 10
<212> PRT

ES 2 751 092 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

5 Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

15 Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

Arg Leu Thr Ser Arg Val Lys Ala Leu
1 5

25 <210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 7

Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu
1 5 10 15

<210> 8

35 <211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

40 Arg Leu Thr Ser Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr
1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

50 Ala Glu Arg Leu Thr Ser Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu
1 5 10 15

<210> 10

<211> 16

ES 2 751 092 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10
 5 Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10 15

 <210> 11
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 11

 Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu
 15 1 5

 <210> 12
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 12

 Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu
 25 1 5

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

 <400> 13

 Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 35 1 5

 <210> 14
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 14

 Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 45 1 5

 <210> 15
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 15

 Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu
 55 1 5

 <210> 16
 <211> 9
 55 <212> PRT

ES 2 751 092 T3

```

<213> Homo sapiens
<400> 16

      Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr
      1           5

5

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
    <400> 17

      Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala
      1           5           10

15

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens
    <400> 18

      Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile
      1           5           10

25

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens
    <400> 19

      Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg
      1           5           10

35

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
40 <213> Homo sapiens
    <400> 20

      Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
      1           5           10

45

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
    <400> 21

      Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
      1           5           10

50

<210> 22
<211> 10
<212> PRT

```

ES 2 751 092 T3

<213> *Homo sapiens*
 <400> 22
 5 Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23
 15 Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 24
 Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu Leu
 1 5 10
 25 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 25
 Arg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu
 1 5 10
 35 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26
 40 Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu Leu
 1 5
 45 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 27
 Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
 1 5

ES 2 751 092 T3

5	<210> 28 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 28	Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg 1 5
10	<210> 29 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 29	Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg 1 5
20	<210> 30 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 30	Ala Arg Arg Pro Gly Leu Leu Gly Ala 1 5
30	<210> 31 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 31	Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu 1 5
40	<210> 32 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 32	
45		Arg Arg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser 1 5
50	<210> 33 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 33	

ES 2 751 092 T3

	Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu
	1 5
5	<210> 34 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 34
10	Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly
	1 5
15	<210> 35 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 35
20	Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His
	1 5
25	<210> 36 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 36
30	Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu
	1 5
35	<210> 37 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 37
40	Ala Arg Arg Pro Gly Leu Leu Gly
	1 5
45	<210> 38 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 38
50	Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu
	1 5
55	<210> 39 <211> 8 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 39
	Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu Leu
	1 5

ES 2 751 092 T3

<210> 40
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 40

 Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu
 1 5
 10
 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

 <400> 41

 Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
 1 5
 20
 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 42

 Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr Arg
 1 5 10 15
 30
 <210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 43

 Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile
 1 5 10 15
 40
 <210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 44

 Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Leu Lys Arg Val Gln
 1 5 10 15
 45
 <210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*

 <400> 45

 Glu Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 55

ES 2 751 092 T3

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 46

 Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 10 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 47

 Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp
 1 5 10 15
 20 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 48

 Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser Arg
 1 5 10 15
 30 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 49

 Arg Leu Thr Ser Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr
 1 5 10 15
 35 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 50

 Leu Asp Asp Ile His Arg Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val
 1 5 10 15
 45 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 51

 Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu Leu Tyr
 1 5 10 15
 55 <210> 52

ES 2 751 092 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 52
 Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro
 1 5 10 15
 10 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 53
 Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
 1 5 10 15
 20 <210> 54
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 54
 Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln
 1 5 10 15
 25 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 55
 Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His
 1 5 10 15
 30 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 56
 Arg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile
 1 5 10 15
 35 <210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 57
 Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
 1 5 10 15
 40 <21D> 58
 <211> 15
 45
 50
 55

ES 2 751 092 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 58

5

Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu
1 5 10 15

<210> 59

<211> 15

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

15

His Arg Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp
1 5 10 15

<210> 60

<211> 15

20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

25

Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
1 5 10 15

<210> 61

<211> 15

30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 61

Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu Leu Tyr Phe
1 5 10 15

35

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 62

Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el polipéptido tiene menos o igual a 80 o 50 o igual a 30 aminoácidos de longitud.

3. Una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.

4. Un cóctel de polipéptidos que comprende al menos dos polipéptidos diferentes, en donde los al menos dos polipéptidos diferentes comprenden un cóctel de polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en:

i) un cóctel de: un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8; y un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 10,

ii) cóctel de: un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7; y un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9 y

iii) cóctel de: un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8; y un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9

en donde cada polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

5. Un cóctel de moléculas de ácido nucleico que comprende al menos dos moléculas de ácido nucleico diferentes, en donde las al menos dos moléculas de ácido nucleico diferentes comprenden un cóctel de moléculas de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en:

i) un cóctel de: una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8; y una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 10,

ii) un cóctel de: una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7; y una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9 y

iii) un cóctel de: una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1; una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8; y una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9

en donde cada polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

6. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en medicina.

7. Un polipéptido para su uso en medicina que comprende una secuencia seleccionada de: las SEQ ID NO: 2, 7 u 8, en donde el polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

8. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en medicina.

9. Una molécula de ácido nucleico para su uso en medicina en donde la molécula de ácido nucleico consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 2 u 8, en donde el polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

10. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, un cóctel de polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 4 o un cóctel de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 y un adyuvante, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otro ingrediente terapéutico.

11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 en donde el polipéptido, la molécula de ácido nucleico, el cóctel de polipéptidos o el cóctel de moléculas de ácido nucleico están presentes en una cantidad de entre 1 y 500 µg.

12. Una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde el polipéptido, la molécula

de ácido nucleico, un polipéptido del cóctel de polipéptidos o una molécula de ácido nucleico del cóctel de moléculas de ácido nucleico están acoplados a un vehículo inmunogénico.

5 13. Una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde el polipéptido o un polipéptido del cóctel de polipéptidos están unidos a una sustancia adicional.

10 14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la sustancia adicional se selecciona del grupo que consiste en: un lípido, un azúcar, una cadena de azúcar, un grupo acetilo, un polímero natural y un polímero sintético.

15 15. Una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde el polipéptido o un polipéptido del cóctel de polipéptidos tienen la forma de un conjugado de lipopéptido.

16. Un cóctel de polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 4, un cóctel de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 para su uso en medicina.

20 17. Un polipéptido, una molécula de ácido nucleico, un cóctel de polipéptidos, un cóctel de moléculas de ácido nucleico, una composición farmacéutica o un polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o 16 para su uso en el tratamiento o profilaxis de cáncer.

25 18. Un cóctel de polipéptidos que comprende al menos dos polipéptidos diferentes, que comprende las secuencias selecciona del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 2 o 7, en donde cada polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

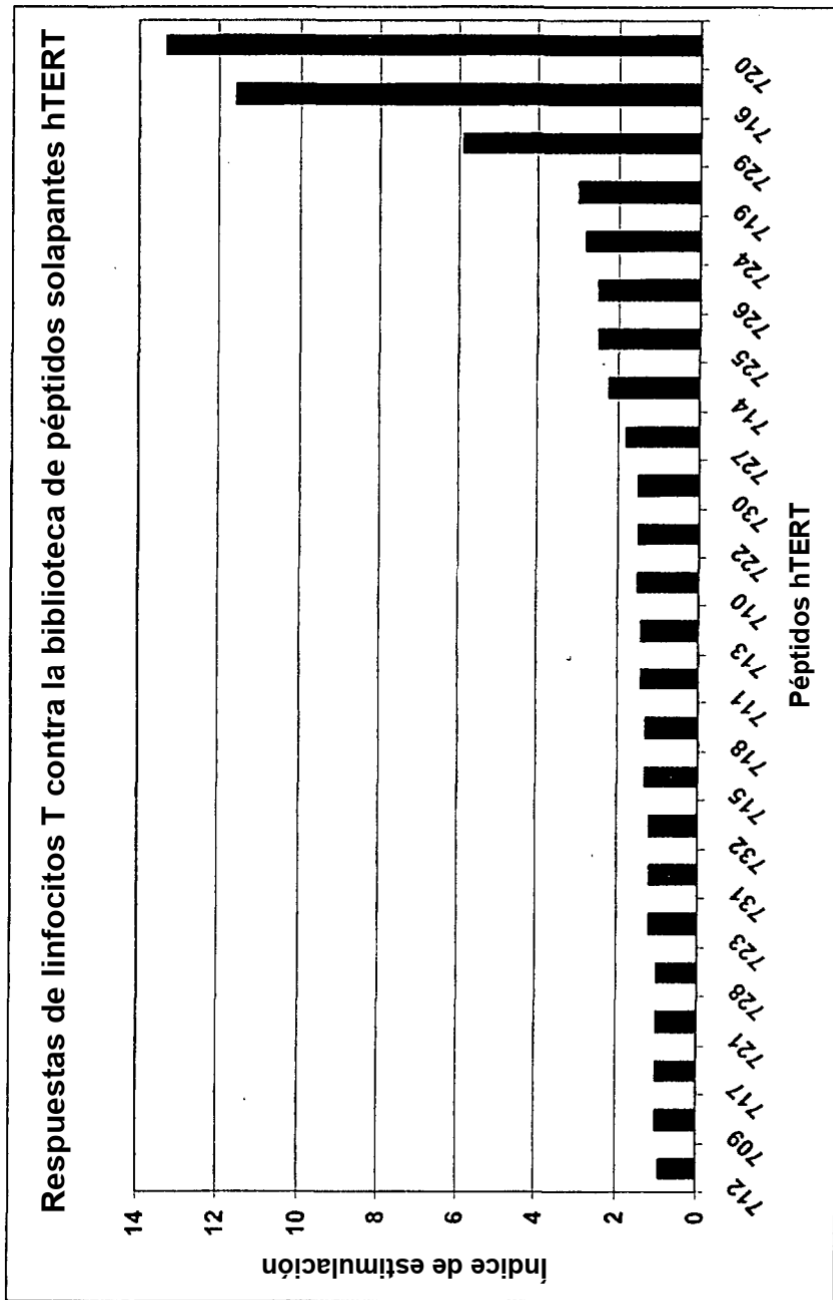


Figura 1

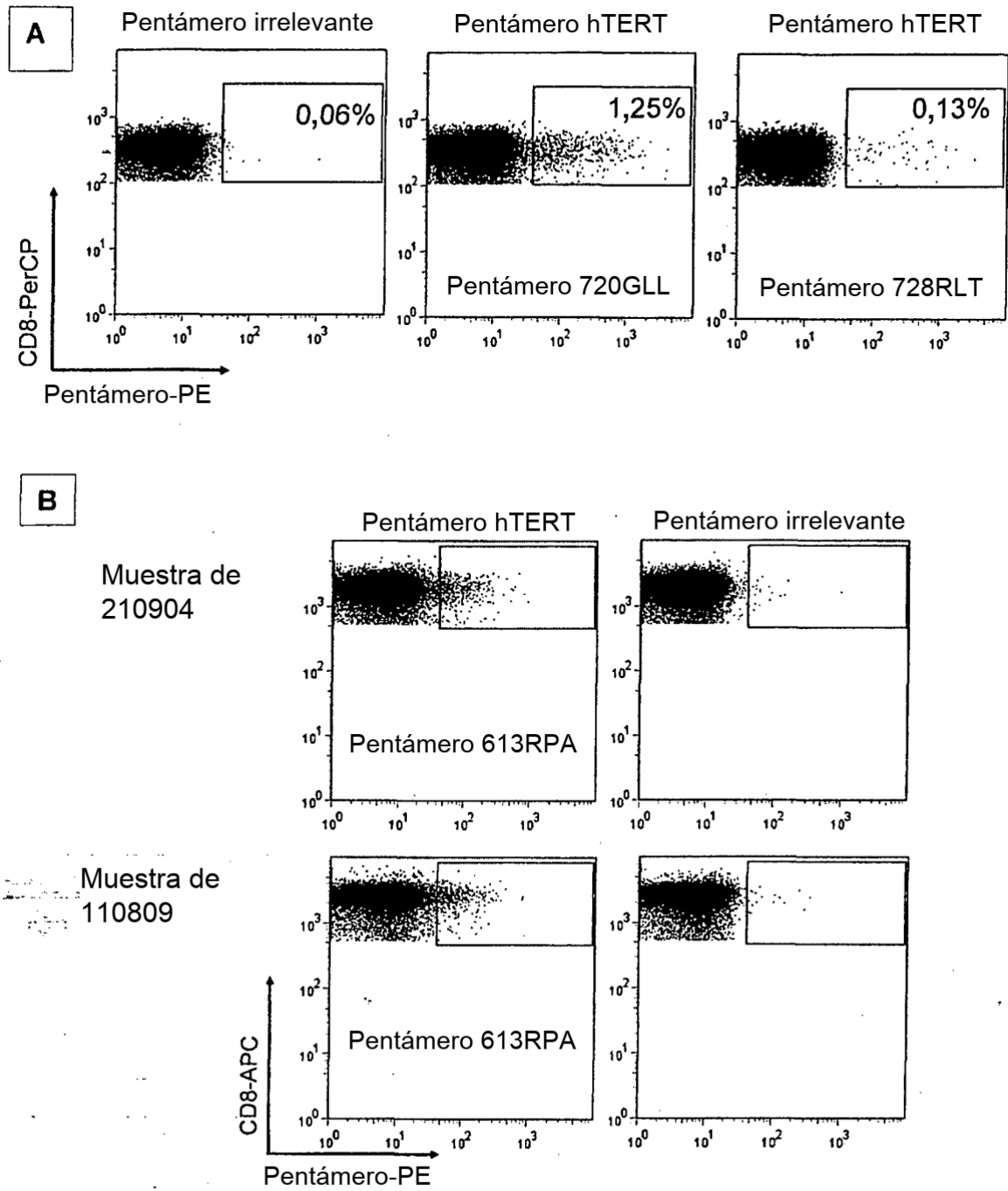


Figura 2

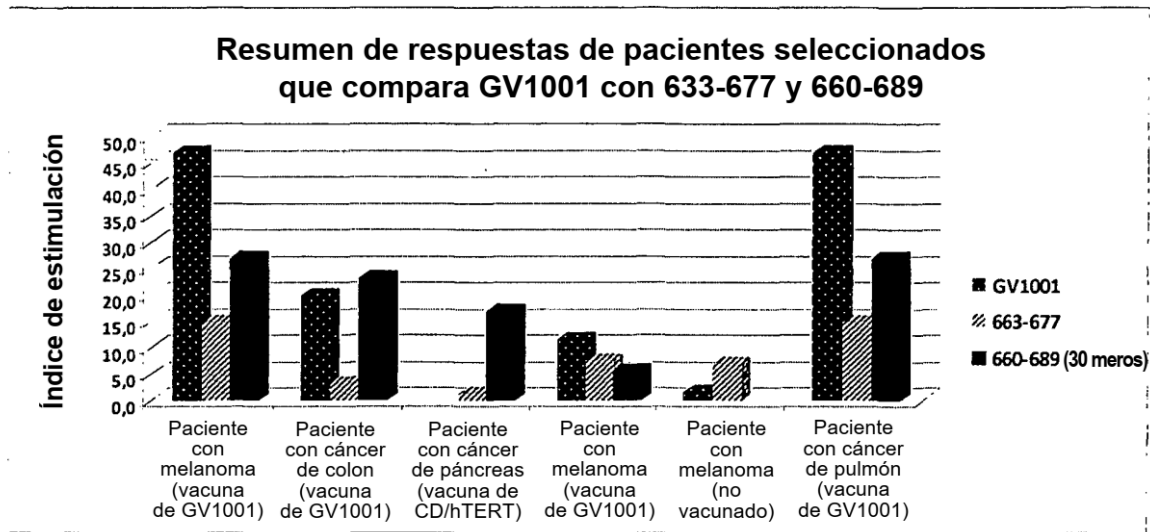


Figura 3

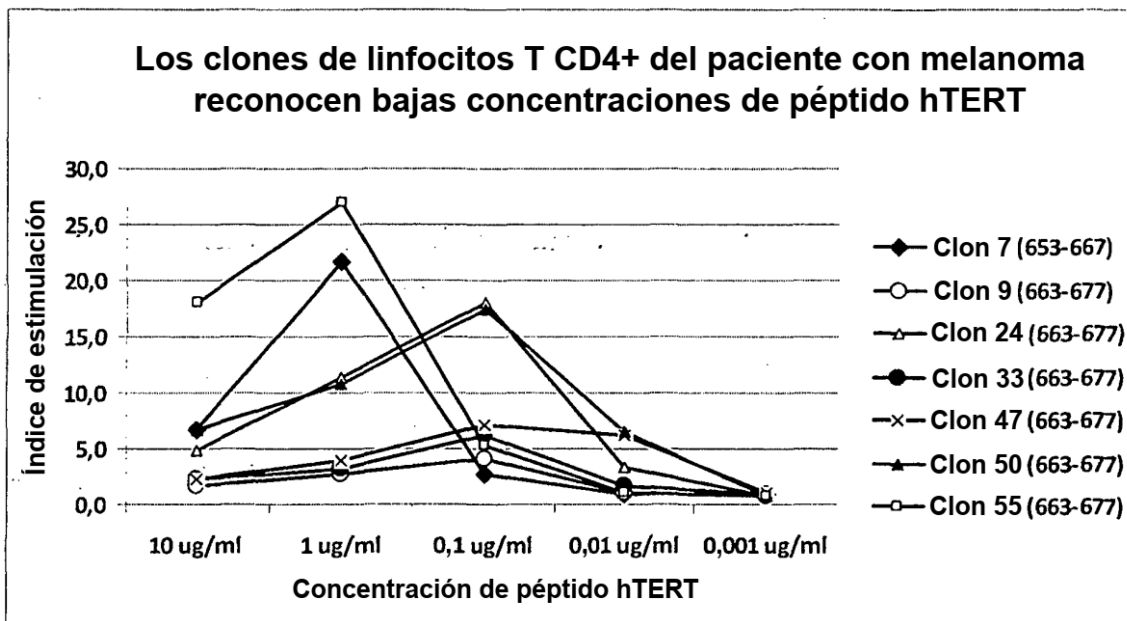


Figura 4

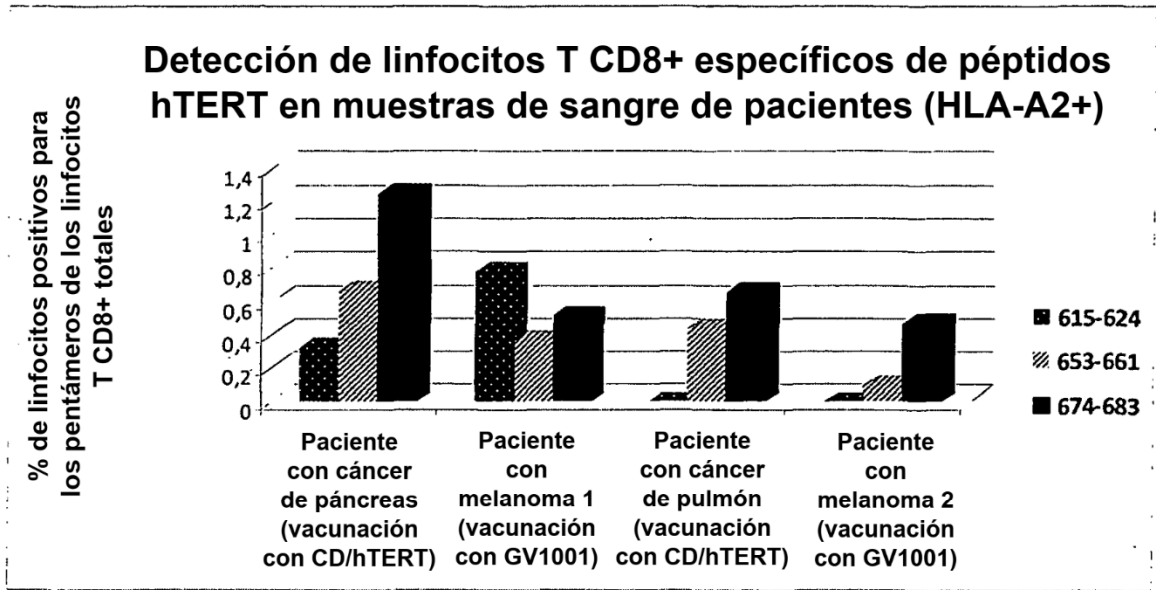


Figura 5

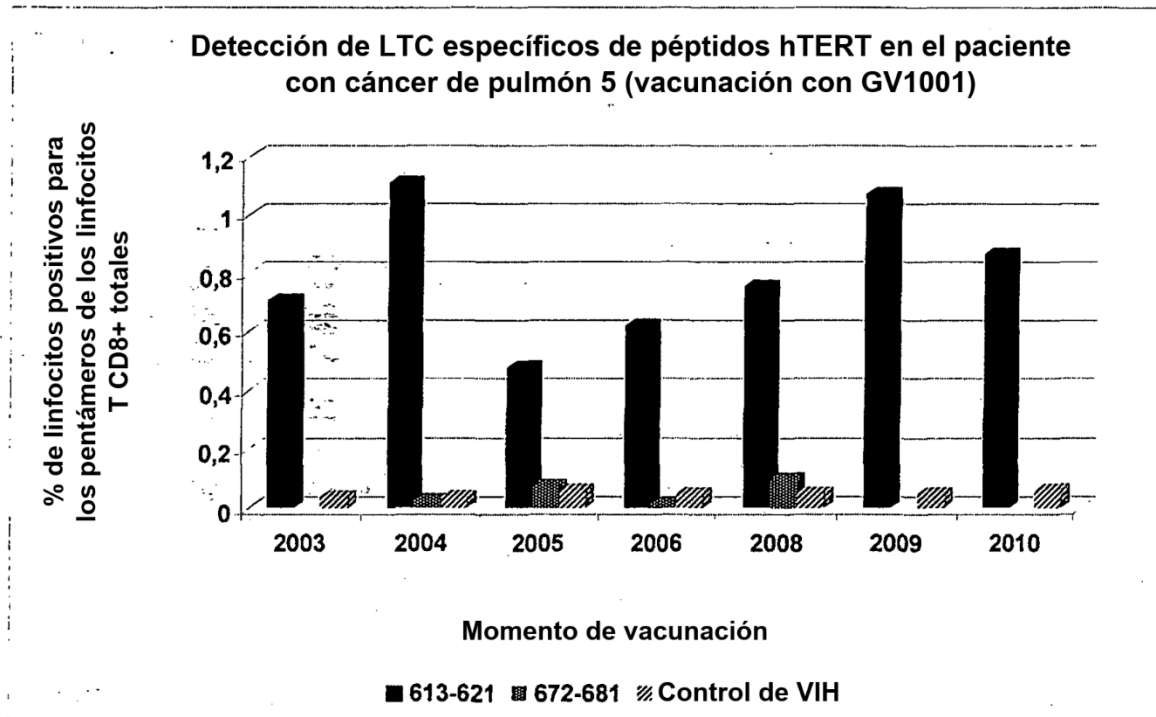


Figura 6

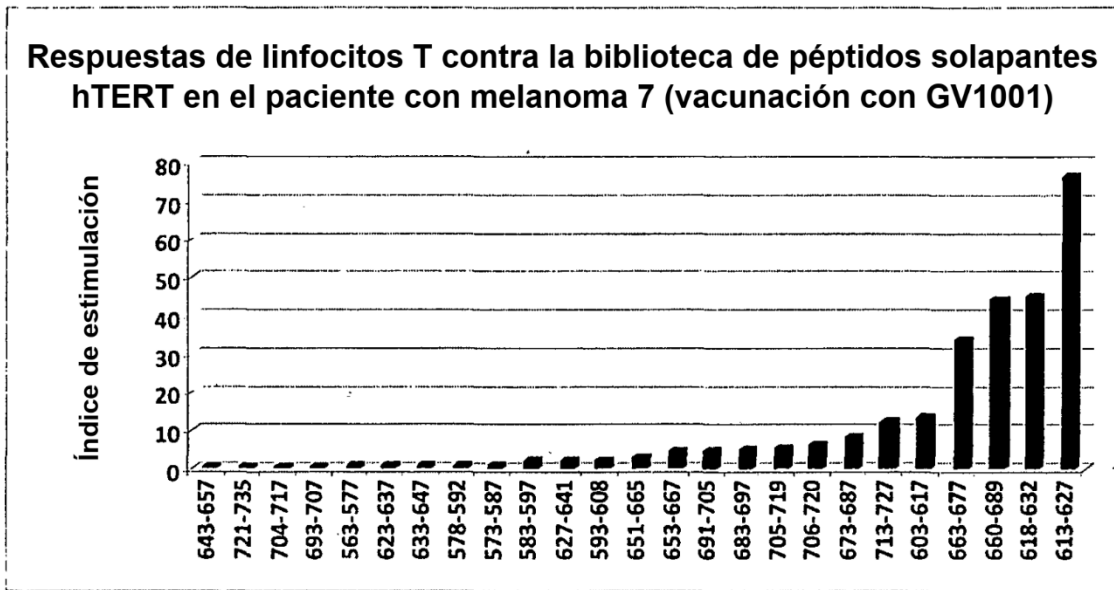


Figura 7

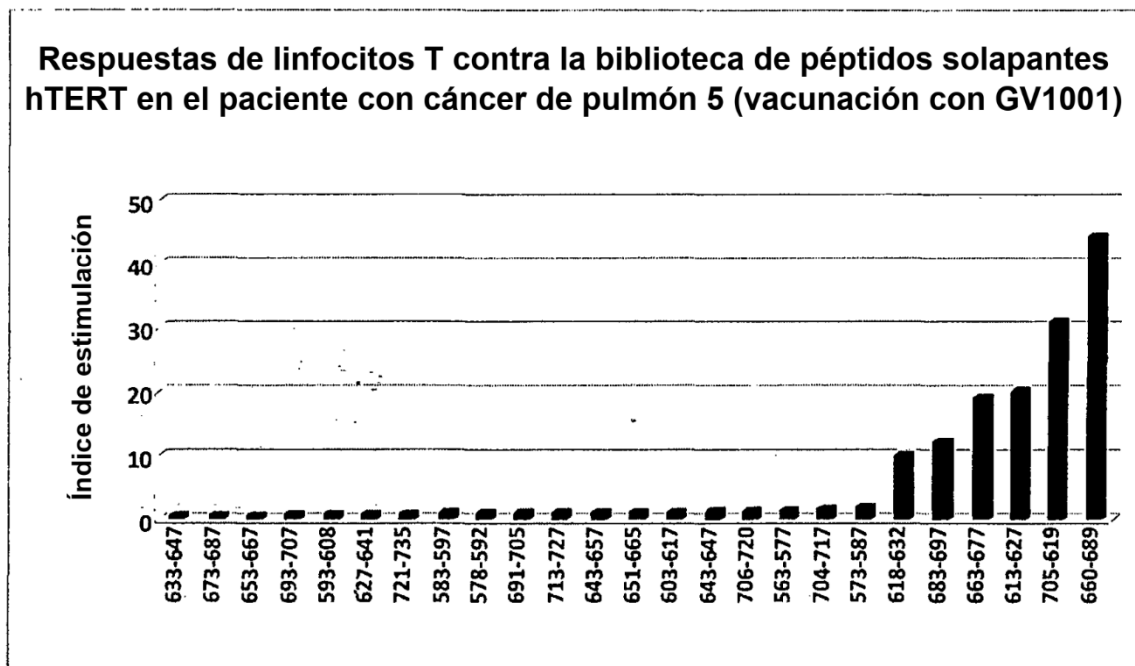


Figura 8

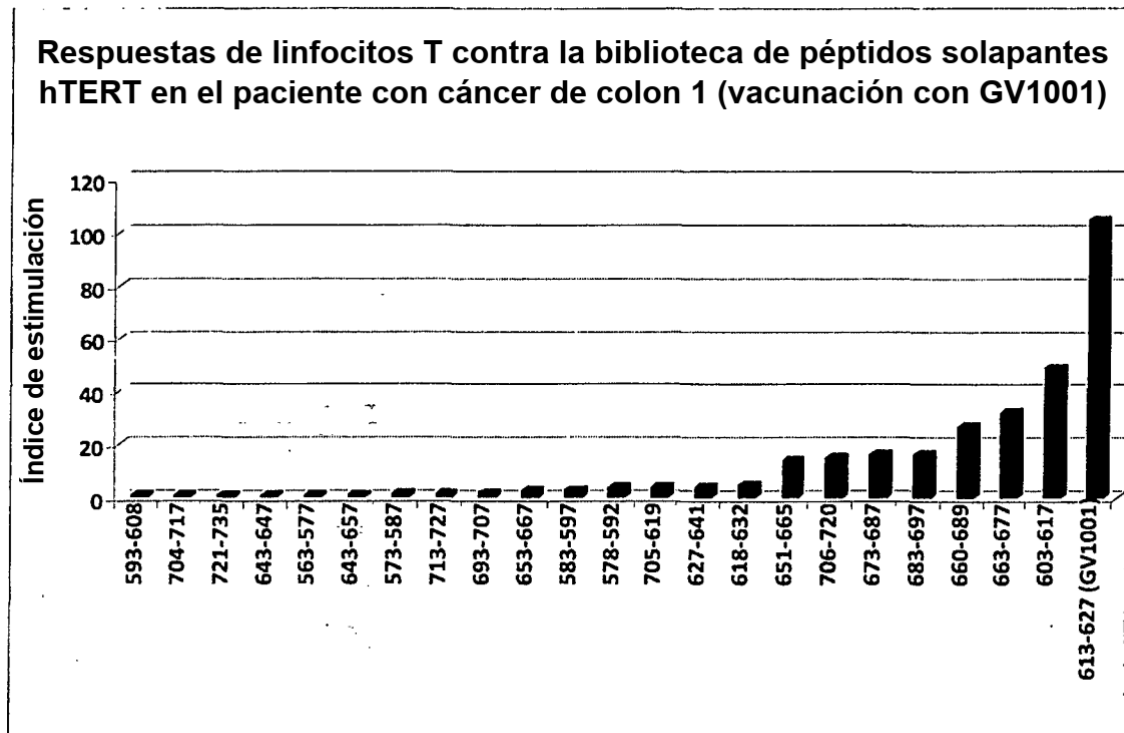


Figura 9

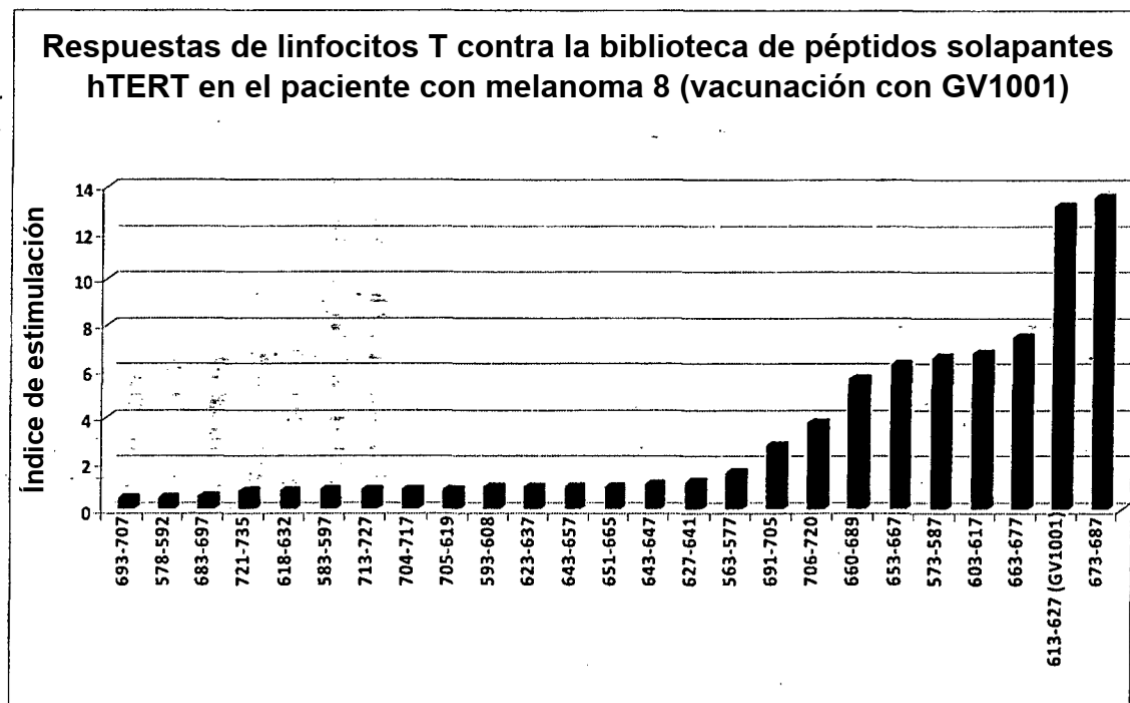


Figura 10

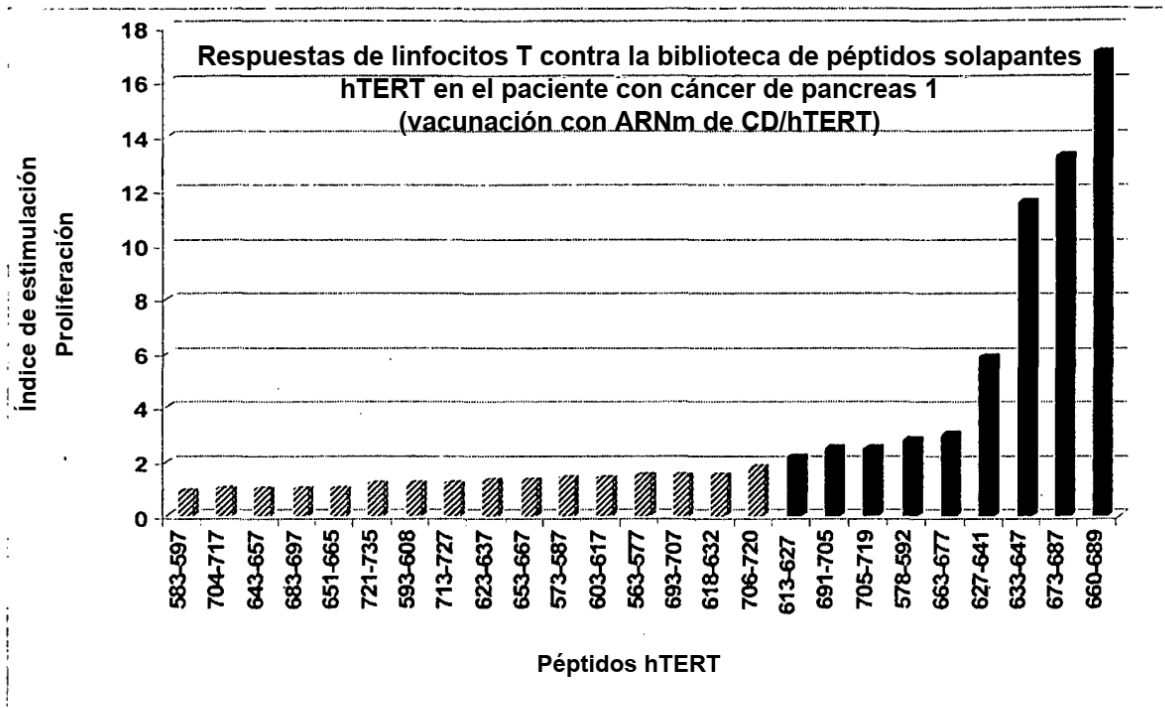


Figura 11

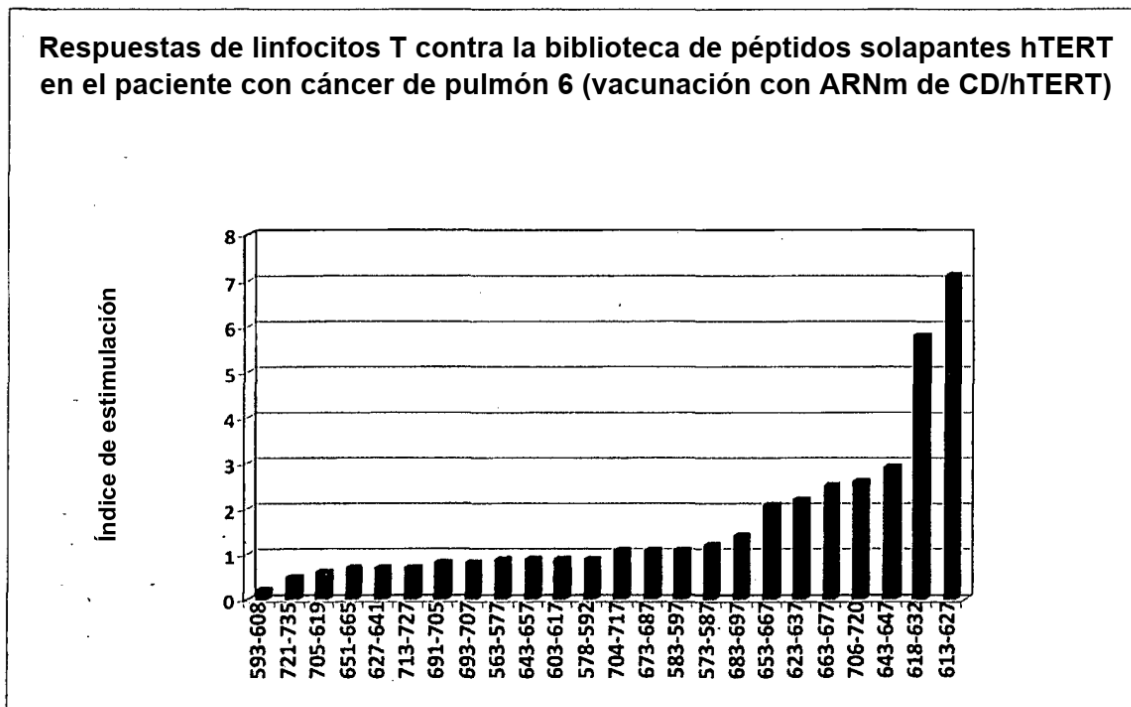


Figura 12

**Respuestas de linfocitos T contra la biblioteca de péptidos solapantes
hTERT en el paciente con melanoma 9 (respuesta espontánea)**

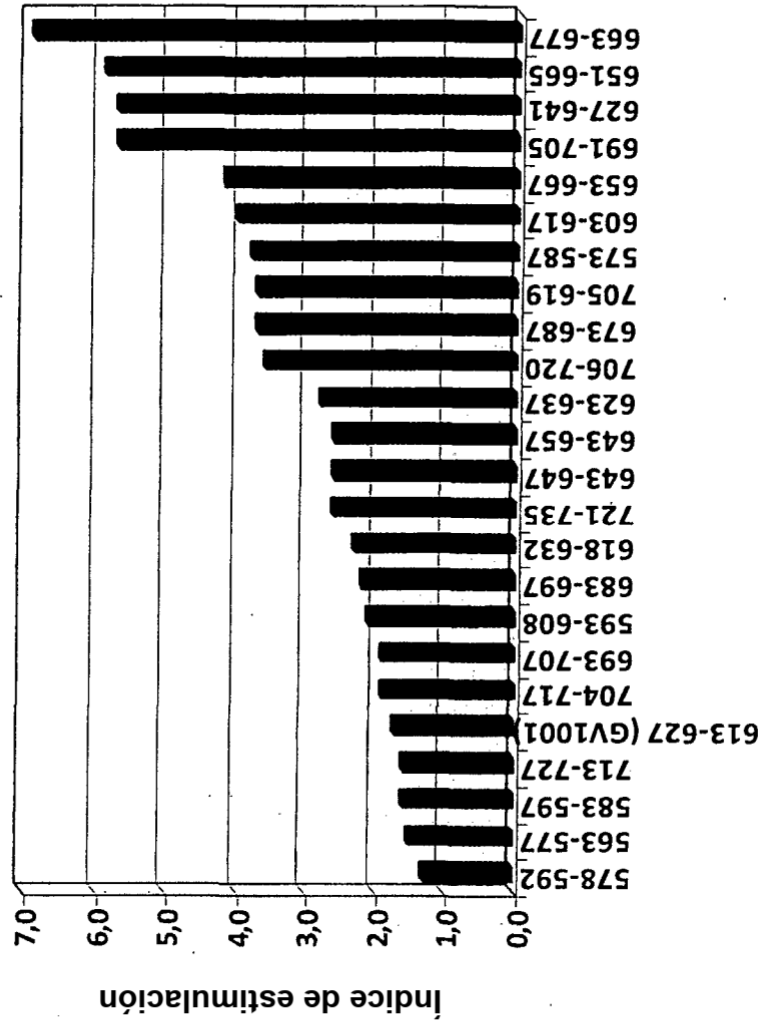


Figura 13

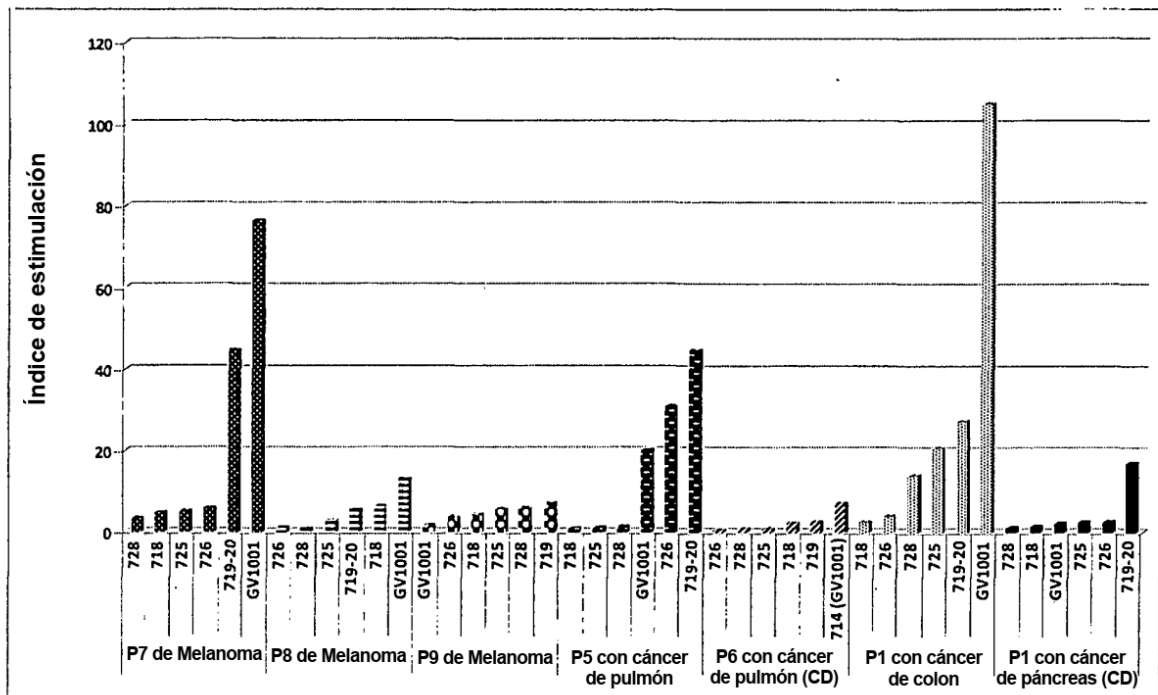


Figura 14

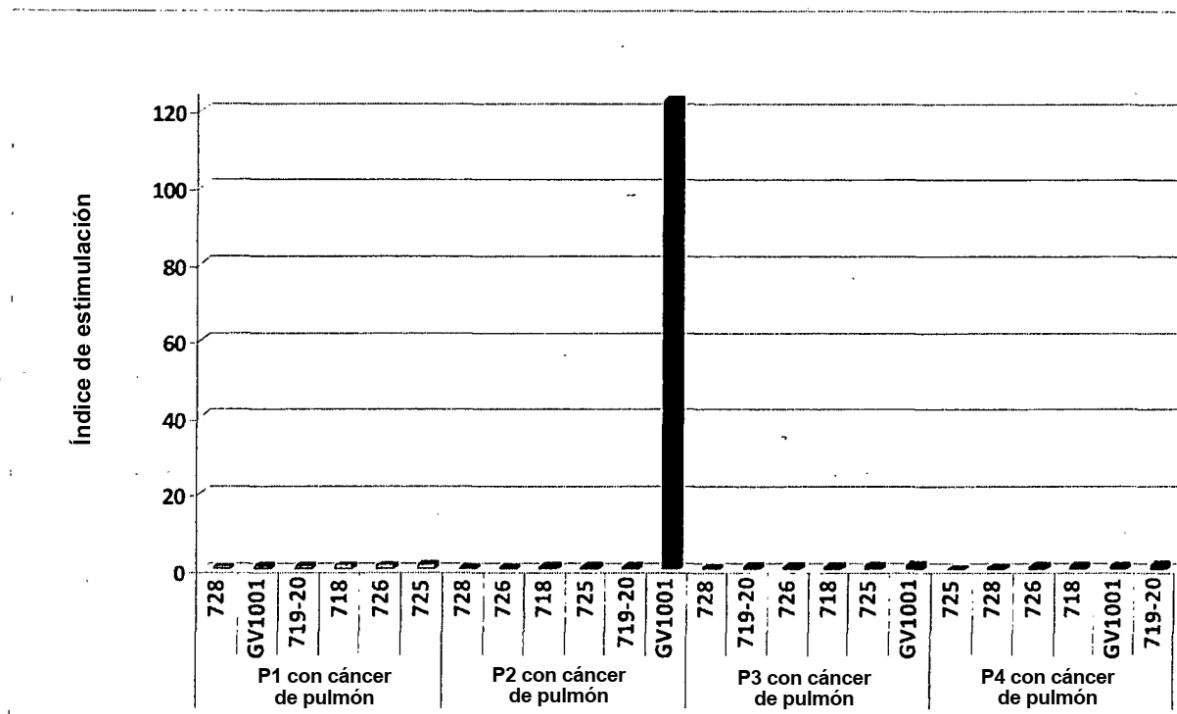


Figura 15

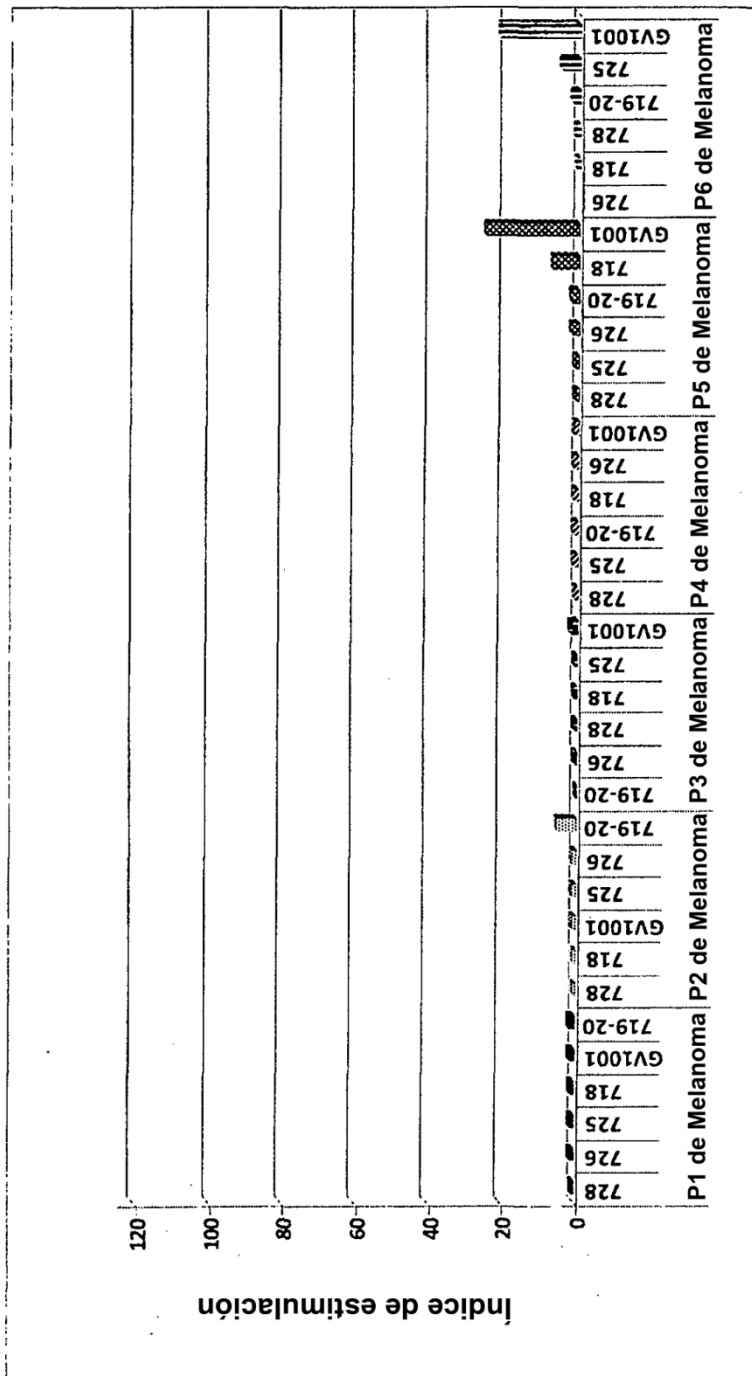


Figura 16

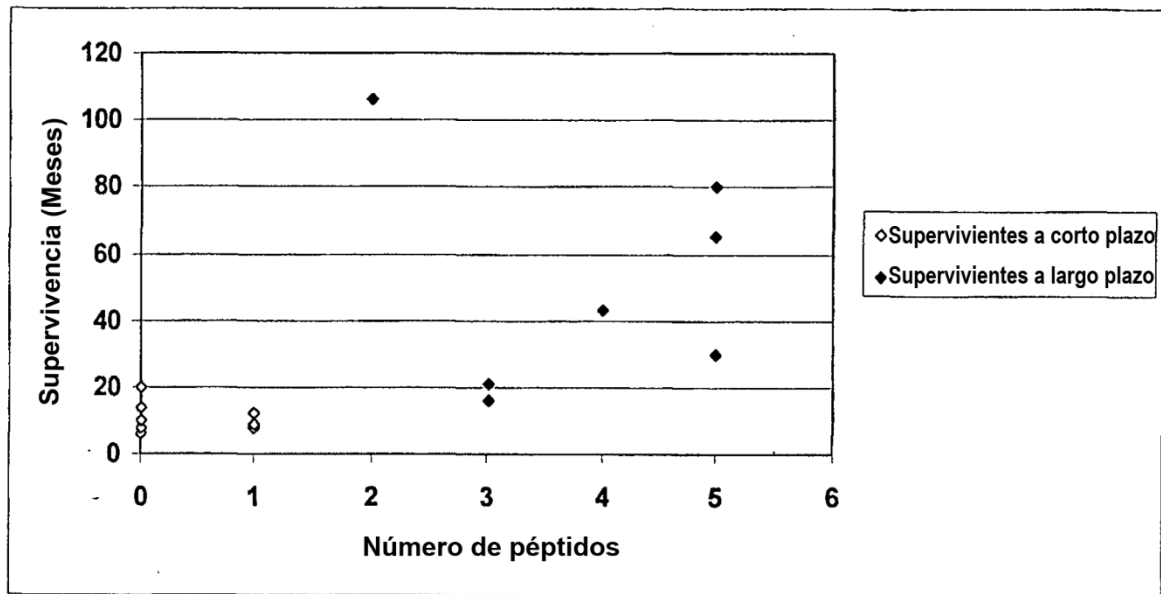


Figura 17

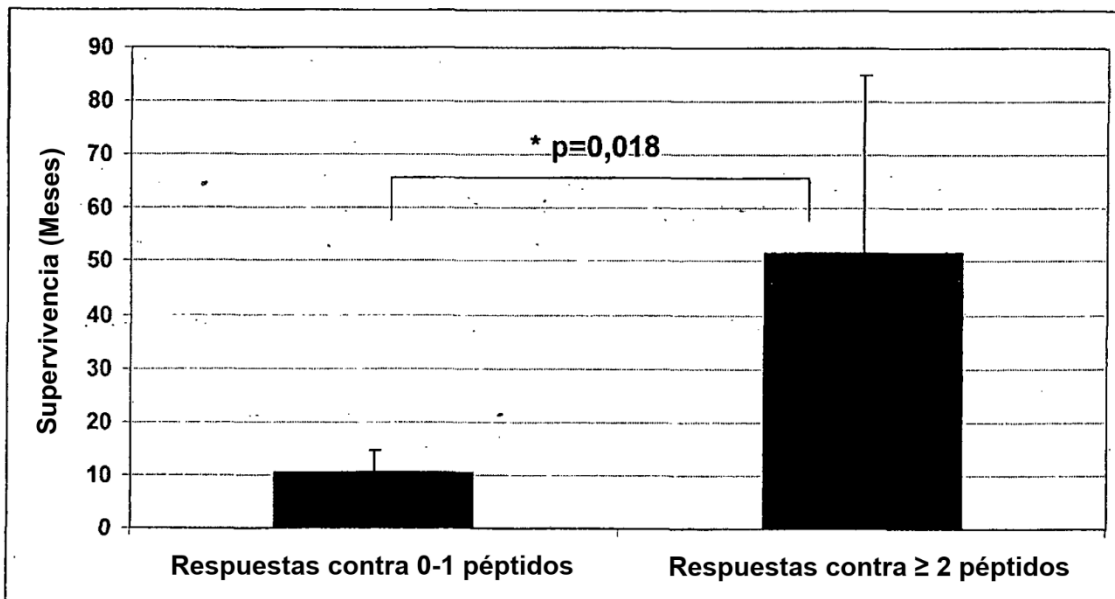


Figura 18