

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 726**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2015 PCT/IB2015/055438**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16012921**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2015 E 15762719 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3193916**

54 Título: **Polipéptido inmunogénico, compuesto por péptidos crípticos optimizados, derivados del antígeno tumoral restringido HLA-B7 y usos del mismo**

30 Prioridad:

22.07.2014 EP 14306187

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

10.06.2020

73 Titular/es:

**VAXON BIOTECH (100.0%)
Tour Montparnasse Centre d'Affaires, 33 avenue
du Maine
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GALLOU, CATHERINE y
MENEZ-JAMET, JEANNE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 765 726 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

Polipéptido inmunogénico, compuesto por péptidos crípticos optimizados, derivados del antígeno tumoral restringido HLA-B7 y usos del mismo

La presente invención pertenece al campo de las vacunas anticancerosas. Más particularmente, la invención se refiere a un polipéptido quimérico optimizado para utilizar en pacientes de cáncer con HLA-B7, que comprende cuatro péptidos optimizados derivados de epítomos tumorales crípticos para mejorar su inmunogenicidad.

Las vacunas antitumorales actualmente en desarrollo adoptan muchas formas, incluyendo péptidos libres, proteínas recombinantes, células dendríticas cargadas con péptidos o lisados tumorales y ADN. Aunque las vacunas con base peptídica son muy atractivas en relación a otras formas en términos de viabilidad, se encontró que muchos estudios con vacunas dirigidas a péptidos tumorales dominantes provocaban solo respuestas débiles inmunológicas y clínicas, con gran variabilidad entre pacientes. Este fue el caso de varias vacunas peptídicas derivadas de gp100 probadas en varios estudios clínicos, el péptido BLP25 derivado de MUC1 probado en un ensayo en fase II aleatorizado y el péptido E75 derivado de HER-2/neu probado en un número muy elevado de estudios clínicos en fase I y en fase II (Butts et al, 2005; Peoples et al, 2008; Rosenberg et al., 2004).

Los péptidos crípticos optimizados inducen inmunidad antitumoral más eficazmente que los péptidos dominantes en modelos de ratones transgénicos (Gross et al., 2004) y en la actualidad, dos vacunas basadas en esta tecnología se encuentran en desarrollo clínico:

- Vx-001, un péptido monoepítipo derivado de *TERT* destinado a pacientes de cáncer de CPNM con HLA-A2, está en fase IIb y
- Vx-006, un polipéptido de tres epítomos que se dirige a los antígenos tumorales universales *TERT*, *MAGE-A* y *HER-2/neu* también destinado a pacientes con HLA-A2, está en fase I.

Los enfoques que provocan respuestas de CTL a múltiples antígenos utilizando vacunas con base polipeptídica tienen varias ventajas. En particular, la expresión de al menos un antígeno diana ha de ser suficiente para desencadenar la muerte de células tumorales mediante CTL inducidos por vacunas y es improbable que las células tumorales pierdan todos los antígenos diana simultáneamente, especialmente cuando estos antígenos son esenciales para la supervivencia celular y el crecimiento tumoral. Este enfoque puede provocar fuertes respuestas inmunitarias (Oukka et al., 1996) e incrementar la proporción de pacientes susceptibles de beneficiarse de la vacuna. Además, las vacunas contra el cáncer de amplio espectro deben dirigirse a antígenos tumorales universales, tales como *TERT*, *HER-2/neu*, *MUC-1*, *CEA*, *EphA2* y *MAGE-A*, que están sobreexpresados por una amplia variedad de tumores (Minev et al., 2000; Ofuji et al., 1998; Ogata et al., 1992; Reese y Slamon, 1997; Slamon et al., 1987; Van den Eynde y van der Bruggen, 1997; Vonderheide et al., 1999). La mayoría de estos antígenos están implicados en la supervivencia de células tumorales y en carcinogénesis y su regulación a la baja para evitar la respuesta inmunitaria puede, por tanto, tener un efecto deletéreo en el crecimiento tumoral.

Para aumentar el número de pacientes que pueden beneficiarse de tales productos, los inventores han desarrollado una vacuna con base peptídica, denominada Vbx-016, diseñada para pacientes que expresan el HLA-B7, que se dirige a cuatro antígenos tumorales expresados ampliamente: *TERT*, *HER-2/neu*, *MAGE* y *CEA*. Los cuatro péptidos crípticos optimizados (Tabla 1) que componen la Vbx-016, ya se han descrito (documentos WO2008/010098, WO2010/143010 y US 2012/142894 A1). Se observó que cada uno de los cuatro péptidos provoca una respuesta antitumoral *in vivo* e *in vitro* (documentos WO2008/010098, WO2010/143010 y US 2012/142894 A1), tanto contra el péptido optimizado y como contra el péptido afin nativo expresado de forma natural por las células tumorales (tabla 1). Cabe señalar que, los CTL provocados por *MAGE-A_{273V6L9}* se dirigieron a seis antígenos *MAGE* (-A1, -A2, -A3, -A4, -A6 y -A12). De hecho, los CTL específicos inducidos utilizando el *MAGE-A_{273V6L9}* son capaces de reconocer células cargadas con *MAGE-A₂₇₃A6* (incluidas en *MAGE-A1* y *MAGE-A4*), *MAGE-A₂₇₃I6* (incluidas en *MAGE-A2* y *MAGE-A6*) y *MAGE-A₂₇₃V6* (incluidas en *MAGE-A3* y *MAGE-A12*).

Tabla 1: Secuencias de epítomo nativas y optimizadas

Nombre del péptido optimizado nativo	Antígeno	Posición	Modificación	Secuencia	tamaño	SEQ ID
7C1	CEA	188		SPRLQLSNG	9	1
7C1M	CEA	188	L9	SPRLQLSNL	9	7
7HN3	HER-2/neu	246		GPKHSDCLA	9	2
7HN3M	HER-2/neu	246	A1	APKHSDCLA	9	8
7T5	TERT	444		DPRRLVQLL	9	3
7T5M	TERT	444	A1	APRRLVQLL	9	9
7M1A6	MAGE-A	273	A6	GPRALAETS	9	4
7M1V6	MAGE-A	273	V6	GPRALIETS	9	5
7M1I6	MAGE-A	273	I6	GPRALVETS	9	6
7M1M	MAGE-A	273	V6 L9	GPRALVETL	9	10

Tradicionalmente, las vacunas con base polipeptídica se emulsionan con un adyuvante tal como el ISA51VG de Montanide (Seppic, Castres, Francia) antes de la inyección subcutánea. Después de la inyección, el polipéptido se asimila en Células Presentadoras de Antígenos (CPA) especialistas, en particular las células de Langerhans presentes localmente en la piel. Seguidamente, el polipéptido se procesa por el proteasoma en el aparato de Golgi y los epítomos se presentan en la superficie celular en asociación con moléculas de HLA. Para garantizar la presentación eficaz de cada epítomo del polipéptido, es preceptivo probar si cada unión se procesa correctamente por el proteasoma. Además, los inventores han descrito anteriormente, con el polipéptido Vx006 de tres epítomos, que el orden de los epítomos en la secuencia de una vacuna poliepitópica es crucial para el procesamiento de cada epítomo y finalmente para la obtención de una respuesta inmunitaria contra todos los epítomos correspondientes (documento WO2007/073768, Cornet et al., Vaccine 2016, p. 2102-2109).

Para evitar probar las 24 supuestas disposiciones, la organización óptima de los cuatro péptidos optimizados en el polipéptido se determinó así en dos etapas: (i) prueba de cada secuencia de unión; y (ii) prueba del polipéptido completo correspondiente.

Por tanto, se probó cada unión potencial. Seguidamente, se probaron doce posibles dipéptidos presentados en la tabla 2 *in vivo* en ratones transgénicos HLA-B*0702 y en cultivo *in vitro* de PBMC de donante sano para:

- la capacidad del dipéptido para ser procesado eficazmente e inducir los CTL específicos capaces de reconocer células cargadas con cada uno de los epítomos optimizados,
- la capacidad de los CTL inducidos para reconocer los péptidos nativos afines correspondientes a la secuencia presente de forma natural en la superficie celular tumoral.

Tabla 2. Secuencias dipeptídicas probadas en ratones transgénicos

Nombre	Secuencia	Tamaño (AA)	SEQ ID NO:
7C1HN3M	SPRLQLSNLAPKHSDCLA	18	11
7HN3C1M	APKHSDCLASPRQLQSNL	18	12
7C1T5M	SPRLQLSNLAPRRLVQLL	18	13
7T5C1M	APRRLVQLLSPRLQSNL	18	14
7C1M1M	SPRLQLSNLGPRLVETL	18	15
7M1C1M	GPRLVETLSPRLQSNL	18	16
7HN3T5M	APKHSDCLAAPRRLVQLL	18	17
7T5HN3M	APRRLVQLLAPKHSDCLA	18	18
7HN3M1M	APKHSDCLAGPRLVETL	18	19
7M1HN3M	GPRLVETLAPKHSDCLA	18	20
7T5M1M	APRRLVQLLGPRLVETL	18	21
7M1T5M	GPRLVETLAPRRLVQLL	18	22

En primer lugar, cada secuencia de dipéptido se sometió a dos programas principales de predicción de escisión con proteasoma *in silico*, MAPPP (desarrollado por Jörg Hakenberg y Hans-Joachim Mollenkopf en el Max-Planck-Institute for Infection Biology, disponible en Internet) y PAPProC (Algoritmo de Predicción para Escisiones Proteasomales, también disponible en Internet) que predicen la probabilidad de procesamiento de cada epítomo.

Según PAPProC, ninguno de los dipéptidos debería procesarse correctamente por el proteasoma (los sitios de escisión predichos se representan con barras, tabla 3), excepto el 7T5HN3M que podría producir ambos epítomos (sitio de escisión con una barra doble).

Tabla 3: predicción de escisión con proteasoma para dipéptidos (PaProc)

Nombre	Predicción de sitios de escisión	SEQ ID NO:
7C1HN3M	SPRLQL SNLAPKH S DCLA	11
7HN3C1M	APKHSDC LASPRL QLSNL	12
7C1T5M	SPRLQL SNLAPRR LVQLL	13
7T5C1M	APRRLV QLLS PRL QLSNL	14
7C1M1M	SPRLQL SNLGPRLVETL	15
7M1C1M	GPRLVE TL S P RL QLSNL	16
7HN3T5M	APKHSDC LAAPRR LVQLL	17
7T5HN3M	APRRLV QLLAPKHS DCLA	18
7HN3M1M	APKHSDC LAGPRLVETL	19
7M1HN3M	GPRLVE TLAP KHS DCLA	20
7T5M1M	APRRLV QLLGPRLVETL	21
7M1T5M	GPRLVE TLAP RRLVQLL	22

De acuerdo con el modelo de predicción de MAPPP, muchas combinaciones deberían permitir el procesamiento de los cuatro epítomos (datos no mostrados). La secuencia mejor predicha que debe asegurar el procesamiento eficaz de cada epítomo por el proteasoma es CEA_{188L9}/MAGE_{273L9}/TERT_{444A1}/HER-2/neu_{246A1}.

- 5 Seguidamente, los dipéptidos se probaron *in vivo* en ratones transgénicos HLA-B*0702. Como se describió en el ejemplo 1, las combinaciones 7C1HN3M, 7C1T5M, 7T5HN3M, 7M1HN3M y 7T5M1M dieron mejores resultados que las correspondientes secuencias invertidas, en términos del número de ratones que respondieron. 7C1M1M y 7M1C1M dieron los mismos resultados.
- 10 Basándose en estos datos experimentales *in vivo*, seguidamente se diseñó el siguiente polipéptido óptimo teórico: CEA_{188L9}/TERT_{444A1}/MAGE_{273L9}/HER-2/neu_{246A1}.

- 15 Con el fin de determinar si los epítomos se procesan eficazmente en el cuadripéptido, el polipéptido correspondiente SPRLQLSNLAPRRVLQLLGPRALVETLAPKHSDCCLA (SEQ ID NO: 23) se probó seguidamente en ratones transgénicos HLA-B*0702 respecto a su capacidad para inducir CTL específicos que reconocen los cuatro epítomos optimizados y los cuatro péptidos nativos afines que están presentes de forma natural en la superficie de las células tumorales. Como se describió en el ejemplo 2, después de dos vacunaciones con el polipéptido, todos los ratones respondieron a al menos un péptido nativo y una gran mayoría de los ratones vacunados respondieron a dos o más péptidos nativos afines confirmando que el polipéptido se procesa eficazmente por el proteasoma. Cabe destacar que, todos los péptidos nativos se reconocieron al menos una vez en un ratón vacunado.
- 20

- 25 Cabe señalar que, esta secuencia es diferente de la secuencia seleccionada por el modelo de predicción de escisión de MAPPP del proteasoma, dado que se predijo que el 7M1T5M no se procesaría correctamente, contrariamente a lo que sucede *in vivo*.

- 30 Para confirmar los resultados obtenidos en ratones transgénicos HLA-B*0702 *in vitro* en seres humanos, cada unión del polipéptido definido (CEA_{188L9}/TERT_{444A1}, TERT_{444A1}/MAGE_{273L9} y MAGE_{273L9}/HER-2/neu_{246A1}) se probó independientemente *in vitro* en un cultivo de PBMC de un donante humano sano. Los resultados descritos en el ejemplo 3 muestran que cada dipéptido se procesó eficazmente *in vitro* en seres humanos y que los CTL específicos inducidos fueron capaces de reconocer células cargadas con el péptido optimizado o con el péptido nativo afín.

- 35 Finalmente, el polipéptido SPRLQLSNLAPRRVLQLLGPRALVETLAPKHSDCCLA (SEQ ID NO: 23) se probó en un cultivo de PBMC de un donante sano con HLA-B*0702 (ejemplo 4), confirmando la capacidad del polipéptido para generar una respuesta inmunitaria de CTL poliespecífica. Cabe destacar que, se reconocieron varios péptidos nativos. Estos resultados confirman que el polipéptido se procesa eficazmente por el proteasoma y que la respuesta inmunitaria inducida es poliespecífica.

- 40 El presente texto describe un polipéptido que comprende la secuencia SPRLQLSNLXXXAPRRVLQLLXXXGPRALVETLXXXAPKHSDCCLA (SEQ ID NO: 24). En esta secuencia, los epítomos CEA_{188L9}, TERT_{444A1}, MAGE_{273L9} y HER-2/neu_{246A1} están separados por los espaciadores XXX, en los que cada X es (independientemente entre sí) cualquier aminoácido o ninguno. El polipéptido tiene, por lo tanto, al menos 36 aminoácidos de longitud; su longitud se puede incrementar mediante la adición de espaciadores entre los epítomos y/o por la adición de señales, en sus extremos N-terminal y/o C-terminal, que favorecen su procesamiento. En particular, el polipéptido descrito puede comprender adicionalmente una secuencia de señal de translocación al retículo endoplasmático en su extremo N-terminal. Se han descrito varias secuencias de señal de translocación al retículo endoplasmático en la literatura científica y se pueden utilizar en el contexto de la invención. Por ejemplo, la secuencia de señal de cadena Ig kappa (Ishioaka et al., 1999) y la secuencia de señal de proteína E3/19-kD (Anderson et al., 1991) se pueden añadir al extremo N-terminal de los péptidos de acuerdo con la invención. Como alternativa o adicionalmente, el polipéptido puede comprender adicionalmente ubiquitina en su extremo C-terminal, dado que la ubiquitinación de proteínas provoca una proteólisis mayor.
- 45
- 50

- 55 En un polipéptido de acuerdo con la invención, los cuatro epítomos están directamente ligados entre sí sin el uso de ningún espaciador (X=ninguno para cada posición). Por lo tanto, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende la secuencia SPRLQLSNLAPRRVLQLLGPRALVETLAPKHSDCCLA (SEQ ID NO: 23). En ausencia de ubiquitina y de la señal de translocación al RE, el polipéptido consiste, por lo tanto, en el polipéptido ilustrado en los ejemplos de más adelante (SPRLQLSNLAPRRVLQLLGPRALVETLAPKHSDCCLA, Seq ID NO: 23).

En los polipéptidos de acuerdo con la invención, los aminoácidos pueden ser L-aminoácidos o D-aminoácidos.

- 60 Un polipéptido según la invención induce una respuesta específica de linfocitos T CD8⁺ contra al menos uno y preferentemente al menos dos péptidos seleccionados entre los péptidos nativos afines CEA₁₈₈, TERT₄₄₄, MAGE₂₇₃ y HER-2/neu₂₄₆, en una mayoría de ratones transgénicos HLA-B*0702 vacunados con dicho polipéptido.

- 65 Un polipéptido según la invención también induce una respuesta específica de linfocitos T CD8⁺ contra al menos uno y preferentemente al menos dos péptidos seleccionados entre los péptidos nativos afines CEA₁₈₈, TERT₄₄₄, MAGE₂₇₃ y HER-2/neu₂₄₆ en un ensayo *in vitro* con PBMC humanas de donantes sanos de HLA-B*0702.

Con el fin de controlar que el polipéptido de SEQ ID NO: 23 está correctamente procesado y que tiene una buena inmunogenicidad, los inventores han demostrado también que:

- 5 - se reconoce a cada péptido nativo al menos una vez en un ratón transgénico HLA-B*0702;
- el polipéptido de SEQ ID NO: 23 induce una respuesta específica de linfocitos T CD8⁺ contra al menos uno y normalmente dos o más péptidos seleccionados entre los péptidos nativos afines CEA₁₈₈, TERT₄₄₄, MAGE₂₇₃ y HER-2/neu₂₄₆ en un ensayo *in vitro* con PBMC humanas de donantes sanos de HLA-B*0702; y
- 10 - estas respuestas específicas se obtienen con PBMC de dos o más donantes sanos de HLA-B*0702 y se reconoce cada péptido optimizado al menos una vez en un ensayo *in vitro* con PBMC humanas de un donante sano con HLA-B*0702.

En una realización más preferida, el polipéptido según la invención exhibe todas las propiedades anteriores, que pueden probarse fácilmente por el experto en la materia, utilizando los protocolos y ensayos descritos en la parte experimental más adelante.

Otro aspecto de la invención es una célula dendrítica aislada cargada con un polipéptido según la invención. En el presente contexto, "aislada" significa que dicha célula dendrítica está fuera del cuerpo del paciente. La célula se carga preferiblemente *ex vivo*. Por ejemplo, la célula dendrítica se puede cargar con el polipéptido mediante la técnica descrita por Vonderheide *et al.* (Vonderheide et al., 2004).

La invención también pertenece a un complejo que comprende un vector de liberación peptídico y un polipéptido según la invención. Son ejemplos de vectores de liberación peptídicos que se pueden emplear según la invención péptidos que penetran en la célula tales como los descritos, por ejemplo, en las solicitudes de patente publicadas como los documentos WO2013/150338, EP1795539 y WO2014/053629, toxinas bacterianas tales como la adenilato ciclase de *B. pertussis* (Fayolle et al., 1999), la toxina de la difteria (Fayolle et al., 1999), la toxina del ántrax (Doling et al, 1999), la subunidad B de la toxina shiga (Haicheur et al, 2000) y otros vectores tales como el PLA2 del veneno de abeja (Babon et al, 2005), liposomas, virosomas (Bungener et al, 2002) y similares.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según la invención y/o una célula dendrítica modificada por ingeniería genética y/o un complejo como se describió anteriormente, así como un vehículo aceptable farmacéuticamente. En particular, se pueden utilizar polipéptidos, células dendríticas y complejos según la invención para la preparación de una composición inmunogénica de inmunoterapia anticancerosa. Estas composiciones son particularmente útiles para la inmunoterapia de tumores que expresan al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en la familia MAGE-A, la familia HER, CEA y TERT, especialmente para el tratamiento de individuos con HLA-B*0702.

La presente invención se puede utilizar para tratar (o prevenir la recaída de) virtualmente cualquier tipo de cánceres, tales como el cáncer adrenocortical, cáncer colorrectal, carcinoma del tracto biliar, cáncer de vejiga, cánceres óseos, cánceres de cerebro y del sistema nervioso central, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cánceres de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, tumores carcinoides gastrointestinales, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cánceres de hígado, mesotelioma de cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de la hipófisis, cáncer de próstata, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de piel (por ejemplo, melanoma, cáncer de piel no melanoma), cánceres de testículos, cáncer de timo, cánceres de tiroides, cáncer de vagina, cáncer de la vulva y cáncer de útero.

También se describen en el presente documento métodos de vacunación o tratamiento contra el cáncer que comprenden una etapa de emulsión del polipéptido con un adyuvante y la administración de un polipéptido según la invención *in vivo* a un paciente que lo necesita, así como métodos de vacunación o tratamiento que comprenden una etapa de administración de complejos o células dendríticas modificadas por ingeniería genética como se describió anteriormente a un individuo.

Otro aspecto de la presente invención es un kit de partes que comprende al menos una dosis de polipéptido (o complejos) como se describió anteriormente y al menos una dosis de adyuvante. Los adyuvantes inmunológicos son sustancias que se añaden a formulaciones de vacunas para aumentar su eficacia. Los adyuvantes pueden aumentar la magnitud y la duración de la respuesta inmunitaria inducida mediante vacunación. Son ejemplos preferidos de adyuvantes que se pueden utilizar en los kits según la invención aquellos derivados del adyuvante incompleto de Freund (IFA). Las formulaciones de vacunas con estos adyuvantes son emulsiones de agua en aceite (W/O). Entre los ejemplos no limitantes de adyuvantes destoxificados de tipo IFA que se pueden utilizar para emulsiones con el péptido según la presente invención, se incluyen el ISA 51 con base de aceite mineral de Montanide® y el ISA 720 con base escualeno de Montanide® (SEPPIC, Francia).

Otro kit de partes según la presente invención comprende al menos dos dosis de polipéptidos o complejos como se describió anteriormente. El péptido ya puede estar formulado con el adyuvante o no.

Dado que la vacunación contra el cáncer necesita varios estímulos para ser totalmente eficaz, un kit de partes según la presente invención puede comprender de 3 a 50, preferentemente de 6 a 20 dosis de polipéptido como se describió anteriormente.

- 5 Según una realización preferida de los kits descritos anteriormente, cada dosis de polipéptido comprende entre 0,5 y 10 mg de polipéptido.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

10 Ejemplos

Los ejemplos se han realizado empleando los siguientes materiales y métodos:

Ratones transgénicos. Los ratones knockout clase I de H-2 con HLA-B7 se describieron anteriormente (Rohrlich et al., 2003) y se proporcionaron amablemente por F. Lemonnier (Institut Pasteur, París, Francia).

Células. Las células T2-B7 humanas transfectadas con HLA-B*0702 se describieron anteriormente (Rohrlich et al., 2003). Las células se cultivaron en medio de cultivo RPMI1640 suplementado con 20 % de SFB y penicilina-estreptomicina.

Péptidos y Plásmidos. Los péptidos se sintetizaron por Millegen (Labège, Francia) o por Eurogentec (Seraing, Bélgica).

Inducción de CTL in vivo en ratones transgénicos HLA-B*0702. Los ratones transgénicos HLA-B*0702 se vacunaron por vía subcutánea en la base de la cola con 200 µg de dipéptidos optimizados o con 400 µg de Vbx-016 junto con el péptido auxiliar HV core T13L auxiliar (150 µg) y emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA) o ISA51VG de Montanide (Seppic, Castres, Francia) dos veces con un intervalo de dos semanas.

Siete días después de la última vacunación, se extrajeron los bazos y se aislaron los linfocitos T mediante centrifugación Ficoll y se comprobó *ex vivo* el reconocimiento de 10 µM de los péptidos nativos u optimizados. El control positivo fue Concanavalina A y el control negativo fue el medio solo. Todas las condiciones se ensayaron por cuadruplicado. La producción de IFNγ por los linfocitos T se cuantificó mediante ELISpot utilizando el Kit Murine IFNγ ELISpot de Diaclone.

Una respuesta inmunitaria se consideró positiva cuando hubo 1) más de 10 puntos de diferencia/ 10⁶ células entre el control negativo y el péptido sometido a prueba y 2) una diferencia estadísticamente significativa entre estos dos grupos con la prueba t (p<0,05).

Generación de CTL a partir de PBMC humanas. Las PBMC se obtuvieron mediante leucoféresis de voluntarios sanos con HLA-B*0702. Las células dendríticas (DC) se produjeron a partir de células adherentes cultivadas durante siete días con 500 UI/ml de GM-CSF y 500 UI/ml de IL-4, en un medio sintético completo (AIMV). El día 6, las DC se sometieron a pulsos con 10 µM de polipéptidos toda la noche. El día 7, se purificaron las células CD8⁺ mediante selección negativa con células CD8 Dynabeads Untouched Human CD8. Las células CD8⁺ (2x10⁵) + células CD8⁻ (6x10⁴) se estimularon con 3x10⁴ DC pulsadas con péptido en medio AIMV suplementado con 1000 UI/ml de IL-6 y 5 UI/ml de IL-12, 1 µg/ml de anti-CD40 y 500 UI/ml de IFNγ en placas de fondo redondo de 96 pocillos.

A partir del día 7, los cultivos se reestimularon semanalmente con DC cargados con péptidos en presencia de 20 UI/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-7, 1 µg/ml de anti-CD40 y 500 UI/ml de IFNγ.

Después de la tercera reestimulación, las células CD8 se mantuvieron en AIMV suplementado con 20 UI/ml de IL-2 durante 7 días. Los cultivos no se alimentaron durante una noche con AIMV y seguidamente se examinaron en un ensayo ELISpot de IFNγ.

Ensayo ELISpot de IFNγ. Para un cultivo de 96 pocillos, se obtuvieron cuatro grupos de 24 pocillos, las células CD8 se contaron y 50 000 CD8 se repartieron sobre la placa ELISpot con 25 000 T2B7 cargados con 10 µM de cada monopéptido nativo o con 10 µM de monopéptidos modificados que componen el polipéptido. Se realizaron ocho réplicas de cada condición. El control positivo fue Fitohemaglutinina A y el control negativo fue T2B7 cargado con un péptido irrelevante incapaz de unirse a moléculas de HLA-B7.

60 Ejemplo 1: Evaluación de la respuesta inmunitaria de linfocitos T producida en ratones transgénicos HLA-B*0702 después de dos vacunaciones con todas las diferentes combinaciones de dipéptidos

Se utilizó cada dipéptido para vacunar ratones transgénicos HLA-B*0702 dos veces en un intervalo de 2 semanas y se probó su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria tanto contra péptidos optimizados como contra sus homólogos nativos afines. Se describen los dipéptidos en la tabla 2. En cada experimento, la mejor combinación se resalta en gris. 7C1HN3M, 7C1T5M, 7T5HN3M, 7M1HN3M y 7T5M1M dieron mejores resultados que la secuencia invertida, en términos del número de ratones que respondieron. 7C1M1M y 7M1C1M dieron los mismos resultados.

Comparación de 7C1HN3M frente a 7HN3M				
dipéptido	CEA188	CEA188L9	HER-2Neu 246	HER-2Neu 246A1
7C1HN3M	2/4	4/4	3/4	1/4
7HN3C1M	1/3	1/3	1/3	0/3
Comparación de 7C1T5M frente a 7T5C1M				
dipéptido	CEA188	CEA188L9	TerT444	Tert444A1
7C1T5M	8/8	5/8	6/8	6/8
7T5C1M	3/7	4/7	6/7	7/7
Comparación de 7C1M1M frente a 7M1C1M				
dipéptido	CEA188	CEA188L9	MageA273V6	MageA273L9
7C1M1M	4/7	5/7	2/7	4/7
7M1C1M	4/5	4/5	1/5	4/5
Comparación de 7HN3T5M frente a 715M HN3				
dipéptido	HER-2/Neu246	HER-2/Neu246A1	TerT444	Tert444A1
7HN3T5M	2/7	0/7	5/7	5/7
7T5HN3M	3/8	2/8	4/8	5/8
Comparación de 7HN3M1M frente a 7M1HN3M				
dipéptido	HER-2/Neu246	HER-2Neu246A1	MageA273V6	MageA273L9
7HN3M1M	0/7	1/7	1/7	5/7
7M1HN3M	1/7	4/7	5/7	5/7
Comparación de 7T5M1M frente a 7M1T5M				
dipéptido	TerT444	Tert444A1	MageA273V6	MageA273L9
7T5M1M	4/4	4/4	2/4	4/4
7M1T5M	4/4	4/4	0/4	4/4

Tabla 4: prueba de cada dipéptido en ratones transgénicos HLA-B*0702.

Ejemplo 2: Evaluación de la respuesta inmunitaria de linfocitos T producida en ratones HLA-B*0702 después de dos vacunaciones con Vbx-016

Para evaluar si la Vbx-016 (SEQ ID NO: 23) determinada en los experimentos dipeptídicos es óptima, los ratones transgénicos HLA-B*0702 se vacunaron por vía subcutánea en la base de la cola con 400 µg de Vbx-016 y 150 µg del péptido auxiliar HBV core T13L emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA) o ISA51VG de Montanide (Seppic, Castres, Francia) dos veces con un intervalo de dos semanas.

Después de dos vacunaciones, todos los ratones responden a al menos un péptido nativo y 13/14 de los ratones vacunados respondieron a dos o más péptidos nativos afines. Cabe destacar que, cada péptido nativo se reconoció al menos una vez en un ratón vacunado.

	Número de ratones que responden/número total de ratones		
	Prueba t significativa (<0,05)		
	VbxQ16+ auxiliar+IFA	Vbx016+ auxiliar+Montanide	Auxiliar + adyuvante (IFA o Montanide)
CEA188	8/9	5/5	13/14
CEA188L9	8/9	5/5	13/14
HER-2Neu246	1/9	0/5	1/14
HER-2Neu246A1	2/9	0/5	2/14
Tert444	8/9	4/5	12/14
Tert444A1	9/9	5/5	14/14
MageA273A6	2/9	0/5	2/14
MageA273I6	1/9	2/5	3/14
MageA273V6	1/9	1/5	2/14
MageA273L9	7/9	5/5	12/14
Vbx-016	9/9	4/4	14/14
Dos o más epítopos nativos	8/9	5/5	13/14

Tabla 5: Prueba del cuadripéptido de SEQ ID NO: 23 en ratones transgénicos HLA-B*0702

Ejemplo 3: Evaluación de respuesta inmunitaria de linfocitos T mediante la inducción de linfocitos T citotóxicos específicos a partir de células mononucleares de sangre periférica humanas *in vitro* con los dipéptidos seleccionados en ratones transgénicos HLA-B*0702.

- 5 Para evaluar si la unión presente en el polipéptido CEA_{188L9}/TERT_{444A1}/MAGE_{273L9}/HER-2/neu_{246A1} validada en ratones transgénicos se procesa eficazmente en seres humanos, se estimularon PBMC humanas con cada dipéptido (CEA_{188L9}/TERT_{444A1}, TERT_{444A1}/MAGE_{273L9} y MAGE_{273L9}/HER-2/neu_{246A1}) según el protocolo descrito en los métodos. El reconocimiento de los péptidos nativos afines se evaluó midiendo células productoras de IFN γ específicas a partir de las CD8⁺ estimuladas por el dipéptido, divididas en 4 grupos para la prueba. Se realizó la prueba t cuando el número medio de puntos obtenidos para el péptido de interés fue superior al número medio de puntos obtenidos con el péptido irrelevante; cuando el valor de la prueba t fue inferior a 0,05, el resultado se consideró positivo significativamente y se destaca en gris en la siguiente tabla.

- 15 En cada donante, las CTL consiguieron reconocer tanto péptidos optimizados como nativos afines (y los cuatro nativos para el péptido compartido MAGE-A_{273L9}), confirmando que cada unión está bien procesada por el proteasoma.

Donante 596 7M1HN3M	irr	HER-2Neu ₂₄₆	HER-2Neu _{246A1}	MageA _{273A6}	MageA _{273I16}	MageA _{273V6}	MageA _{273L9}
Grupo 1	275	310	264	318	300	311,4	283,3
prueba t		0,057		0,06	0,04998	0,04	0,31
Grupo 2	341	331	318	370	353	375,8	343,7
prueba t				0,12	0,33	0,12	0,46
Grupo 3	360	434	329	398	384	413	373
prueba t		0,00005		0,08	0,054	0,02	0,18
Grupo 4	306	351	316	357	337	365	329
prueba t		0,004	0,27	0,005	0,03	0,001	0,049
Donante 3628 7T5HN3M	irr	Tert ₄₄₄	T β rt _{444A1}	MageA _{273I6}	MageA _{273A6}	MageA _{273V6}	MageA _{273L9}
Grupo 1	115	120	117	139	104	121	120
prueba t		0,37	0,46	0,06		0,35	0,37
Grupo 2	138	146	137	141	142	139	132
prueba t		0,22		0,41	0,39	0,47	
Grupo 3	126	146	154	168	147	160	1,29
prueba t		0,03	0,03	0,01	0,01	0,01	0,40
Grupo 4	116	1,25	121	136	116	126	106
prueba t		0,15	0,32	0,03	0,49	0,13	
Donante 8647 7C1T5M	irr	CEA ₁₈₈	CEA _{188L9}	Tert ₄₄₄	Tert _{444A1}		
Grupo 1	100	81	91	93	81		
prueba t							
Grupo 2	108	126	108	123	121		
prueba t		0,04	0,48	0,04	0,07		
Grupo 3	109	136	119	131	117		
prueba t		0,003	0,08	0,01	0,18		
Grupo 4	93	101	91	102	101		
prueba t		0,11		0,15	0,14		

Tabla 6: Cultivo de PBMC de donantes sanos con HLA-B7 estimuladas con cada uno de los dipéptidos incluidos en el polipéptido SEQ ID NO: 23, irr: péptido irrelevante, las pruebas t positivas se resaltan en gris

- 20 **Ejemplo 4: Inducción de linfocitos T citotóxicos específicos a partir de células mononucleares de sangre periférica humanas *in vitro* con Vbx-016.**

Finalmente, se utilizó Vbx-016 para estimular PBMC humanas de un donante sano.

- 25 Se realizó la prueba t cuando el número medio de puntos obtenidos para el péptido de interés fue superior al número medio de puntos obtenidos con el péptido irrelevante; cuando el valor de la prueba t fue inferior a 0,05, el resultado se consideró positivo significativamente y se destaca en gris en la siguiente tabla. Se indujo una respuesta poliespecífica y se reconocieron varios péptidos nativos por las CTL inducidas, confirmando que el polipéptido está bien procesado por el proteasoma y que la respuesta inducida es poliespecífica.
- 30

Donante 802	irr	C1	C1M	T5	T5M	M1A6	M1A6	M1V6	M1M	HN3	HN3 M
Grupo 1	310	302	347	354	300	329	325	306	298	336	318
prueba t			0,03	0,002		0,16	0,17			0,02	0,33
Grupo 2	388	380,9	371,14	382	357	361	365	360,0	365,4	376	341
prueba t											
Grupo 3	329	314	356	380	361	357	370	360	355	350	322
prueba t			0,01	0,0003	0,004	0,005	0,001	0,02	0,06	0,02	
	369	343	396	377	368	377	372	357	358	357	334
Grupo 4											
prueba t			0,02	0,18		0,19	0,39				

Tabla 7: Cultivo de PBMC de donantes sanos con HLA-B7 estimuladas con el polipéptido SEQ ID NO: 23, irr: péptido irrelevante, los resultados positivos de las pruebas t se resaltan en gris

REFERENCIAS

- 5 Anderson K, Cresswell P, Gammon M, Hermes J, Williamson A, Zweerink H (1991) Endogenously synthesized peptide with an endoplasmic reticulum signal sequence sensitizes antigen processing mutant cells to class I-restricted cell-mediated lysis. *J Exp Med* 174: 489-492
- 10 Babon A, Almunia C, Boccaccio C, Beaumelle B, Gelb MH, Menez A, Maillere B, Abastado JP, Salcedo M, Gillet D (2005) Cross-presentation of a CMV pp65 epitope by human dendritic cells using bee venom PLA2 as a membrane binding vector. *FEBS Lett* 579: 1658-1664
- 15 Bungener L, Idema J, ter Veer W, Huckriede A, Daemon T, Wilschut J (2002) Virosomes in vaccine development: induction of cytotoxic T lymphocyte activity with virosome-encapsulated protein antigens. *J Liposome Res* 12: 155-163
- 20 Butts C, Murray N, Maksymiuk A, Goss G, Marshall E, Soulieres D, Cormier Y, Ellis P, Price A, Sawhney R, Davis M, Mansi J, Smith C, Vergidis D, Ellis P, MacNeil M, Palmer M (2005) Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIIB and IV non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23: 6674-6681
- 25 Doling AM, Ballard JD, Shen H, Krishna KM, Ahmed R, Collier RJ, Starnbach MN (1999) Cytotoxic T-lymphocyte epitopes fused to anthrax toxin induce protective antiviral immunity. *Infect Immun* 67: 3290-3296
- 30 Fayolle C, Ladant D, Karimova G, Ullmann A, Leclerc C (1999) Therapy of murine tumors with recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *J Immunol* 162: 4157-4162
- 35 Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, Cornet S, Alves P, Bennaceur-Griscelli A, Faure O, Guillaume P, Firat H, Chouaib S, Lemonnier FA, Davoust J, Miconnet I, Vonderheide RH, Kosmatopoulos K (2004) High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest* 113: 425-433
- 40 Haicheur N, Bismuth E, Bosset S, Adotevi O, Warnier G, Lacabanne V, Regnault A, Desaynard C, Amigorena S, Ricciardi-Castagnoli P, Goud B, Fridman WH, Johannes L, Tartour E (2000) The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *J Immunol* 165: 3301-3308
- 45 Ishioka GY, Fikes J, Hermanson G, Livingston B, Crimi C, Qin M, del Guercio MF, Oseroff C, Dahlberg C, Alexander J, Chesnut RW, Sette A (1999) Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. *J Immunol* 162: 3915-3925
- 50 Minev B, Hipp J, Firat H, Schmidt JD, Langlade-Demoyen P, Zanetti M (2000) Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4796-4801
- Ofuji S, Ikeda M, Tsujitani S, Ikeguchi M, Kaibara N, Yuasa I, Mitsuya K, Katoh M, Ito H (1998) Expression of MAGE-1, MAGE-2 and MAGE-3 genes in human gastric carcinomas; lack of evidence for cytotoxic effects in cases with simultaneous expression of MAGE-3 and HLA-A2. *Anticancer Res* 18: 3639-3644
- Ogata S, Uehara H, Chen A, Itzkowitz SH (1992) Mucin gene expression in colonic tissues and cell lines. *Cancer Res* 52: 5971-5978
- Oukka M, Manuguerra JC, Livaditis N, Tourdot S, Riche N, Vergnon I, Cordopatis P, Kosmatopoulos K (1996) Protection against lethal viral infection by vaccination with nonimmunodominant peptides. *J Immunol* 157: 3039-3045

Peoples GE, Holmes JP, Hueman MT, Mittendorf EA, Amin A, Khoo S, Dehqanzada ZA, Gurney JM, Woll MM, Ryan GB, Storrer CE, Craig D, Ioannides CG, Ponniah S (2008) Combined clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine for the prevention of recurrence in high-risk breast cancer patients: U.S. Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study 1-01 and 1-02. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 14: 797-803

Reese DM, Slamon DJ (1997) HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells* 15: 1-8

Rohrlich PS, Cardinaud S, Firat H, Lamari M, Briand P, Escriou N, Lemonnier FA (2003) HLA-B*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *Int Immunol* 15: 765-772

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10: 909-915

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182

Van den Eynde BJ, van der Bruggen P (1997) T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9: 684-693

Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM (2004) Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 10: 828-839

Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM (1999) The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 10: 673-679

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VAXON BIOTECH VAXON BIOTECH GALLOU, Catherine MENEZ-JAMET, Jeanne

<120> POLIPÉPTIDO INMUNOGÉNICO COMPUESTO DE PÉPTIDOS CRÍPTICOS OPTIMIZADOS DERIVADOS DEL ANTÍGENO TUMORAL RESTRINGIDO HLA-B7 Y USOS DEL MISMO

<130> F1788-9WO_VM-sf

<150> EP 14306187.7

<151> 22/07/2014

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 7C1

<400> 1

Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 7HN3

ES 2 765 726 T3

<400> 2

Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala
1 5

5

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

10

<220>
<223> 7T5

<400> 3

15

Asp Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> 7M1A6

25

<400> 4

Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu Thr Ser
1 5

30

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

35

<220>
<223> 7M1V6

<400> 5

Gly Pro Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ser
1 5

40

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

45

<220>
<223> 7M1I6

50

<400> 6

Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser
1 5

55

<210> 7
<211> 9
<212> PRT

ES 2 765 726 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 7C1M
 5 <400> 7

 Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Leu
 1 5

 10 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> 7HN3M

 <400> 8

 Ala Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala
 1 5
 20
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 7T5M

 30 <400> 9

 Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
 1 5

 35 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> 7M1M

 <400> 10

 Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Leu
 1 5
 45
 <210> 11
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> 7C1HN3M

 <400> 11
 55

ES 2 765 726 T3

Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Leu Ala Pro Lys His Ser Asp Cys
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 12
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 7HN3C1M

<400> 12

Ala Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
1 5 10 15

Asn Leu

<210> 13
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 7C1T5M

<400> 13

Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Leu Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 7T5C1M

<400> 14

Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
1 5 10 15

Asn Leu

<210> 15
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 765 726 T3

<223> 7C1M1M

<400> 15

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

5 Thr Leu

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 7M1C1M

15 <400> 16

Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Leu Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
1 5 10 15

Asn Leu

<210> 17

20 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> 7HN3T5M

<400> 17

Ala Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln
1 5 10 15

Leu Leu

30

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> 7T5HN3M

<400> 18

40

Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu Ala Pro Lys His Ser Asp Cys
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 19

<211> 18

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 765 726 T3

<220>

<223> 7HN3M1M

5 <400> 19

Ala Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu
1 5 10 15

Thr Leu

10

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> 7M1HN3M

<400> 20

20

Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Leu Ala Pro Lys His Ser Asp Cys
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 21

<211> 18

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 7T5M1M

30

<400> 21

Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu
1 5 10 15

Thr Leu

35

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> 7M1T5M

<400> 22

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

Leu Leu

45

<210> 23
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido
 10
 <400> 23
 Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Leu Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln
 1 5 10 15
 Leu Leu Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Leu Ala Pro Lys His Ser
 20 25 30
 Asp Cys Leu Ala
 35
 <210> 24
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Polipéptido
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(12)
 <223> X = cualquier aminoácido o ninguno
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (22)..(24)
 <223> X = cualquier aminoácido o ninguno
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)..(36)
 <223> X = cualquier aminoácido o ninguno
 35
 <400> 24
 Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Leu Xaa Xaa Xaa Ala Pro Arg Arg
 1 5 10 15
 Leu Val Gln Leu Leu Xaa Xaa Xaa Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr
 20 25 30
 Leu Xaa Xaa Xaa Ala Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala
 35 40 45

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende la secuencia SPRLQLSNLAPRRLVQLLGPRLVETLAPKHSDCLA (SEQ ID NO: 23).
- 5 2. El polipéptido según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia SPRLQLSNLAPRRLVQLLGPRLVETLAPKHSDCLA (SEQ ID NO: 23).
- 10 3. El polipéptido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende adicionalmente una secuencia de señal de translocación al retículo endoplasmático en su extremo N-terminal.
4. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente ubiquitina en su extremo C-terminal.
- 15 5. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** induce una respuesta de linfocitos T CD8+ contra al menos dos epítopos seleccionados del grupo que consiste en CEA₁₈₈, HER-2/neu₂₄₆, TERT₄₄₄, MAGE₂₇₃ A6, MAGE₂₇₃ V6 y MAGE₂₇₃ 16, en una mayoría de ratones HHD vacunados con dicho polipéptido.
- 20 6. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** induce una respuesta de linfocitos T CD8+ contra al menos dos epítopos, seleccionados del grupo que consiste en CEA₁₈₈, HER-2/neu₂₄₆, TERT₄₄₄, MAGE₂₇₃ A6, MAGE₂₇₃ V6 and MAGE₂₇₃ 16 en un ensayo *in vitro* con PBMC humanas de donantes sanos de HLA-B*0702.
- 25 7. Una célula dendrítica aislada, cargada con un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un complejo que comprende un vector de liberación peptídico y un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y/o una célula dendrítica según la reivindicación 7 y/o un complejo según la reivindicación 8.
10. Un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y/o una célula dendrítica según la reivindicación 7 y/o un complejo según la reivindicación 8, para utilizarlo en inmunoterapia del cáncer en un paciente que tiene un fenotipo de HLA-B*0702.
- 35 11. Un kit de partes que comprende al menos una dosis de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y al menos una dosis de adyuvante.
- 40 12. Un kit de partes que comprende al menos dos dosis de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
13. El kit de partes según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, que comprende de 6 a 20 dosis de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 45 14. El kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que cada dosis de polipéptido comprende entre 0,5 y 10 mg de polipéptido.