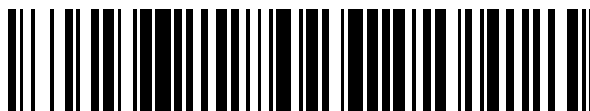


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 455**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2016 PCT/EP2016/000470**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16146259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2016 E 16713731 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3270957**

54 Título: **Nuevo complejo que comprende un péptido de penetración celular, una molécula de carga y un agonista peptídico de TLR para el tratamiento del glioblastoma**

30 Prioridad:

16.03.2015 WO PCT/EP2015/000580
09.11.2015 WO PCT/EP2015/002244

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2020

73 Titular/es:

AMAL THERAPEUTICS SA (100.0%)
64 Av. de la Roseaie
1205 Geneva, CH

72 Inventor/es:

DEROUAZI, MADIHA y
BELNOUE, ELODIE

74 Agente/Representante:

BUENO FERRÁN , Ana María

ES 2 781 455 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

Nuevo complejo que comprende un péptido de penetración celular, una molécula de carga y un agonista peptídico de TLR para el tratamiento del glioblastoma

- 5 La presente invención se refiere al campo de la vacunación, en particular a vacunas para la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma.

10 Un glioma es un tipo de tumor que surge de las células gliales, como astrocitos y oligodendrocitos. Por tanto, los gliomas generalmente comienzan en el cerebro o en la columna vertebral, siendo el cerebro el sitio más común de gliomas. Los gliomas representan aproximadamente el 30% de todos los tumores cerebrales y del sistema nervioso central y el 80% de todos los tumores cerebrales malignos. El tumor glioma de grado más alto es el glioblastoma multiforme (GBM, también conocido como "glioblastoma" o "astrocitoma de grado IV"). El glioblastoma es la forma más maligna y común de astrocitoma, con aproximadamente un 50% de frecuencia relativa. El GBM primario representa más del 90% de los casos. El 10% restante, llamado GBM secundario, progresa gradualmente de un grado inferior a un glioma de grado IV. El GBM primario se produce con mayor frecuencia en las personas de edad avanzada, mientras que el GBM secundario parece afectar con mayor frecuencia a la población más joven, con una ligera preponderancia general en los hombres. Finalmente, aunque el GBM sigue siendo raro en niños, es la primera causa de muerte por cáncer en niños (0-14 años) y la segunda en adolescentes (15-19 años) (Cancer Statistic 2015. American Cancer Society).

20 El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario más común en adultos. GBM es un glioma maligno conocido por su comportamiento altamente invasivo y agresivo. Con una incidencia anual de 2-3 por 100.000 individuos en todo el mundo, el glioblastoma es una enfermedad rara. Sin embargo, es la forma más común de tumores cerebrales y también es una de las más letales, con una expectativa de vida reducida a 12-16 semanas en pacientes no tratados.

25 Como lo subraya su nombre, el glioblastoma es un tumor complejo multiforme. Los parámetros histológicos que diferencian el GBM de todos los otros grados de glioma son la presencia de regiones de necrosis y hemorragia. La complejidad se debe también a variaciones genéticas significativas y a la heterogeneidad de la población de células intratumorales. La multiplicación de la población celular asociada con especificidades genéticas hace que el GBM sea muy difícil de tratar.

30 Los tratamientos existentes se basan en una combinación de terapias agresivas. La quimioterapia y la radioterapia concomitantes generalmente se implementan después de la resección quirúrgica del tumor. Sin embargo, esta combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia solo proporciona una supervivencia media de menos de 15 meses (Stupp, R., et al., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med, 2005. 352(10): p. 987-96). Con solo del 3 al 5% de los pacientes sobreviviendo más de 3 años debido a la recurrencia de la enfermedad, el GBM sigue siendo incurable.

35 El tratamiento estándar clave para el GBM se conoce como el "protocolo Stupp". Se trata de una resección quirúrgica completa del tumor seguida de radioterapia y quimioterapia concomitantes con temozolomida. Dentro de un gran ensayo clínico europeo, este régimen ha mostrado una mejora modesta en la supervivencia media de 12 meses con radioterapia sola a 14,6 meses con radioterapia y quimioterapia concomitantes (Stupp, R., et al., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med, 2005. 352(10): p. 987-96). Más impresionante fue la diferencia en los supervivientes a largo plazo, con al menos dos años el 10% en el grupo tratado con radioterapia y 27% para aquellos que recibieron simultáneamente temozolomida. Este beneficio a largo plazo persiste hasta cinco años, con una supervivencia del 1,9% en el grupo control versus el 9,8% en el grupo tratado con temozolomida (Stupp, R., et al., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med, 2005. 352(10): p. 987-96). Más recientemente, se ha investigado un marcador genético para predecir el resultado del tratamiento después de la temozolomida. De hecho, el estado de metilación del promotor del gen MGMT se ha correlacionado con una mejor respuesta al tratamiento con temozolomida (Hegi, M.E., et al., MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med, 2005. 352(10): p. 997-1003). En 2009, el medicamento antiangiogénico Avastin recibió la aprobación de la FDA como tratamiento para pacientes recurrentes o en progreso. Otros dos tratamientos también han recibido la aprobación de la FDA para la misma población de pacientes que Avastin: Gliadel y una terapia de campo eléctrico llamada Novocure TFF. Gliadel es un implante, también conocido como oblea de carmustina. El Gliadel se puede colocar en la cavidad después de la cirugía, resultando en un suministro local del medicamento quimioterapéutico carmustina. En 2011, la FDA aprobó el cuarto tratamiento para el GBM: Novocure TFF. La tecnología se basa en un campo electromagnético que interfiere en la división celular y causa la muerte de las células cancerosas. Dado que las células cerebrales sanas rara vez se dividen, éstas no se ven afectadas. A pesar de estos tratamientos y con menos del 30% de supervivencia a largo plazo,

todavía existe una importante necesidad médica no satisfecha de mejorar el pronóstico de los pacientes con GBM.

Una mejor comprensión de las interacciones entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmune, así como los avances en la inmunología tumoral para muchos tipos de cáncer, indican ahora que la inmunoterapia para el cáncer cerebral es una estrategia racional y factible. La vieja suposición de que el cerebro es un órgano inmunológicamente privilegiado debido a la barrera hematoencefálica y a la falta de estructuras linfáticas se está revisando ahora de forma considerable. De hecho, aunque se reconoce que las interacciones entre el sistema inmunitario y el SNC tienen características especiales (Bechmann, I., I. Galea, and V.H. Perry, What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*, 2007. 28(1): p. 5-11; Walker, P.R., et al., T-cell immune responses in the brain and their relevance for cerebral malignancies. *Brain Res Brain Res Rev*, 2003. 42(2): p. 97-122), hay un tráfico significativo de células inmunológicamente competentes dentro y fuera del cerebro (Hickey, W.F., B.L. Hsu, and H. Kimura, T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*, 1991. 28(2): p. 254-60). Además, diversos estudios han demostrado linfocitos infiltrantes de tumor cerebral en pacientes (Abou-Ghazal, M., et al., The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(24): p. 8228-35; Buckanovich, R.J., et al., Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell+ homing to tumors and disables immune therapy. *Nat Med*, 2008. 14(1): p. 28-36; Mittelbronn, M., et al., Elevated HLA-E levels in human glioblastomas but not in grade I to III astrocytomas correlate with infiltrating CD8+ cells. *J Neuroimmunol*, 2007. 189(1-2): p. 50-8; Perrin, G., et al., Astrocytoma infiltrating lymphocytes include major T cell clonal expansions confined to the CD8 subset. *Int Immunol*, 1999. 11(8): p. 1337-50; Bucciario, A., et al., Prognostic significance of lymphoid infiltration in cerebral malignant gliomas. *J Neurosurg Sci*, 1990. 34(2): p. 145-8), y ciertas evidencias de inmunidad específica de tumor cerebral (Tang, J., et al., Glioblastoma patients exhibit circulating tumor-specific CD8+ T cells. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(14): p. 5292-9).

Sin embargo, el inevitable crecimiento progresivo del GBM indica que el control inmunitario eficaz del glioma humano es poco probable que ocurra espontáneamente. A pesar de ello, muchos estudios en modelos animales han demostrado el gran potencial de la inmunoterapia para los tumores cerebrales (Mittelbronn, M., et al., Elevated HLA-E levels in human glioblastomas but not in grade I to III astrocytomas correlate with infiltrating CD8+ cells. *J Neuroimmunol*, 2007. 189(1-2): p. 50-8; Perrin, G., et al., Astrocytoma infiltrating lymphocytes include major T cell clonal expansions confined to the CD8 subset. *Int Immunol*, 1999. 11(8): p. 1337-50; Bucciario, A., et al., Prognostic significance of lymphoid infiltration in cerebral malignant gliomas. *J Neurosurg Sci*, 1990. 34(2): p. 145-8; Tang, J., et al., Glioblastoma patients exhibit circulating tumor-specific CD8+ T cells. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(14): p. 5292-9; Maus, M.V., et al., Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*, 2014. 123(17): p. 2625-35). Esto ha conllevado un mayor número de ensayos clínicos sobre el GBM que utilizan la transferencia de células adoptivas (Reardon, D.A., et al., An update on vaccine therapy and other immunotherapeutic approaches for glioblastoma. *Expert Rev Vaccines*, 2013. 12(6): p. 597-615), la vacunación específica usando antígenos (Saikali, S., et al., Expression of nine tumour antigens in a series of human glioblastoma multiforme: interest of EGFRvIII, IL13Ralpha2, gp100 and TRP-2 for immunotherapy. *J Neurooncol*, 2007. 81(2): p. 139-48; Schuster, J., et al., A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro Oncol*, 2015. 17(6): p. 854-61), o las vacunas con células dendríticas (DC) (Nakada, M., Y. Hayashi, and J. Hamada, Role of Eph/ephrin tyrosine kinase in malignant glioma. *Neuro Oncol*, 2011. 13(11): p. 1163-70; Phuphanich, S., et al., Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2013. 62(1): p. 125-35). El sistema inmunitario puede reconocer y, en cierta medida, eliminar las células tumorales; sin embargo, esta respuesta antitumoral a menudo es de baja amplitud e ineficiente. El impulso de esta débil respuesta antitumoral con la vacunación terapéutica ha sido un objetivo muy buscado en la terapia contra el cáncer. La modulación del sistema inmune para mejorar la respuesta inmune se ha convertido en un enfoque terapéutico prometedor en oncología, ya que se puede combinar con tratamientos de cuidados estándar.

Los datos preclínicos prometedores y los avances en los ensayos clínicos, incluida la reciente aprobación por la FDA de la vacuna Sipuleucel-T y del anticuerpo anti-CTLA-4, demuestran que la inmunización activa es una modalidad de tratamiento segura y factible para ciertos tipos de cáncer. Se ha estudiado la inducción de respuestas inmunes mediadas por linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de tumor utilizando diferentes enfoques, que incluyen vacunas de células tumorales modificadas, vacunas peptídicas, vectores virales recombinantes, ADN, proteínas o vacunas de células dendríticas. Sin embargo, la inmunidad antitumoral mediada por CTL solo se correlaciona ocasionalmente con la regresión tumoral y solo unos pocos proyectos han alcanzado la fase clínica III.

En general, las vacunas contra el cáncer han demostrado una eficacia clínica muy limitada hasta el momento. De hecho, a finales de 2011, entre los 300 centenares de ensayos clínicos de vacunas contra el cáncer en curso, sólo se reportaron 19 ensayos de fase III (GlobalData, 2012). Entre ellos, NeuVax, una vacuna peptídica contra el cáncer de mama, Stimuvax, una vacuna basada en liposomas para el carcinoma de pulmón de células

no pequeñas (NSCLC) y el cáncer de mama, TC4010, una vacuna basada en vaccinia para el NSCLC, y GSK1572932A, un liposoma adyuvante para el NSCLC. Estas cuatro vacunas contra el cáncer se basan en diferentes tecnologías y tienen en común que están enfocadas a un único antígeno.

- 5 Las vacunas terapéuticas contra el cáncer se pueden dividir en dos categorías principales: vacunas personalizadas (autólogas) y vacunas estandarizadas, y se clasifican a su vez en función de la plataforma tecnológica. Las vacunas personalizadas actuales incluyen vacunas de lisados tumorales así como vacunas basadas en células dendríticas (en adelante basadas en células). Para las últimas, puede producirse una carga de antígeno ya sea con un enfoque usando lisados tumorales o con la transfección con ARN extraído de tumores. En este caso, los antígenos son específicos o asociados al tumor, pero no están claramente definidos.
- 10 Las células dendríticas también se pueden cargar con antígenos definidos, ya sea con un enfoque peptídico o empleando una proteína, tal como la fosfatasa ácida prostática (PAP) utilizada para diseñar la vacuna Provenge®. Sin embargo, el proceso de fabricación de estas terapias basadas en células es lleva mucho tiempo y mucha mano de obra, a la vez que los estándares de calidad son difíciles de alcanzar y mantener. La inmunomonitorización genera otras complicaciones. Además, la mayoría de las vacunas autólogas contra el
- 15 cáncer no permiten controlar las identidades o las cantidades de los antígenos utilizados, a diferencia de las vacunas definidas y estandarizadas.

- En contraste con la terapia basada en células (APC, células T, CAR, lisados), las subunidades de vacunas (proteínas o péptidos) permiten el desarrollo de una vacuna estandarizada con una producción más fácil y una reproducibilidad por lotes significativamente mejor que puede ser administrada a una amplia gama de
- 20 pacientes. Además, los antígenos están completamente definidos, permitiendo una mejor control inmune y reduciendo el riesgo de efectos no deseados de los componentes de la vacuna.

- Los diferentes enfoques que se han evaluado en el desarrollo preclínico y clínico incluyen vacunas de péptidos cortos (Slingluff CL, Jr. The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination? Cancer journal 2011;17(5):343-50), vacunas de péptidos largos (Melief CJ, van der Burg SH. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. Nature reviews Cancer 2008; 8(5):351-60) y proteínas. Al contrario que las vacunas de péptidos largos y proteínas, las vacunas de péptidos cortos tienen una vida media muy corta y pueden tener consecuencias negativas en la respuesta inmune.
- 25

- Para las vacunas basadas en proteínas, se han esperado con entusiasmo los resultados de dirigir MAGE-A3 con una vacuna basada en proteínas de fusión recombinante después de los datos prometedores de fase II en melanoma metastásico (Kruit WH, Suciú S, Dreno B, Mortier L, Robert C, Chiarion-Sileni V, et al. Selection of immunostimulant AS15 for active immunization with MAGE-A3 protein: results of a randomized phase II study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group in Metastatic Melanoma. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 2013; 31(19):2413-20)
- 30 y para cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSLC) (Vansteenkiste J, Zielinski M, Linder A, Dahabreh J, Gonzalez EE, Malinowski W, et al. Adjuvant MAGE-A3 immunotherapy in resected non-small-cell lung cancer: phase II randomized study results. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 2013;31(19):2396-403). Sin embargo, en 2013, la fase de ensayo III DERMA en melanoma (NCT00796445) no cumplía con su primer criterio de valoración co-primario, seguida en 2014 por una parada del estudio en fase III MAGRIT de NSCL (NCT00480025). A pesar de estos resultados clínicos muy decepcionantes, las vacunas basadas en proteínas innegablemente tienen muchas ventajas.
- 35
- 40

- En general, se administra una vacuna terapéutica contra el cáncer a pacientes de cáncer para fortalecer la capacidad de su sistema inmunológico de reconocer y matar las células tumorales. El objetivo principal de una vacuna terapéutica contra el cáncer es generar células T asesinas (también llamadas linfocitos T citotóxicos)
- 45 específicas para las células tumorales. Con este fin y para lograr una respuesta inmune potente, la vacuna debe contener moléculas llamadas antígenos, que también están presentes en el tumor y que necesitan ser suministradas a las células presentadoras de antígeno (APC), en especial a las células dendríticas (DC), para permitir iniciar la inmunidad frente al cáncer. Las DC procesan estos antígenos tumorales en pequeños péptidos que son presentados en la superficie celular expresados como moléculas MHC de clase I o de clase II a las
- 50 células T. Los péptidos que entonces son reconocidos por las células T y así inducen su estimulación se denominan epítomos. La presentación mediante las moléculas MHC de clase I y II permite la activación de dos clases de células T, los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ y las células T helper (T_H) CD4⁺, respectivamente. Además, para llegar a activarse por completo, además las células T reconocedoras de antígeno requieren una segunda señal, la señal co-estimuladora, que es no específica de antígeno y es proporcionada por la interacción
- 55 entre las moléculas co-estimuladoras expresadas en la superficie de las APC y las células T. Por tanto, dos requisitos principales para una vacuna terapéutica eficaz frente al cáncer son la especificidad de los antígenos tumorales y la capacidad de suministrarlos de manera eficiente a los DC.

Tomados en conjunto, la inducción de una respuesta inmune específica de tumor requiere así tres etapas principales: (i) un antígeno debe ser suministrado a las células dendríticas, que lo procesarán en epítomos, (ii) las células dendríticas deben recibir una señal de activación adecuada y (iii) las células dendríticas cargadas con el antígeno tumoral activado deben generar respuestas inmunes mediadas por las células T en los órganos linfoides.

Dado que las células tumorales pueden escapar del sistema inmune mediante la sub-regulación de la expresión de antígenos individuales (escape inmune pasivo), el suministro de antígeno multi-epitópico proporciona una ventaja. De hecho, las vacunas basadas en proteínas permiten el suministro de antígenos multi-epitópicos a las células presentadoras de antígeno (APC), tales como células dendríticas (DC), sin la limitación de restringirse a un único alelo MHC. Otro punto fuerte es la presentación duradera de epítomo recientemente descrita en las células dendríticas cargadas con proteínas (van Montfoort N, Camps MG, Khan S, Filippov DV, Weterings JJ, Griffith JM, et al. Antigen storage compartments in mature dendritic cells facilitate prolonged cytotoxic T lymphocyte cross-priming capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106(16):6730-5). Además, las proteínas requieren la captación y el procesamiento por las DC para lograr la presentación MHC restringida de sus epítomos constitutivos. Esto reduce el riesgo de inducir una tolerancia periférica como se ha sido demostrado después de la vacunación con péptidos cortos que no tienen tales requisitos de procesamiento rigurosos (Toes RE, Ofringa R, Blom RJ, Melief CJ, Kast WM. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93(15):7855-60).

Sin embargo, la mayoría de las proteínas solubles generalmente son degradadas en endolisosomas y son escasamente presentadas-reticuladas en moléculas MHC de clase I y, por ello, son escasamente inmunogénicas para las respuestas de las células T CD8⁺ (Rosalia RA, Quakkelaar ED, Redeker A, Khan S, Camps M, Drijfhout JW, et al. Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *European journal of immunology* 2013; 43(10):2554-65). Además, aunque las DC maduras son más potentes que las células DC inmaduras en el cebado y la obtención de las respuestas de las células T (Apetoh L, Locher C, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. Harnessing dendritic cells in cancer. *Semin Immunol.* 2011; 23:42-49), pierden la capacidad de tomar eficientemente antígenos exógenos, en particular por los antígenos limitados de las MHC clase II (Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392:245-252). Como resultado, las DC pulsadas con péptidos como vacunas tienen diversas limitaciones. Por ejemplo, la degradación del péptido, el rápido recambio de las MHC de clase I y la disociación del péptido de las moléculas de MHC de clase I durante la preparación e inyección de DC/péptidos puede dar lugar a vidas medias cortas de los complejos MHC de clase I/péptido en la superficie de las DC, lo que conduce a respuestas débiles de las células T.

Para mejorar la eficacia de la administración de vacunas basadas en proteínas, se ha propuesto el uso de péptidos penetradores celulares para la administración intracelular de péptidos del cáncer en las DC (Wang RF, Wang HY. Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells. *Nat Biotechnol.* 2002; 20:149-156). Los péptidos penetradores celulares (CPP) son péptidos de 8 a 40 residuos que tienen la capacidad de atravesar la membrana celular y entrar en la mayoría de los tipos celulares (Copolovici DM, Langel K, Eriste E, Langel U. Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS nano* 2014;8(3):1972-94, Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 2012). Alternativamente, también se denominan dominios de transducción de proteínas (PTD), reflejando su origen como algo que ocurre en las proteínas naturales. Se han identificado varios CPP potentes a partir de proteínas, incluida la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana, la proteína VP22 del virus del herpes simple y el factor de crecimiento de fibroblastos (Berry CC. Intracellular delivery of nanoparticles via the HIV-1 tat peptide. *Nanomedicine.* 2008; 3:357-365; Deshayes S, Morris MC, Divita G, Heitz F. Cellpenetrating peptides: Tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62:1839-1849; Edenhofer F. Protein transduction revisited: Novel insights into the mechanism underlying intracellular delivery of proteins. *Curr Pharm Des.* 2008; 14:3628-3636; Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57:637-651; Torchilin VP. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006; 8:343-375). Se descubrió que la actividad de las células T inducida por DC/TAT-TRP2 era 3 a 10 veces mayor que la inducida por DC/TRP2 (Wang HY, Fu T, Wang G, Gang Z, Donna MPL, Yang JC, Restifo NP, Hwu P, Wang RF. Induction of CD4⁺ T cell-dependent antitumor immunity by TAT-mediated tumor antigen delivery into dendritic cells. *J Clin Invest.* 2002a; 109:1463-1470).

Además, las vacunas de subunidades (péptidos o proteínas) son poco inmunogénicas. Por tanto, en el contexto de las vacunas terapéuticas del cáncer, es obligatorio añadir un potente adyuvante a la vacuna con el fin de aumentar el nivel de moléculas co-estimuladoras en las DC y, con ello, aumentar la respuesta del sistema inmune a los antígenos diana. Los adyuvantes realizan esta tarea por emulación de los componentes microbianos conservados que son naturalmente reconocidos por el sistema inmune. Incluyen lipopolisacáridos (LPS), componentes de la paredes celulares bacterianas y ácidos nucleicos tales como ARN de doble hebra

(ARNds), ADN monohebra (ADNss) y ADN que contiene dinucleótidos CpG no metilados. Su presencia en conjunto con la vacuna puede aumentar en gran medida la respuesta inmune innata al antígeno. Además, este adyuvante debe promover una respuesta inmune adaptativa con CTL y de tipo polarizado Th1 en lugar de una respuesta inmune humoral que resulte en la producción de anticuerpos. Se han evaluado diferentes

5 adyuvantes, de los que solo un número limitado han sido aprobados para uso humano. Éstos incluyen Alum, MPL (monofosforil lípido A) y AS04 (Alum y MPL) en EE.UU. y MF59 (emulsión aceite-en-agua), ASO₄, liposomas en Europa (Lim, Y.T., Vaccine adjuvant materials for cancer immunotherapy and control of infectious disease. Clin Exp Vaccine Res, 2015. 4(1): p. 54-8).

Recientemente, los ligandos de receptores tipo Toll (TLR) están surgiendo como una prometedora clase de

10 adyuvantes (Baxevanis, C.N., I.F. Voutsas, and O.E. Tsitsilonis, Toll-like receptor agonists: current status and future perspective on their utility as adjuvants in improving anticancer vaccination strategies. Immunotherapy, 2013. 5(5): p. 497-511). Así, los desarrollos significativos de los estudios de vacunas contra el cáncer incluyen diversos agonistas de TLR en formulaciones de vacunas, incluyendo TLR-3 (poli I:C), TLR-4 (monofosforil lípido A; MPL), TLR-5 (flagelina), TLR-7 (imiquimod) y TLR-9 (CpG) (Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use

15 of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. Immunol Rev. 2011; 239:178-196). Los tipos de señalización y las citoquinas producidas por las células inmunes después de la estimulación de TLR controlan la diferenciación de las células T CD4⁺ en células Th1, Th2, Th17 y Treg. La estimulación de las células inmunes, tales como células DC y T, por la mayoría de los adyuvantes basados en TLR produce citoquinas proinflamatorias y promueve las respuestas Th1 y T CD8⁺ (Manicassamy S, Pulendran B. Modulation of

20 adaptive immunity with Toll-like receptors. Semin Immunol. 2009; 21:185-193).

La conjugación de la vacuna con un ligando TLR es un enfoque atractivo que ofrece diversas ventajas sobre las vacunas no conjugadas, incluyendo (i) la captación preferencial por las células inmunes que expresan las TLR, (ii) mayor respuesta inmune y (iii) reducción del riesgo de inducción de tolerancia periférica. De hecho, todas las células presentadoras de antígeno cargadas con el antígeno se activarán simultáneamente.

25 Diferentes grupos exploraron este enfoque con diversos ligandos de TLR principalmente ligados químicamente a la vacuna de péptido o proteína (Zom GG, Khan S, Filippov DV, Ossendorp F. TLR ligand-peptide conjugate vaccines: toward clinical application. Adv Immunol. 2012; 114:177-201). Dado que el enlace químico al péptido se lleva a cabo fácilmente, los ligandos TLR más investigados para las vacunas conjugadas son los agonistas de TLR2 Pam2Cys y Pam3Cys (Fujita, Y. and H. Taguchi, Overview and outlook of Toll-like receptor ligand-

30 antigen conjugate vaccines. Ther Deliv, 2012. 3(6): p. 749-60).

Sin embargo, hasta la fecha, la mayoría de los ensayos de vacunas del cáncer han demostrado una eficacia limitada. Una explicación es la falta de una terapia que simultáneamente pueda (i) estimular la inmunidad multi-epitopo mediada por las células T citotóxicas, (ii) inducir células T_h y (iii) promover la memoria inmunológica. Estos tres parámetros son esenciales para generar una inmunidad anti-tumoral potente, de larga duración. De

35 hecho, CTL específicas para diferentes epítopos permitirán la destrucción de más células cancerosas dentro de una masa tumoral heterogénea y evitar la consecuencia de variantes de pérdida de antígeno (escape del tumor inmune). Las células T_h están implicadas en el mantenimiento de la inmunidad celular de larga duración y la infiltración del tumor por células T_h es también un paso esencial para el reclutamiento y la función de las células CTL CD8⁺. La memoria inmunológica es esencial para proteger contra la recidiva tumoral.

40 En vista de lo anterior, es el objeto de la presente invención superar los inconvenientes de las vacunas actuales contra el cáncer indicadas anteriormente y proporcionar un nuevo complejo para aplicaciones de inmunoterapia del glioma, en particular del glioblastoma, que representen una vacuna más potente, con una actividad antitumoral mejorada, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma.

Este objeto se consigue a partir de la materia que figura a continuación y en las reivindicaciones adjuntas.

45 Aunque la presente invención se describe en detalle a continuación, ha de entenderse que esta invención no está limitada a las metodologías, protocolos y reactivos particulares aquí descritos, ya que éstos pueden variar. Debe entenderse también que la terminología usada aquí no pretende limitar el alcance de la presente invención, que está limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos aquí empleados tienen los mismos significados que los comúnmente

50 entendidos por un experto medio en la técnica.

En lo que sigue, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas; sin embargo, se debe entender que se pueden combinar de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los diversos ejemplos descritos y las formas de realización preferentes no se deben interpretar como limitativos de la presente invención a solo los ejemplos

55 de realización descritos explícitamente. Esta descripción debe entenderse para soportar y abarcar formas de realización que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos descritos y/o preferentes. Además, debe considerarse que cualquier permutación y combinación de todos los

elementos descritos en esta solicitud está descrita en la descripción de la presente solicitud, a menos que el contexto indique lo contrario.

- A lo largo de esta memoria y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, el término "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un determinado miembro, número entero o paso, pero no la exclusión de cualquier otro miembro, número entero o paso no establecido. El término "consistir en" es una forma de realización particular del término "comprender", donde se excluye cualquier otro miembro, número entero o paso no establecido. En el contexto de la presente invención, el término "comprender" abarca el término "consistir en". Por tanto, el término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

- Los términos "un" y "una" y "el" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario aquí o se contradiga claramente en el contexto. La inclusión de intervalos de valores en este documento sólo pretende servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora en la memoria como si se citara individualmente en este documento. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como una indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

- La palabra "esencialmente" no excluye "completamente", por ejemplo una composición que está "esencialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "esencialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa $x \pm 10\%$.

Complejos para su uso de acuerdo con la presente invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un complejo que comprende:

- a) un péptido de penetración celular;
- b) al menos un antígeno o epítipo antigénico; y
- c) al menos un péptido agonista de TLR,

- donde los componentes a) - c), es decir, el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o epítipo antigénico y el al menos péptido agonista de TLR están unidos covalentemente, para su uso en la prevención y/o en el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma.

Dicho complejo para su uso según la presente invención proporciona simultáneamente (i) la estimulación de la inmunidad mediada por células T citotóxicas multi-epitópicas, (ii) la inducción de células T_H y (iii) la promoción de la memoria inmunológica. Así, un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención proporciona una potente vacuna, en particular con una actividad anti-tumoral mejorada.

- El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un polipéptido o una proteína, en particular un polipéptido recombinante o una proteína recombinante, preferiblemente una proteína de fusión recombinante o un polipéptido de fusión recombinante. El término "recombinante" tal como se usa aquí significa que (aquí: el polipéptido o la proteína) no se produce naturalmente. En consecuencia, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, que es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante, comprende típicamente los componentes a) a c), donde los componentes a) a c) son de diferente origen, es decir, no se encuentran naturalmente en esta combinación.

- En el contexto de la presente invención, esto es a lo largo de toda la presente solicitud, los términos "péptido", "polipéptido", "proteína" y variaciones de éstos se refieren a un péptido, oligopéptido, oligómero o proteína, incluyendo proteína de fusión, respectivamente, que comprende al menos dos aminoácidos unidos entre sí preferentemente por un enlace peptídico normal, o, alternativamente, por un enlace peptídico modificado, tal como, por ejemplo, en el caso de péptidos isostéricos. El péptido, polipéptido o la proteína puede estar compuesto de L-aminoácidos y/o D-aminoácidos. Preferentemente, un péptido, polipéptido o proteína o bien está compuesto (enteramente) por L-aminoácidos o bien está compuesto (enteramente) por D-aminoácidos, formando así "secuencias peptídicas retro-inversas". El término "secuencia (peptídica) retro-inversa" se refiere a un isómero de una secuencia peptídica lineal en la que se invierte la dirección de la secuencia y se invierte la quiralidad de cada residuo aminoácido (véase, por ejemplo Jameson et al., Nature, 368,744-746 (1994); Brady et al., Nature, 368,692-693 (1994)). En particular, los términos "péptido", "polipéptido", "proteína" también incluyen "peptidomiméticos", que se definen como análogos de péptidos que contienen elementos estructurales

no peptídicos, los cuales son capaces de imitar o antagonizar la acción biológica de un péptido parental natural. Un peptidomimético carece de características de los péptidos clásicos, tales como enlaces peptídicos enzimáticamente escindibles. En particular, el péptido, polipéptido o la proteína pueden comprender aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos definidos por el código genético, además de estos aminoácidos, o pueden estar compuestos por aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos definidos por el código genético. En particular, un péptido, polipéptido o una proteína en el contexto de la presente invención también puede estar compuesto por aminoácidos modificados mediante procesos naturales, tales como procesos de maduración post-traduccionales, o mediante procesos químicos, los cuales son bien conocidos por el experto en la técnica. Tales modificaciones están bien detalladas en la literatura. Estas modificaciones pueden aparecer en cualquier lugar del polipéptido: en el esqueleto peptídico, en la cadena de aminoácidos o incluso en los extremos terminales carboxi o amino. En particular, un péptido o polipéptido puede ser ramificado después de una ubiquitinación o ser cíclico, con o sin ramificación. Este tipo de modificación puede ser resultado de procesos de post-traduccionales naturales o sintéticos, bien conocidos por el experto en la técnica. Los términos "péptido", "polipéptido", "proteína" en el contexto de la presente invención, en particular también incluyen péptidos, polipéptidos y proteínas modificados. Por ejemplo, modificaciones de un péptido, polipéptido o proteína pueden incluir acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, fijación covalente de un nucleótido o de un derivado de nucleótido, fijación covalente de un lípido o de un derivado lipídico, fijación covalente de un fosfatidilinositol, reticulación covalente o no covalente, ciclización, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, glicosilación, incluyendo pegilación, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesos proteolíticos, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, adición de aminoácidos, tal como arginilación, o ubiquitinación. Estas modificaciones están totalmente detalladas en la literatura (Proteins Structure and Molecular Properties (1993) 2nd Ed., T. E. Creighton, New York ; Post-translational Covalent Modifications of Proteins (1983) B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York ; Seifter et al. (1990) Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. 182: 626-646 and Rattan et al., (1992) Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci, 663: 48-62). Por consiguiente, los términos "péptido", "polipéptido", "proteína" preferentemente incluyen, por ejemplo, lipopéptidos, lipoproteínas, glicopéptidos, glicoproteínas y similares.

Sin embargo, en una realización particularmente preferente, el complejo para su uso según la presente invención es un péptido, polipéptido o proteína "clásico", donde un péptido, polipéptido o proteína "clásico" está compuesto típicamente por aminoácidos seleccionados de entre los 20 aminoácidos definidos por el código genético vinculados entre sí por enlaces peptídicos normales.

Si el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un polipéptido o una proteína, es preferente que comprenda al menos 50, al menos 60, al menos 70, preferentemente al menos 80, al menos 90, más preferentemente al menos 100, al menos 110, incluso más preferiblemente al menos 120, al menos 130, con especial preferencia al menos 140 o más preferiblemente al menos 150 residuos aminoácidos.

Componente a) - Péptido de penetración celular

El CPP permite la entrega eficiente, es decir, el transporte y la carga, en particular de al menos un antígeno o epítipo antigénico dentro de la células presentadoras de antígeno (APC), en particular dentro de las células dendríticas (DC), y así a la maquinaria de procesamiento de antígenos en las células dendríticas.

El término "péptido de penetración celular" ("CPP") generalmente se emplea para designar péptidos cortos que son capaces de transportar diferentes tipos de moléculas de carga a través de la membrana plasmática, y, así, facilitar la captación celular de diversas cargas moleculares (desde partículas de tamaño nanométrico a pequeñas moléculas químicas y grandes fragmentos de ADN). La "internalización celular" de la molécula de carga ligada al péptido de penetración celular generalmente significa el transporte de la molécula de carga a través de la membrana plasmática y así la entrada de la molécula de carga en la célula. Dependiendo del caso particular, la molécula de carga puede entonces ser liberada en el citoplasma, dirigida a un orgánulo intracelular, o también ser presentada en la superficie celular. La capacidad de penetración celular, o la internalización, del péptido de penetración celular o del complejo que comprende dicho péptido de penetración celular de acuerdo con la invención puede verificarse mediante métodos estándar conocidos por un experto en la técnica, incluyendo citometría de flujo o microscopía de fluorescencia de células vivas y fijadas, inmunocitoquímica de células transducidas con dicho péptido o complejo y Western blot.

Los péptidos de penetración celular tienen típicamente una composición de aminoácidos que o bien contiene una alta abundancia relativa de aminoácidos cargado positivamente como lisina o arginina o bien tiene una secuencia que contiene un patrón alternante aminoácidos polares/cargados y aminoácidos no polares hidrófobos. Estos dos tipos de estructuras se conocen como policatiónica o anfipática, respectivamente. Los péptidos de penetración celular tienen diferentes tamaños, secuencias de aminoácidos y cargas, pero todos los CPP tienen una característica común, que es la capacidad de translocar la membrana plasmática y facilitar el suministro de diversas cargas moleculares al citoplasma o a un orgánulo de una célula. En la actualidad, las

teorías de translocación CPP distinguen tres mecanismos de entrada principales: penetración directa en la membrana, entrada mediada por endocitosis y translocación por formación de una estructura transitoria. La transducción de los CPP es un área de investigación en curso. Los péptidos de penetración celular han encontrado numerosas aplicaciones en medicina como agentes de suministro de medicamentos en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer e inhibidores virales, así como agentes de contraste para el etiquetado celular y la formación de imágenes.

Típicamente, los péptidos de penetración celular (CPP) son péptidos de 8 a 50 residuos con la capacidad de atravesar la membrana celular y entrar en la mayoría de los tipos de células. Alternativamente, también se denominan dominio de transducción de proteína (PTD), que refleja su origen como algo que ocurre en las proteínas naturales. Frankel y Pabo, simultáneamente con Green y Lowenstein, describen la capacidad del activador de la transcripción de la trans-activación del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-TAT) para penetrar en las células (Frankel, A.D. and C.O. Pabo, Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. Cell, 1988. 55(6): p. 1189-93). En 1991 se describió la transducción en las células neuronales del homeodominio Antennapedia (dominio de unión a ADN) de *Drosophila melanogaster* (Joliot, A., et al., Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(5): p. 1864-8). En 1994, se caracterizó el primer péptido 16-mer CPP llamado penetratina, que tiene la secuencia de aminoácidos RQIKIYFQNRMRMKWKK (SEQ ID NO: 1) a partir de la tercera hélice del homeodominio de Antennapedia (Derossi, D., et al., The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. J Biol Chem, 1994. 269(14): p. 10444-50), seguido en 1998 por la identificación del dominio mínimo de TAT, que tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), necesario para la transducción de proteínas (Vives, E., P. Brodin, y B. Lebleu, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. J Biol Chem, 1997. 272(25): p. 16010-7). Durante las últimas dos décadas, se han descrito docenas de péptidos de diferentes orígenes, incluyendo proteínas virales, por ejemplo VP22 (Elliott, G. y P. O'Hare, Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. Cell, 1997. 88(2): p. 223-33) y ZEBRA (Rothe, R., et al., Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. J Biol Chem, 2010. 285(26): p. 20224-33), o de venomas, por ejemplo melitina (Dempsey, C.E., The actions of melittin on membranes. Biochim Biophys Acta, 1990. 1031(2): p. 143-61), mastoporan (Konno, K., et al., Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum* micado). Toxicon, 2000. 38(11): p. 1505-15), maurocalcina (Esteve, E., et al., Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. J Biol Chem, 2005. 280(13): p. 12833-9), crotamina (Nascimento, F.D., et al., Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. J Biol Chem, 2007. 282(29): p. 21349-60) o buforina (Kobayashi, S., et al., Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. Biochemistry, 2004. 43(49): p. 15610-6). También se han diseñado CPP sintéticos, incluyendo la poliarginina (R8, R9, R10 y R12) (Futaki, S., et al., Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. J Biol Chem, 2001. 276(8): p. 5836-40) o el transportano (Pooga, M., et al., Cell penetration by transportan. FASEB J, 1998. 12(1): p. 67-77). Cualquiera de los CPP arriba descritos pueden emplearse como péptido de penetración celular, es decir como componente a), en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. En particular, el componente a), es decir el CPP, en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender el dominio mínimo de TAT, que tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2). En particular, el componente a), es decir el CPP, en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender penetratina, con la secuencia de aminoácidos RQIKIYFQNRMRMKWKK (SEQ ID NO: 1).

En la revisión: Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16): 850-60, 2012, también se describen diversos CPP que pueden emplearse como péptido penetrante de células, es decir como componente a), en el complejo para su uso según la presente invención. En otras palabras, los CPP descritos en Milletti, F., 2012, 2012, Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16): 850-60 se puede usar como péptido de penetración celular, es decir como componente a), en el complejo para su uso según la presente invención. Esto incluye, en particular, CPP catiónicos, CPP anfipáticos y CPP hidrófobos, así como CPP derivados de proteínas de unión a hepanano, ARN y ADN (véase la Tabla 1 de Milletti, F., Cellpenetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16): 850-60, 2012), CPP derivados de péptidos señal (véase la Tabla 2 de Milletti, F., Cellpenetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16): 850-60, 2012), CPP derivados de péptidos antimicrobianos (véase la Tabla 3 de Milletti, F., Cellpenetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16): 850-60, 2012), CPP derivados de proteínas virales (véase la Tabla 4 de Milletti, F., Cellpenetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16): 850-60, 2012), CPP derivados de diversas proteínas naturales (véase la Tabla 5 de Milletti, F., Cellpenetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16): 850-60, 2012) y CPP diseñados y CPP derivados de librerías de péptidos (véase la Tabla 6

de Milletti, F., Cellpenetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today 17 (15-16): 850-60, 2012).

Preferentemente, el péptido de penetración celular, que está comprendido en el complejo para su uso según la presente invención,

- 5 i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferiblemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferiblemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y/o
- 10 ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el residuo 170 hasta el residuo 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos, eliminados y/o añadidos sin abrogar dicha capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de secuencia de dicho fragmento.

Por tanto, preferentemente el péptido de penetración celular, que está comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención,

- 15 i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferiblemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferiblemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y
- 20 ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el residuo 170 hasta el residuo 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos, eliminados y/o añadidos sin abrogar dicha capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de secuencia de dicho fragmento.

Tales CPP preferentes se describen en la WO 2014/041505.

- 25 El término "ZEBRA" (también conocido como Zta, Z, EB1 o BZLF1) generalmente significa el activador transcripcional de la cremallera de leucina básica (bZIP) del virus Epstein-Barr (EBV). Se ha identificado que el dominio mínimo de ZEBRA, que exhibe propiedades de penetración celular, abarca desde el residuo 170 hasta el residuo 220 de ZEBRA. La secuencia de aminoácidos de ZEBRA está descrita con el número de acceso NCBI YP_401 673 y comprende los 245 aminoácidos representados en la SEQ ID NO: 3:

MMDPNSTSEDVKFTDPYQVPFVQAFDQATRVYQDLGGPSQAPLPCVLWPVLPEPLPQGQL
TAYHVVSTAPGWSFAPQAPENAYQAYAAPQLFPVSDITQNQQTNQAGGEAPQPGDNST
VQTAAAVVFACPGANQGQQLADIGVPQPAPVAAPARRTRKPQQPESLEECDSELEIKRYKNR
30 VASRKCRKFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLLLKQMCPSLDVDSIIPRTPDVLHEDLLNF
(SEQ ID NO: 3 - Secuencia de aminoácidos ZEBRA (secuencia natural del virus Epstein - Barr (EBV))
(YP_401 673))

- 35 Recientemente se ha descrito un CPP derivado de la proteína viral ZEBRA para transducir cargas proteicas a través de membranas biológicas por medio de (i) translocación directa y (ii) endocitosis mediada por balsa lipídica (Rothe R, Liguori L, VillegasMendez A, Marques B, Grunwald D, Drouet E, et al. Characterization of the cell-penetrating properties of the EpsteinBarr virus ZEBRA trans-activator. The Journal of biological chemistry 2010;285(26):20224-33). Los presentes inventores suponen que estos dos mecanismos de entrada deberían promover la presentación restringida tanto de MHC de clase I como II de antígenos de carga a las células T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente. En consecuencia, tal CPP puede suministrar péptidos multi-epitópicos a las
- 40 células dendríticas (DC) y posteriormente promover la activación de las células CTL y Th y la función antitumoral. Tal CPP puede así entregar eficientemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención a las células presentadoras de antígeno (APC) y conducir a una presentación restringida de MHC de clase I y II multi-epitópica.

- 45 En el contexto de la presente invención, el término "MHC de clase I" designa una de las dos clases principales de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Las moléculas MHC de clase I (también conocidas como "MHC I") se encuentran en cada célula nucleada del cuerpo. La función de las MHC clase I es mostrar un epítipo a las células citotóxicas (CTL). En los humanos, las moléculas MHC de clase I consisten en dos cadenas de polipéptidos, α - y β 2-microglobulina (b2m). Solo la cadena α es polimórfica y está codificada por un gen HLA, mientras que la subunidad b2m no es polimórfica y está codificada por el gen de la microglobulina Beta-2.
- 50 En el contexto de la presente invención, el término "MHC clase II" designa la otra clase primaria de las moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor. Las moléculas MHC clase II (también conocidas como

"MHC II") se encuentran solo en unos pocos tipos de células especializadas, incluyendo macrófagos, células dendríticas y células B, todas ellas son células dedicadas presentadoras de antígenos (APC).

- Preferiblemente, la variante de secuencia de un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA como se ha descrito anteriormente comparte, en particular a lo largo de toda la longitud, al menos un 70%, al menos un 75%,
 5 preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, con particular preferencia al menos un 95%, con total preferencia al menos un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con el fragmento del dominio mínimo de ZEBRA descrito anteriormente sin que se anule la capacidad de penetración celular del péptido penetrante de células. En particular, un "fragmento" del dominio mínimo de ZEBRA como se ha definido anteriormente debe entenderse preferiblemente como una
 10 secuencia truncada del mismo, es decir, una secuencia de aminoácidos que está N-terminal, C-terminal y/o intrasecucionalmente truncada en comparación con la secuencia de aminoácidos de la secuencia nativa. Además, dicho "fragmento" del dominio mínimo de ZEBRA preferiblemente tienen una longitud de 5 a 50 aminoácidos en total, preferiblemente de 10 a 45 aminoácidos en total, con especial preferencia de 15 a 45 aminoácidos en total.
- 15 Por consiguiente, el término "variante de secuencia" tal como se usa en el contexto de la presente invención, es decir, a lo largo de la presente solicitud, se refiere a cualquier alteración de una secuencia de referencia. El término "variante de secuencia" incluye variantes de secuencia de nucleótidos y variantes de secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, una secuencia de referencia es cualquiera de las secuencias citadas en la "Tabla de Secuencias y Números de ID SEC" (listado de secuencias), es decir de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ
 20 ID NO: 70. Preferiblemente, una variante de secuencia comparte, en particular a lo largo de toda la secuencia, al menos un 70%, al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, con particular preferencia al menos un 95%, con total preferencia al menos un 99% de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, donde la identidad de secuencia se calcula como se describe a continuación. En particular, una variante de secuencia conserva la función específica de la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se calcula como se describe a continuación. En particular, una variante de secuencia de aminoácidos tiene una secuencia alterada donde uno o más de los aminoácidos de la secuencia de referencia se han eliminado o sustituido o uno o más aminoácidos se han insertado en la secuencia de la secuencia de aminoácidos de referencia. Como resultado de las alteraciones, la variante de la secuencia de aminoácidos tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica
 25 en al menos un 70%, al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, con particular preferencia al menos un 95%, con total preferencia al menos un 99% a la secuencia de referencia. Por ejemplo, variantes de secuencia que son al menos un 90% idénticas no tienen más de 10 alteraciones, es decir, cualquier combinación de deleciones, inserciones o sustituciones, por 100 aminoácidos de la secuencia de referencia.
- 30 En el contexto de la presente invención, una secuencia de aminoácidos que "comparte una identidad de secuencia" de al menos, por ejemplo, el 95% con una secuencia de aminoácidos consulta de la presente invención significa que la secuencia de aminoácidos en cuestión es idéntica a la secuencia de consulta, excepto por que la secuencia de aminoácidos en cuestión puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos consulta. En otras palabras, para obtener una
 35 secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos el 95% con una secuencia de aminoácidos consulta, se puede insertar o sustituir hasta el 5% (5 de 100) de los residuos aminoácidos en la secuencia en cuestión con otros aminoácidos o eliminarse, preferiblemente dentro de las definiciones anteriores de variantes o fragmentos. Lo mismo es, por supuesto, aplicable de manera similar a las secuencias de ácido nucleico.
- 40 Para secuencias (de aminoácidos o de ácido nucleico) sin correspondencia exacta, se puede determinar un "% de identidad" de una primera secuencia con respecto a una segunda secuencia. En general, estas dos secuencias a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de "espacios" en una o ambas secuencias para mejorar el grado de alineación. Entonces se puede determinar el % de identidad sobre la longitud total de cada una de las secuencias comparadas (llamada alineación global), que es particularmente adecuada para secuencias de la misma o similar longitud, o sobre longitudes más cortas y definidas (llamadas alineaciones locales), más adecuado para secuencias de longitud desigual.
- 45 Para secuencias (de aminoácidos o de ácido nucleico) sin correspondencia exacta, se puede determinar un "% de identidad" de una primera secuencia con respecto a una segunda secuencia. En general, estas dos secuencias a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de "espacios" en una o ambas secuencias para mejorar el grado de alineación. Entonces se puede determinar el % de identidad sobre la longitud total de cada una de las secuencias comparadas (llamada alineación global), que es particularmente adecuada para secuencias de la misma o similar longitud, o sobre longitudes más cortas y definidas (llamadas alineaciones locales), más adecuado para secuencias de longitud desigual.
- 50

Los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. El porcentaje al que dos secuencias son idénticas puede determinarse, por ejemplo, empleando un
 55 algoritmo matemático. Un ejemplo preferente, pero no limitativo, de algoritmo matemático que puede usarse es el algoritmo de Karlin et al. (1993), PNAS USA, 90: 5873-5877. Dicho algoritmo está integrado en la familia de programas BLAST, por ejemplo el programa BLAST o NBLAST (ver también Altschul et al., 1 990, J. Mol. Biol. 21 5, 403-41 0 o Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res, 25: 3389-3402), accesible a través de la página de

inicio del NCBI del sitio web ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson (1990), Methods Enzymol. 183, 63-98; Pearson y Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 85, 2444-2448.). Estos programas pueden identificar secuencias que son idénticas a otras secuencias hasta cierto punto. Además, los programas disponibles de Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Res., 387-395), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, pueden usarse para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología o identidad entre dos secuencias de polipéptidos. BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de (Smith y Waterman (1981), J. Mol. Biol. 147, 195-197) y encuentra la mejor región única de similitud entre dos secuencias.

Más preferiblemente, los fragmentos del péptido de penetración celular de acuerdo con la invención o las variantes del mismo como se han descrito anteriormente retienen además la capacidad de dicho péptido para presentar una molécula de carga, tal como antígenos o epítopos antigénicos, en la superficie de una célula, tal como una célula presentadora de antígeno, en el contexto de las moléculas MHC clase I y/o MHC clase II. La capacidad de penetración celular de un péptido o complejo que comprende dicho péptido de penetración celular para presentar una molécula de carga, tal como antígenos o epítopos antigénicos, en la superficie de una célula en el contexto de las moléculas MHC de clase I y/o MHC de clase II puede ser verificada por métodos estándar conocidos por el experto en la técnica, incluyendo la capacidad para estimular la proliferación y/o la función de las células T CD4⁺ o CD8⁺ con restricción de MHC específicas para estos epítopos.

El péptido de penetración celular preferente, que

- i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferiblemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferiblemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y/o
- ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el residuo 170 hasta el residuo 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos, eliminados y/o añadidos sin abrogar dicha capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de secuencia de dicho fragmento

preferentemente comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución de aminoácido conservativa en comparación con la secuencia de referencia, lo que significa que un residuo de aminoácido dado se reemplaza por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares.

Generalmente, las sustituciones de uno o más aminoácidos presentes en la secuencia de aminoácidos de referencia se deben realizar de forma conservativa. Ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu o Ala por otro, o sustituciones de un residuo polar por otro, tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Otras sustituciones conservativas de este tipo, por ejemplo sustituciones de regiones completas que tienen propiedades de hidrofobicidad similares, son bien conocidas (Kyte y Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157(1):105-132). Las sustituciones de uno o más L-aminoácidos por uno o más D-aminoácidos deben considerarse sustituciones conservativas en el contexto de la presente invención. Ejemplos de sustituciones de aminoácidos se muestran en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1

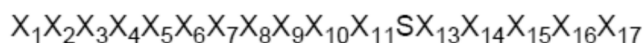
Residuos originales	Ejemplos de sustituciones
Ala (A)	Val, Leu, Ile, Gly
Arg (R)	His, Lys
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro, Ala
His (H)	Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, His
Met (M)	Leu, Ile, Phe
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Tyr, Trp, Met
Pro (P)	Ala, Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe

Tyr (Y)	Trp, Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

De manera particularmente preferente, el péptido de penetración celular preferente, que

- i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferiblemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferiblemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y/o
- 5 ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el residuo 170 hasta el residuo 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos, eliminados y/o añadidos sin abrogar dicha capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de secuencia de dicho fragmento
- 10 comprende una sustitución de Cys (C) por Ser (S) en el equivalente de la posición 189 con respecto a la secuencia de aminoácidos ZEBRA de SEQ ID NO: 3.

Por tanto, se prefiere que dicho péptido de penetración celular preferente tenga una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de acuerdo con la siguiente fórmula general (I):



- 15 donde 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han sustituido, eliminado y/o añadido sin anular la capacidad de dicho péptido de penetración celular, donde
 X_1 es K, R o H, preferentemente X_1 es K o R;
 X_2 es R, K o H, preferentemente X_2 es R o K;
 X_3 es Y, W o F, preferentemente X_3 es Y o W;
- 20 X_4 es K, R o H, preferentemente X_4 es K o R;
 X_5 es N o Q;
 X_6 es R, K o H, preferentemente X_6 es R o K;
 X_7 es V, I, M, L, F o A, preferentemente X_7 es V, I, M o L;
 X_8 es A, V, L, I o G, preferentemente X_8 es A o G;
- 25 X_9 es S o T;
 X_{10} es R, K, o H, preferentemente X_{10} es R o K;
 X_{11} es K, R, o H, preferentemente X_{11} es R o K;
 X_{13} es R, K o H, preferentemente X_{13} es R o K;
 X_{14} es A, V, L, I o G, preferentemente X_{14} es A o G;
- 30 X_{15} es K, R o H, preferentemente X_{15} es K o R;
 X_{16} es F, L, V, I, Y, W o M, preferentemente X_{16} es F, Y o W; y
 X_{17} es K, R o H, preferentemente X_{17} es K o R.

- 35 Preferiblemente, dicho péptido, polipéptido o proteína está compuesto (enteramente) por L-aminoácidos o (enteramente) por D-aminoácidos, formando así "secuencias peptídicas retro-inversas". El término "secuencias retro-inversas (péptido)" se refiere a un isómero de una secuencia peptídica lineal en la que se invierte la dirección de la secuencia y se invierte la quiralidad de cada residuo aminoácido (véase, por ejemplo, Jameson et al., Nature, 368,744-746 (1994); Brady et al., Nature, 368,692-693 (1994)).

- 40 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_1 es K.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_2 es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_3 es Y.

- 45 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_4 es K.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_5 es N.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_6 es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_7 es V.

- 5 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_8 es A.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_9 es S.

- 10 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_{10} es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_{11} es K.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_{13} es R.

- 15 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_{14} es A.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_{15} es K.

- 20 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_{16} es F.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I) donde X_{17} es K.

- 25 En una realización particular, el péptido de penetración celular según la invención es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula general (I) donde el aminoácido en la posición equivalente a la posición 12 con respecto a la fórmula general (I) es Ser (S).

También se prefiere particularmente que el péptido de penetración celular preferido, que

- 30 i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferiblemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferiblemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y/o
ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el residuo 170 hasta el residuo 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos, eliminados y/o añadidos sin abrogar dicha capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de secuencia de dicho fragmento

- 35 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en las secuencias de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 4-13, o variantes de secuencia de las mismos, sin que se anule dicha capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferiblemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sustituidos, eliminados y/o añadidos sin que se anule dicha capacidad de penetración celular del péptido.
40

CPP1 (Z11):
KRYKNRVASRKCRKFKQLLQHYREVAANKSSNDRLRLLKQMC
(SEQ ID NO: 4)

CPP2 (Z12):
KRYKNRVASRKCRKFKQLLQHYREVAANKSSNDRLRLLK
(SEQ ID NO: 5)

CPP3 (Z13):
KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAKSSSENDRLRLLLK
(SEQ ID NO: 6)

CPP4 (Z14):
KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAK
(SEQ ID NO: 7)

CPP5 (Z15):
KRYKNRVASRKSRKFK
(SEQ ID NO: 8)

CPP6 (Z16):
QHYREVAAKSSSEND
(SEQ ID NO: 9)

CPP7 (Z17):
QLLQHYREVAAK
(SEQ ID NO: 10)

CPP8 (Z18):
REVAAKSS END RLRLLLK
(SEQ ID NO: 11)

CPP9 (Z19):
KRYKNRVA
(SEQ ID NO: 12)

CPP10 (Z20):
VASRKSRKFK
(SEQ ID NO: 13)

- Así, es particularmente preferente un péptido de penetración celular que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13),
- 5 SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14), SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15), o SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18), o variantes de secuencia de los mismos, sin que se anule dicha capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferiblemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sustituidos, eliminados y/o añadidos sin que se anule la capacidad de penetración celular de dicho péptido. Además, es especialmente preferente un péptido de penetración celular que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia
- 10 de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) o SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14) o variantes de secuencia del mismo, sin que se anule la capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferiblemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sustituidos, eliminados y/o añadidos sin que se anule la capacidad de penetración celular de dicho péptido. Además, es particularmente preferente un péptido de penetración celular que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia
- 15 de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) o variantes de secuencia del mismo, sin que se anule la capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferiblemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sustituidos, eliminados y/o añadidos sin que se anule la capacidad de penetración celular de dicho péptido.
- En una realización preferida, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención tiene una secuencia
- 20 de aminoácidos que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13).
- En otra realización preferida, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14).
- En otra realización preferida, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15).
- 25 En otra realización preferida, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18).

El experto en la materia entenderá que la secuencia de aminoácidos primaria del péptido de penetración celular de la invención puede modificarse adicionalmente después de la traducción, tal como por glucosilación o fosforilación, sin apartarse de la invención.

5 En una realización adicional, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención opcionalmente comprende, además de su secuencia de aminoácidos como se ha descrito anteriormente, cualquiera de o cualquier combinación de:

i) una señal de localización nuclear (NLS). Dichas señales son bien conocidas por los expertos y se describen en Nair et al. (2003, Nucleic Acids Res. 31(1): 397- 399)

10 ii) un péptido dirigido a diana, incluyendo péptidos buscadores de tumores como aquellos descritos en Kapoor et al. (2012, PLoS ONE 7(4): e35187) y se citan en <http://crdd.osdd.net/raghava/tumorhope/general.php?>

El péptido de penetración celular según la invención está unido a un antígeno o epítipo antigénico y facilita la internalización celular de dicho antígeno o epítipo antigénico.

15 El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender un único péptido de penetración celular o más de un péptido de penetración celular. Preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende no más de cinco péptidos de penetración celular, en especial el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende no más de cuatro péptidos de penetración celular, incluso más preferiblemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención
20 comprende no más de tres péptidos de penetración celular, con particular preferencia el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende no más de dos péptidos de penetración celular y con total preferencia el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende un único péptido de penetración celular.

Componente b) - Antígeno/epítipo antigénico

25 El complejo para su uso según la presente invención comprende como componente b) al menos un antígeno o epítipo antigénico.

Tal como se usa aquí, un "antígeno" es cualquier sustancia estructural que sirve como diana para los receptores de una respuesta inmune adaptativa, en particular como una diana para anticuerpos, receptores de células T y/o receptores de células B. Un "epítipo", también conocido como "determinante antigénico", es la parte (o
30 fragmento) de un antígeno que es reconocido por el sistema inmune, en particular por los anticuerpos, receptores de células T y/o receptores de células B. Así, un antígeno tiene al menos un epítipo, es decir, un solo antígeno tiene uno o más epítipos. En el contexto de la presente invención, el término "epítipo" se usa principalmente para designar epítipos de células T, que se presentan en la superficie de una célula presentadora de antígeno, donde se unen al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Los epítipos de
35 células T presentados por las moléculas MHC de clase I son típicamente, pero no exclusivamente, péptidos de entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, mientras que las moléculas MHC de clase II presentan péptidos más largos, generalmente, pero no exclusivamente, de 12 a 25 aminoácidos de longitud.

Preferiblemente, en el complejo para su uso según la presente invención, el al menos un antígeno o epítipo antigénico se selecciona del grupo consistente en: (i) un péptido, un polipéptido o una proteína, (ii) un
40 polisacárido, (iii) un lípido, (iv) una lipoproteína o un lipopéptido, (v) un glicolípido, (vi) un ácido nucleico y (vii) un fármaco de molécula pequeña o una toxina. Por tanto, el al menos un antígeno o epítipo antigénico puede ser un péptido, una proteína, un polisacárido, un lípido, una combinación de los mismos que incluye lipoproteínas y glucolípidos, un ácido nucleico (por ejemplo ADN, ARNsi, ARNsh, oligonucleótidos antisentido, ADN señuelo, plásmido) o un fármaco de moléculas pequeñas (por ejemplo ciclosporina A, paclitaxel,
45 doxorubicina, metotrexato, ácido 5-aminolevulínico), o cualquier combinación de los mismos, en particular si hay más de un antígeno o epítipo antigénico en el complejo inventivo.

Se entiende que el al menos un antígeno o epítipo antigénico puede comprender, por ejemplo, al menos uno, es decir, uno o más, péptidos, polipéptidos o proteínas unidos entre sí y/o al menos uno, es decir, uno o más, ácidos nucleicos, por ejemplo donde cada uno codifica un péptido o polipéptido. Además, el al menos un
50 antígeno o epítipo antigénico puede ser una combinación de una proteína, un lípido y/o un polisacárido que incluye lipoproteínas y glucolípidos. Por tanto, en particular si el complejo para su uso según la presente invención comprende más de un antígeno o epítipo antigénico, puede comprender más de un péptido, polipéptido o proteína, más de un polisacárido, más de un lípido, más de una lipoproteína, más de un

glucolípido, más de un ácido nucleico, más de un fármaco o toxina de moléculas pequeñas, o una combinación de los mismos.

- Preferiblemente, el complejo para su uso según la invención comprende al menos un antígeno o epítipo antigénico que comprende uno o más epítopos de un antígeno asociado a cáncer/tumor, un antígeno específico de cáncer/tumor y/o una proteína antigénica de un patógeno, incluyendo proteínas antigénicas virales, bacterianas, fúngicas, protozoarias y de parásitos multicelulares

El al menos un antígeno o epítipo antigénico comprende o consiste en al menos un epítipo de cáncer/tumor, en particular un epítipo tumoral.

- Es particularmente preferente que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprenda solo dicho(s) antígeno(s) o epítipo(s) antigénico(s), que son antígeno(s) asociado(s) a cáncer/tumor, antígeno(s) específico(s) de cáncer/tumor y/o cáncer/epítopos tumorales; en particular, son antígeno(s) asociado(s) a tumor, antígeno(s) específico(s) de tumor y/o epítipo(s) de tumor.

- Tal como se usa aquí, "epítipo de cáncer" significa un epítipo de un antígeno asociado a cáncer o de un antígeno específico de cáncer. Por consiguiente, "epítipo tumoral" significa un epítipo de un antígeno asociado a tumor o de un antígeno específico de tumor. Tales epítopos son típicamente específicos (o asociados) para un cierto tipo de cáncer/tumor. En particular, los antígenos asociados a cáncer/tumor (también relacionados con cáncer/tumor) son antígenos que son expresados tanto por células cancerosas/tumorales como por células normales. En consecuencia, estos antígenos normalmente están presentes desde el nacimiento (o incluso antes). Así, existe la posibilidad de que el sistema inmunitario desarrolle auto-tolerancia a esos antígenos. Los antígenos específicos de cáncer/tumor, por el contrario, son antígenos expresados específicamente por las células cancerosas/tumorales, pero no por las células normales. Los antígenos específicos de cáncer/tumor incluyen en particular neoantígenos. En general, los neoantígenos son antígenos que antes no estaban presentes y, por tanto, son "nuevos" para el sistema inmunitario. Los neoantígenos se deben típicamente a mutaciones somáticas. En el contexto de cáncer/tumores, los neoantígenos específicos de cáncer/tumor típicamente no estaban presentes antes de que se desarrollara el cáncer/tumor y los neoantígenos específicos de cáncer/tumor generalmente están codificados por mutaciones genéticas somáticas en las células cancerosas/ tumorales. Dado que los neoantígenos son nuevos en el sistema inmune, el riesgo de auto-tolerancia a esos antígenos es considerablemente menor en comparación con los antígenos asociados a cáncer / tumor. Sin embargo, el conjunto de mutaciones específicas de tumor de cada cáncer parece ser único. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, es preferente que tales antígenos específicos de cáncer/tumor, en particular neoantígenos, se identifiquen en un sujeto diagnosticado de glioma, en particular del glioblastoma, por métodos conocidos por el experto, por ejemplo secuenciación del genoma del cáncer. Después de la identificación, los respectivos neoantígenos específicos de cáncer/tumor y/o epítopos neoantigénicos específicos de cáncer/tumor se aplican en un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención.

- Un complejo para su uso según la presente invención comprende uno o más epítopos asociados a cáncer/tumor y/o uno o más antígenos asociados a cáncer/tumor (pero preferiblemente no epítopos específicos de cáncer/tumor). Un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención también puede comprender preferiblemente (i) uno o más epítopos asociados a cáncer/tumor y/o uno o más antígenos asociados a cáncer/tumor y (ii) uno o más epítopos específicos de cáncer/tumor y/o uno o más antígenos específicos de cáncer/tumor.

- En particular, el cáncer/tumor con el que se asocian los antígenos o epítopos antigénicos o para el cual los antígenos o epítopos antigénicos son específicos es un glioma, en particular glioblastoma, como se describe aquí. Por tanto, los antígenos son preferiblemente antígenos asociados a glioma o específicos de glioma y los epítopos son preferiblemente epítopos asociados a glioma o específicos de glioma.

- Epítopos de cáncer/tumor adecuados se pueden recuperar, por ejemplo, de las bases de datos de epítopos de cáncer / tumor, por ejemplo de van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Base de datos de péptidos: antígenos tumorales definidos por células T. Cancer Immunol 201 3; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T CD4⁺ o CD8⁺ se clasifican en cuatro grupos principales según su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (versión TANTIGEN 1.0, 1 de diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>). Ejemplos de epítopos de cáncer/tumor incluyen, por ejemplo, epítopos derivados de TRP2, epítopos derivados de antígeno de glucoproteína de melanoma 100 (gp100), epítopos derivados de antígeno de glucoproteína 70 (gp70), epítopos de survivina, epítopos IEa, IL13ra2, EphA2 (receptor de efrina tipo A2), fragmentos inmunogénicos de los mismos y fusiones de tales antígenos y/o fragmentos. Como se describió anteriormente, los neoantígenos son

antígenos que están completamente ausentes del genoma humano normal. En comparación con los autoantígenos no mutados, los neoantígenos son relevantes para el control del tumor, ya que la calidad del conjunto de células T que está disponible para estos antígenos no se ve afectada por la tolerancia central de las células T. En particular, los neoantígenos pueden basarse en genomas tumorales individuales. Los potenciales neoantígenos pueden predecirse mediante métodos conocidos por el experto, como secuenciación del genoma del cáncer o tecnologías de secuenciación profunda que identifican mutaciones dentro de la parte codificadora de proteínas del genoma (del cáncer).

Ejemplos específicos de antígenos asociados a cáncer/tumor, en particular relacionados con tumor o específicos de tejido útiles en un complejo para su uso según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes antígenos: Her-2/neu, SPAS-1, TRP-2, tirosinasa, Melan A/Mart-1, gp100, BAGE, GAGE, gangliósido GM2, kinesina 2, factor modulador del elemento TATA 1, proteína tumoral D52, MAGE D, ING2, HIP-55, factor antiapoptótico TGF-1, HOM-Mel-40 / SSX2, antígeno epitelial (LEA 135), antígeno DF31MUC1 (Apostolopoulos et al., 1996 Immunol. Cell. Biol. 74: 457-464; Pandey et al., 1995, Cancer Res. 55: 4000-4003), MAGE-1, HOM-Mel-40/SSX2, NY-ESO-1, EGFR, CEA, EphA2, EphA4, PCDGF, HAAH, Mesotelina; EPCAM; NY-ESO-1, glucoproteína MUC1 y NIUC10 mucinas p5 (especialmente versiones mutadas), EGFR, antígeno sérico asociado al cáncer (CASA) y antígeno cancerígeno 125 (CA 125) (Kierkegaard et al., 1995, Gynecol. Oncol. 59: 251-254), glicoproteína epitelial 40 (EGP40) (Kievit et al., 1997, Int. J. Cancer 71: 237-245), antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC) (Lozza et al., 1997 Anticancer Res. 17: 525-529), cathepsina E (Mota et al., 1997, Am. J. Pathol. 150: 1223-1229), tirosinasa en melanoma (Fishman et al., 1997 Cancer 79: 1461-1464), antígeno nuclear celular (PCNA) de cavernomas cerebrales (Notelet et al., 1997 Surg. Neurol. 47: 364-370), un autoantígeno asociado a tumor de 35 kD del carcinoma papilar de tiroides (Lucas et al., 1996 Anticancer Res. 16: 2493-2496), CDC27 (incluida la forma mutada de la proteína), antígenos triosefosfato isomerasa, 707-AP, antígeno micobacteriano A60 (Macs et al., 1996, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 296-300), Anexina II, AFP, ART-4, BAGE, β -catenina/m, BCL-2, bcr-abl, bcr-abl p190, bcr-abl p210, BRCA-1, BRCA-2, CA 19-9 (Tolliver y O'Brien, 1997, South Med. J. 90: 89-90; Tsuruta y otros, 1997 Urol. En t. 58: 20-24), CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK-4/m, CEA (Huang et al., Exper Rev. Vaccines (2002) 1: 49-63), CT9, CT10, Cyp-B, Dek-Cain, DAM-6 (MAGE-B2), DAM-10 (MAGE-B1), EphA2 (Zantek et al., Cell Growth Differ. (1999) 10: 629-38; Carles- Kinch et al., Cancer Res. (2002) 62: 2840-7), EphA4 (Cheng et al., 2002, Cytokine Growth Factor Rev. 13: 75-85), antígeno Thomsen-Friedenreich asociado a tumor (Dahlenborg et al., 1997, Int. J. Cancer 70: 63-71), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, GnT-V, gp100 (Zajac et al., 1997, Int. J. Cancer 71: 491-496), HAGE, HER2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, hTRT, iCE, inhibidores de la apoptosis (por ejemplo survivina), antígeno de adenocarcinoma KH-1 (Deshpande y Danishefsky, 1997, Nature 387: 164-166), KIAA0205, K-ras, LAGE, LAGE-1, LDLR / FUT, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-6, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE- C2, MAGE-C3, MAGE-D, MART-1, MART-1/Melan-A (Kawakami y Rosenberg, 1997, Int. Rev. Immunol. 14: 173-192), MC1R, MDM-2, Miosina/m, MUC1, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, neo-poliA polimerasa, NA88-A, NY-ESO-1, NY-ESO-1a (CAG-3), PAGE-4, PAP, Proteínasa 3 (Molldrem et al., Blood (1996) 88: 2450-7; Molldrem et al., Blood (1997) 90: 2529-34), P15, p190, Pm1/RAR α , PRAME, PSA, PSM, PSMA, RAGE, RAS, RCAS1, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SP17, SPAS-1, TEL/AML1, TPI/m, Tirosinasa, TARP, TRP-1 (gp75), TRP-2, TRP-2/INT2, WT-1, y alternativamente las proteínas traducidas NY-ESO-ORF2 y CAMEL, derivados de genes NY-ESO-1 y LAGE-1. Numerosos otros antígenos de cáncer son bien conocidos en la técnica.

Preferiblemente, el antígeno de cáncer/tumor o el epítipo de cáncer/tumor es un antígeno de cáncer/tumor recombinante o un epítipo de cáncer/tumor recombinante. Tal antígeno recombinante de cáncer/tumor o epítipo de cáncer/tumor recombinante puede diseñarse mediante la introducción de mutaciones que cambian (añaden, eliminan o sustituyen) aminoácidos particulares en la secuencia de aminoácidos total del antígeno nativo de cáncer/tumor o cáncer/epítipo. La introducción de mutaciones no altera tanto el antígeno de cáncer/tumor o el epítipo de cáncer/tumor como para que no pueda aplicarse universalmente a un sujeto mamífero, y preferiblemente un sujeto humano o canino, sino que lo cambia lo suficiente como para que la secuencia de aminoácidos resultante rompa la tolerancia o se considere un antígeno extraño con el fin de generar una respuesta inmune. Otra manera puede ser crear un antígeno consenso recombinante de cáncer/tumor o cáncer/epítipo tumoral que tenga al menos un 85% y hasta un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con su correspondiente "antígeno nativo de cáncer/tumor o cáncer/epítipo", preferiblemente al menos un 90% y hasta un 98% de identidad de secuencia, con especial preferencia al menos un 93% y hasta un 98% de identidad de secuencia, o incluso más preferiblemente al menos un 95% y hasta un 98% de identidad de secuencia. En algunos casos, el antígeno recombinante de cáncer/tumor o el epítipo recombinante de cáncer/tumor tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con su antígeno nativo de cáncer/tumor o su epítipo cáncer/tumor correspondiente. El antígeno de cáncer/tumor nativo es el antígeno normalmente asociado con el cáncer o tumor canceroso particular. Dependiendo del antígeno de cáncer/tumor, la secuencia consenso del antígeno de cáncer/tumor puede ser a través de especies de mamíferos o dentro de los subtipos de una especie o a través de cepas virales o serotipos. Algunos antígenos de cáncer/tumor no varían mucho de la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje del antígeno de

cáncer/tumor. Los enfoques mencionados anteriormente se pueden combinar de manera que el antígeno recombinante final de cáncer/tumor o el epítipo de cáncer/tumor tenga un porcentaje de identidad con la secuencia de aminoácidos del antígeno de cáncer nativo como se discutió anteriormente. Sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de un epítipo de un antígeno de cáncer/tumor como se describe aquí no está mutada y, por tanto, es idéntica a la secuencia del epítipo de referencia.

Tal como se usa aquí, "epítipo de patógeno" significa un epítipo de una proteína antigénica, un polisacárido antigénico, un lípido antigénico, una lipoproteína antigénica o un glucolípido antigénico de un patógeno, incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos multicelulares. Así, las proteínas, polisacáridos, lípidos, lipoproteínas o glucolípidos antigénicos de los patógenos incluyen proteínas, polisacáridos, lípidos, lipoproteínas y glicolípidos, respectivamente, de los patógenos responsables de enfermedades que pueden ser un objetivo para la vacunación, incluyendo, por ejemplo, amebiasis, ántrax, úlcera de Buruli (*Mycobacterium ulcerans*), diarrea asociada a calicivirus, diarrea por *Campylobacter*, cáncer cervicouterino (virus del papiloma humano), enfermedades genitales asociadas a *Chlamydia trachomatis*, cólera, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, fiebre del dengue, difteria, fiebre hemorrágica del ébola, diarrea por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), cáncer gástrico (*Helicobacter pylori*), gonorrea, enfermedades asociadas a estreptococos del grupo A, enfermedades asociadas a estreptococos del grupo B, neumonía por *Haemophilus influenzae* B y enfermedad invasiva, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, diarrea por hepatitis E, úlceras genitales por herpes simple tipo 2, VIH/SIDA, enfermedad del anquilostoma, influenza, encefalitis japonesa, Fiebre de Lassa, leishmaniasis, leptospirosis, cáncer de hígado (hepatitis B), cáncer de hígado (hepatitis C), enfermedad de Lyme, malaria, fiebre hemorrágica de Marburg, sarampión, paperas, cáncer nasofaríngeo (virus de Epstein-Barr), meningitis por *Neisseria meningitidis*, neumonía asociada a Parainfluenza, tos ferina, peste, poliomiелitis, rabia, neumonía asociada al virus respiratorio sincitial (VSR), fiebre del valle del Rift, diarrea por rotavirus, rubéola, esquistosomiasis, síndrome respiratorio agudo severo (SRAS), shigelosis, viruela, enfermedades asociadas a estafilococos, cáncer de estómago (*Helicobacter pylori*), *Streptococcus pneumoniae* y enfermedad invasiva, tétanos, encefalitis transmitida por garrapatas, tracoma, tuberculosis, tularemia, fiebre tifoidea, enfermedad asociada al virus del Nilo-Oeste, fiebre amarilla.

Preferiblemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico será presentado en la superficie celular en un contexto de MHC de clase I y/o MHC clase II y/o en un contexto CD1, siendo preferente la presentación en la superficie celular en contexto de MHC clase I y/o MHC clase II. La frase "presentación del epítipo en el contexto de MHC clase I" se refiere en particular a un epítipo CD8⁺ que se encuentra en el surco de una molécula MHC de clase I en la superficie de una célula. La frase "presentación de epítipo en el contexto de MHC de clase II" se refiere en particular a un epítipo CD4⁺ que se encuentra en el surco de una molécula MHC de clase II en la superficie de una célula. La frase "presentación del epítipo en el contexto CD1" se refiere en particular a un epítipo lipídico que se encuentra en el surco de una molécula de un clúster de diferenciación 1 en la superficie de una célula.

Ventajosamente, el complejo para su uso de acuerdo con la invención comprende un péptido de penetración celular y al menos un antígeno o epítipo antigénico y permite el transporte y la presentación de dichos epítipos en la superficie celular de células presentadoras de antígeno en un contexto de MHC clase I y MHC clase II, y, por tanto, es útil en la vacunación y la inmunoterapia.

Preferentemente, el complejo para su uso según la presente invención comprende al menos un antígeno o epítipo antigénico que es al menos un epítipo CD4⁺ y/o al menos un epítipo CD8⁺.

Los términos "epítipo CD4⁺" o "epítipo restringido CD4⁺" tal como se usan aquí designan un epítipo reconocido por una célula T CD4⁺, en particular consistiendo dicho epítipo en un fragmento de antígeno que se encuentra en el surco de una molécula MHC de clase II. Un único epítipo CD4⁺ comprendido en el complejo para su uso según la presente invención consiste preferiblemente en aproximadamente 12-25 aminoácidos. También puede consistir en, por ejemplo, aproximadamente 8-25 aminoácidos o aproximadamente 6-100 aminoácidos.

Los términos "epítipo CD8⁺" o "epítipo restringido CD8⁺" tal como se usan aquí designan un epítipo reconocido por una célula T CD8⁺, en particular consistiendo dicho epítipo en un fragmento de antígeno que se encuentra en el surco de una molécula MHC de clase I. Un único epítipo CD8⁺ comprendido en el complejo para su uso según la presente invención consiste preferiblemente en aproximadamente 8-11 aminoácidos. También puede consistir en, por ejemplo, aproximadamente 8-15 aminoácidos o aproximadamente 6-100 aminoácidos.

Preferiblemente, el al menos un antígeno puede comprender o el al menos un epítipo antigénico puede consistir en un epítipo CD4⁺ y/o un epítipo CD8⁺ correspondiente al a o los determinantes antigénicos de un antígeno asociado a cáncer/tumor, un antígeno específico de cáncer/tumor o una proteína antigénica de un

patógeno. Con especial preferencia, el al menos un antígeno puede comprender o el al menos un epítipo antigénico puede consistir en un epítipo CD4⁺ y/o un epítipo CD8⁺ correspondiente al o a los determinantes antigénicos de un antígeno asociado a cáncer/tumor o un antígeno específico de cáncer/tumor. Con total preferencia, el al menos un antígeno puede comprender o el al menos un epítipo antigénico puede consistir en un epítipo CD4⁺ y/o un epítipo CD8⁺ correspondiente a o a los determinantes antigénicos de un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor.

También se prefiere que el complejo para su uso según la presente invención comprenda al menos dos antígenos o epítopos antigénicos, donde al menos un antígeno o epítipo antigénico comprende o consista en un epítipo CD4⁺ y al menos un antígeno o epítipo antigénico comprende o consiste en un epítipo CD8⁺. Ahora se ha establecido que las células T_h (CD4⁺) desempeñan un papel central en la respuesta inmune antitumoral tanto en la licitación de las DC como en el reclutamiento y el mantenimiento de las CTL (CD8⁺) en el sitio del tumor. Por tanto, un complejo para su uso según la presente invención que comprende al menos dos antígenos o epítopos antigénicos, donde al menos un antígeno o epítipo antigénico comprende o consiste en un epítipo CD4⁺ y al menos un antígeno o epítipo antigénico comprende o consiste en un epítipo CD8⁺, proporciona una respuesta inmune integrada que permite el cebado simultáneo de células CTL y T_h y, por tanto, es preferente para la inmunidad contra un solo epítipo CD8⁺ o solo un epítipo CD4⁺. Por ejemplo, el complejo para su uso según la presente invención puede comprender preferiblemente un epítipo Ealpha- CD4⁺ y un epítipo gp100-CD8⁺.

Preferiblemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos antígenos o epítopos antigénicos, donde los al menos dos antígenos o epítopos antigénicos comprenden o consisten en al menos dos, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más, epítopos CD4⁺ y/o al menos dos, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más, epítopos CD8⁺. Así, los al menos dos antígenos o epítopos antigénicos son preferiblemente antígenos o epítopos antigénicos diferentes, en especial los al menos dos antígenos o epítopos antigénicos son diferentes entre sí pero están relacionados con el mismo tipo de tumor. Una vacuna multi-antigénica (i) evitará el crecimiento de variantes de pérdidas de antígeno, (ii) apuntará a diferentes células tumorales dentro de una masa tumoral heterogénea y (iii) evitará la variabilidad tumoral paciente a paciente. Por tanto, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende particularmente al menos cuatro antígenos o epítopos antigénicos, en particular con al menos dos epítopos CD8⁺ y al menos dos epítopos CD4⁺. Tal complejo para su uso de acuerdo con la presente invención induce CTL CD8 multi-epitópicas y células T_h CD4 para funcionar sinérgicamente con el fin de contrarrestar células tumorales y promover una inmunidad antitumoral eficiente. Las células T_h también participan en el mantenimiento de la inmunidad celular de larga duración que se monitorizó después de la vacunación. Tal complejo para su uso según la presente invención induce respuestas inmunitarias policlonales, multi-epitópicas y de células T CD8⁺ y CD4⁺ polifuncionales y, por lo tanto, una eficaz actividad antitumoral.

Preferiblemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos antígenos o epítopos antigénicos, más preferiblemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos tres antígenos o epítopos antigénicos, incluso más preferiblemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos cuatro antígenos o epítopos antigénicos, con particular preferencia el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos cinco antígenos o epítopos antigénicos y con total preferencia el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos seis antígenos o epítopos antigénicos. Los antígenos o epítopos antigénicos comprendidos en el complejo para su uso según la presente invención pueden ser iguales o diferentes, preferiblemente los antígenos o epítopos antigénicos comprendidos en el complejo para su uso según la presente invención son diferentes entre sí. Preferiblemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos un epítipo CD4⁺ y al menos un epítipo CD8⁺.

Preferiblemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende más de un epítipo CD4⁺, por ejemplo dos o más epítopos CD4⁺ del mismo antígeno o de antígenos diferentes, y preferiblemente ningún epítipo CD8⁺. También es preferente que el complejo para su uso según la presente invención comprenda más de un epítipo CD8⁺, por ejemplo dos o más epítopos CD8⁺ del mismo antígeno o de antígenos diferentes, y preferiblemente ningún epítipo CD4⁺. Sin embargo, con total preferencia, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende (i) al menos un epítipo CD4⁺, por ejemplo dos o más epítopos CD4⁺ del mismo antígeno o de antígenos diferentes y (ii) al menos un epítipo CD8⁺, por ejemplo dos o más epítopos CD8⁺ del mismo antígeno o de antígenos diferentes.

Por ejemplo, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender preferiblemente un epítipo gp100- CD8⁺, un epítipo Ealpha-CD4⁺ y un epítipo adicional CD4⁺ y un epítipo adicional CD8⁺. Incluso más preferiblemente, el complejo para su uso según la presente invención puede comprender un polipéptido o proteína que comprende un epítipo gp100- CD8⁺ y un epítipo Ealpha- CD4⁺. Por ejemplo, dicho polipéptido o proteína comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención

comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 14 o variantes de secuencia de la misma como se definió anteriormente:

ESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPFAKF ASFEAQGALA.

NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGS

5 SEQ ID NO: 14 (carga MAD5 que comprende los epítomos OVA- CD4⁺, gp100- CD8⁺, Ealpha- CD4⁺ y OVA- CD8⁺)

Por ejemplo, el complejo para su uso según la presente invención también puede comprender un epítipo gp70- CD8⁺ y/o un epítipo gp70- CD4⁺. En particular, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender un polipéptido o proteína que comprende un epítipo gp70-CD8⁺ y/o un epítipo gp70-CD4⁺. Por ejemplo, dicho polipéptido o proteína comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 43 o variantes de secuencia de la misma como se definió anteriormente:

VTYHSPSYAYHQFERRAILNRLVQFIKDRI

SEQ ID NO: 43 (carga Mad8 que comprende un gp70-CD8⁺ y un epítipo gp70-CD4⁺)

15 Por ejemplo, el complejo para su uso según la presente invención puede comprender preferiblemente al menos un epítipo de survivina, tal como un epítipo de survivina CD8⁺ y/o un epítipo de survivina CD4⁺. En especial, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender un polipéptido o una proteína que comprende un epítipo survivina CD8⁺ y/o un epítipo de survivina CD4⁺. Más preferiblemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender un polipéptido o una proteína que comprende más de un epítipo survivina CD8⁺ y/o más de un epítipo survivina CD4⁺, tal como dos epítomos survivina CD8⁺ diferentes. Por ejemplo, dicho polipéptido o proteína comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 44 o variantes de secuencia de la misma como se definió anteriormente:

NYRIATFKNWPFLCDCAMEELTVSEFLKLDQRQ

25 SEQ ID NO: 44 (Mad11 -carga que comprende el epítipo 1 de survivina CD8⁺ y el epítipo 2 de survivina CD8⁺).

Por ejemplo, el complejo para su uso según la presente invención puede comprender preferiblemente un epítipo de un neoantígeno. Incluso más preferiblemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender un polipéptido o proteína que comprende un epítipo de un neoantígeno, tal como el neoantígeno de la línea celular tumoral MC-38 identificada por Yadav et al. Nature 2014, 27 de noviembre, 515 (7528): 572-6. Por ejemplo, dicho polipéptido o proteína comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 42 o variantes de secuencia de la misma como se definió anteriormente:

HLELASMTNMELMSSIV

35 SEQ ID NO: 42 (carga Mad9 que comprende el epítipo de un neoantígeno como se describe en Yadav et al. Nature. 2014 27 de noviembre; 515 (7528): 572-6).

Por ejemplo, el complejo para su uso según la presente invención puede comprender preferiblemente más de uno, por ejemplo dos o tres epítomos de neoantígenos. Incluso más preferiblemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender un polipéptido o proteína que comprende más de uno, por ejemplo dos o tres, epítomos de neoantígenos, como los neoantígenos de la línea celular tumoral MC-38 identificados por Yadav et al., Nature 2014, 27 de noviembre; 515 (7528): 572-6. Por ejemplo, dicho polipéptido o proteína comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 63 o variantes de secuencia de la misma como se definió anteriormente:

LFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTNMELMSSIVVISASIIVFNLLELEG

45 SEQ ID NO: 63 (Mad12-carga que comprende el epítipo de un neoantígeno según lo descrito en Yadav et al. Nature. 2014 27 de noviembre; 515 (7528): 572-6).

Preferentemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un péptido, polipéptido o una proteína. Ejemplos de antígenos o epítomos antigénicos de naturaleza peptídica, polipeptídica o proteica útiles en la invención incluyen antígenos de cáncer/tumor o epítomos antigénicos de los mismos, antígenos de alergia o epítomos antigénicos de los mismos,

autoantígenos autoinmunes o epítomos antigénicos de los mismos, antígenos patógenos o epítomos antigénicos de los mismos y antígenos virales o epítomos antigénicos de los mismos, preferiblemente de citomegalovirus (CMV), virus orthopox variola, virus orthopox alastrim, virus parapox ovis, virus contagioso del molusco, virus herpes simplex 1, virus herpes simplex 2, virus herpes B, virus de la varicela zóster, virus de la pseudorabia, citomegalovirus humano, virus herpes 6 humano, virus herpes 7 humano, virus de Epstein-Barr, virus herpes 8 humano, virus de la hepatitis B, virus chikungunya, virus O'nyong'nyong, rubivirus, virus de la hepatitis C, virus C de GB, virus del Nilo occidental, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus del mal de Louping, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis japonesa B, virus Powassan, virus FSME, virus corona asociado con SARS, virus corona humano 229E, virus corona humano Oc43, Torovirus, virus linfotrópico humano de células T de tipo I, virus linfotrópico humano de células T de tipo II, VIH (SIDA), es decir virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 o virus de inmunodeficiencia humana de tipo 2, virus de la influenza, virus Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus Tacaribe, virus Junin, virus Machupo, virus de la enfermedad de Borna, virus Bunyamwera, virus de la encefalitis de California, virus de la fiebre del valle del Rift, virus de la fiebre del mosquito simúlido, virus Toscana, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus Hazara, virus Khasan, virus Hantaan, virus Seoul, virus Prospect Hill, virus Puumala, virus Dobrava Belgrade, virus Tula, virus sin nombre, virus Marburg del lago Victoria, virus Ébola del Zaire, virus Ébola del Sudan, virus Ébola de Costa de Marfil, virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus de la gripe C, virus de la parainfluenza, parásito de la malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*), virus Marburg, virus del sarampión, virus de las paperas, virus sincitial respiratorio, metapneumovirus humano, virus Indiana de estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus de Mokola, virus de Duvenhage, lissavirus de murciélago europeo 1 + 2, lissavirus de murciélago australiano, adenovirus AF, virus de papiloma humano, virus del condiloma 6, virus de condiloma 1 1, virus de polio, virus adenoasociado 2, rotavirus, orbivirus, varicela, incluida varicela zoster, etc., o antígenos o epítomos antigénicos de leishmania, tipanomas, amebas, bacterias, etc., o pueden seleccionarse de epítomos o de variantes de los antígenos o epítomos antigénicos anteriores. Preferiblemente, los epítomos, así como las variantes de antígenos como se definieron anteriormente, tienen una homología o identidad de secuencia de aproximadamente un 10%, en particular al menos un 10%, aproximadamente un 20%, en particular al menos un 20%, aproximadamente un 30%, en particular al menos un 30%, aproximadamente un 40%, en particular al menos un 40%, aproximadamente un 50%, en particular al menos un 50%, aproximadamente un 60%, en particular al menos un 60%, aproximadamente un 70%, en particular al menos un 70%, aproximadamente un 80%, en particular al menos un 80%, aproximadamente un 90% en particular al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% con uno de los antígenos o secuencias de antígenos mostrados o descritos anteriormente. En este contexto, la definición de epítomos y variantes se aplica de manera similar a la definida.

Ejemplos de antígenos o de epítomos antigénicos en la categoría de péptido, polipéptido o proteína incluyen una combinación de múltiples epítomos de glioma tales como los descritos en Novellino et al. (2005, *Cancer Immunol Immunother*, 54 (3): 187-207), Vigneron et al. (2013, *Cancer Immunol*, 13:15). Sin embargo, un único complejo para su uso de acuerdo con la presente invención también puede comprender solo un subconjunto, es decir uno o más de dichos epítomos de glioma. En tal caso, los complejos, preferiblemente diferentes, de acuerdo con la presente invención comprenden diferentes subconjuntos de todos los epítomos de glioma mencionados, de modo que, por ejemplo, una vacuna según la presente invención que comprende tales complejos diferentes de acuerdo con la presente invención comprende todos los epítomos de dicho glioma pero distribuidos en los diferentes complejos.

Además, un complejo para su uso según la invención también puede comprender al menos un antígeno o epítomo antigénico donde dicho antígeno o epítomo antigénico es un polisacárido, un lípido, una lipoproteína y/o un glucolípido, en particular un epítomo polisacárido, lipídico, lipoproteico y/o glucolipídico, que pueden ser, por ejemplo, epítomos patógenos como se definen aquí.

En particular, el complejo para su uso de acuerdo con la invención puede comprender al menos un antígeno o epítomo antigénico donde dicho antígeno o epítomo antigénico es polisacárido, lipídico, lipoproteico y/o glucolipídico, incluyendo antígenos o epítomos antigénicos virales, bacterianos, fúngicos, protozoarios y de parásitos multicelulares.

Preferiblemente, dichos epítomos se presentarán en la superficie celular en un contexto de MHC de clase I y/o MHC de clase II.

Preferiblemente, dichos epítomos lipídicos se presentarán en la superficie celular en un contexto CD1 (clúster de diferenciación 1).

El complejo para su uso según la presente invención también puede comprender al menos un antígeno o epítomo antigénico donde dicho antígeno o epítomo antigénico es un fármaco o una toxina de moléculas pequeñas.

Ejemplos de moléculas de carga dentro de la categoría de fármacos o toxinas de moléculas pequeñas útiles en la invención incluyen ciclosporina A, paclitaxel, doxorubicina, metotrexato, ácido 5-aminolevulínico, toxina diftérica, sunitinib y aquellas moléculas revisadas en De wit Amer (2010, Neuro Oncol, 12 (3): 304-16).

- 5 El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos un antígeno o epítipo antigénico, preferiblemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende más de un antígeno o epítipo antigénico, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más antígenos o epítipos antigénicos, especialmente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende (al menos) dos o tres antígenos o epítipos antigénicos, incluso más preferiblemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende (al menos) cuatro o cinco antígenos o epítipos antigénicos.
- 10 Si el complejo para su uso según la presente invención comprende más de un antígeno o epítipo antigénico, se entiende que dicho antígeno o epítipo antigénico también está en particular unido covalentemente en el complejo para su uso según la presente invención, por ejemplo a otro antígeno o epítipo antigénico y/o a un componente a), es decir, a un péptido de penetración celular, y/o a un componente c), es decir a un péptido agonista de TLR.
- 15 Los diversos antígenos o epítipos antigénicos comprendidos en el complejo para su uso según la presente invención pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, los diversos antígenos o epítipos antigénicos comprendidos en el complejo para su uso según la presente invención son diferentes entre sí, proporcionando así un complejo multi-antigénico y/o multi-epitópico.
- 20 Además, es preferente que más de un antígeno o epítipo antigénico, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más antígenos o epítipos antigénicos, se dispongan consecutivamente en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. En concreto, esto significa que todos los antígenos y/o epítipos antigénicos comprendidos en el complejo se disponen en un tramo que no está interrumpido por el componente a), es decir por un péptido de penetración celular, ni por el componente c), es decir por el péptido agonista de TLR. Por el contrario, el componente a) y el componente c) se disponen en el complejo, por ejemplo, antes o después de dicho tramo de todos los antígenos y/o epítipos antigénicos. Sin embargo, los antígenos y/o epítipos antigénicos se disponen consecutivamente de manera pueden estar unidos entre sí, por ejemplo, mediante un espaciador o un enlazador como se describe a continuación que no es el componente a), es decir un péptido de penetración celular, ni el componente c), es decir un péptido agonista de TLR.
- 25
- 30 Alternativamente, sin embargo, los diversos antígenos y/o epítipos antigénicos también se pueden disponer de cualquier otra manera en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, por ejemplo con el componente a) y/o el componente c) entre dos o más antígenos y/o epítipos antigénicos, es decir con uno o más antígenos y/o epítipos antigénicos colocados entre el componente a) y el componente c) (o viceversa) y, opcionalmente, uno o más antígenos y/o epítipos antigénicos en el otro extremo del componente a) y/o del componente c).
- 35 Se entiende que varios antígenos o epítipos antigénicos diferentes relacionados con el glioma, en particular glioblastoma, pueden estar ventajosamente comprendidos en un único complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, se pueden distribuir varios antígenos o epítipos antigénicos diferentes relacionados con el glioma, en particular glioblastoma, en subconjuntos de diferentes antígenos o epítipos antigénicos, en particular subconjuntos que se complementan entre sí, en el contexto del glioma, en particular del glioblastoma, comprendidos en diferentes complejos de acuerdo con la presente invención, por lo que, ventajosamente, dichos complejos diferentes que comprenden diferentes subconjuntos se pueden administrar simultáneamente, por ejemplo en una única vacuna, a un sujeto que lo necesite.
- 40
- 45 Preferiblemente, el complejo para su uso según la presente invención comprende al menos un epítipo tumoral de un antígeno seleccionado de los antígenos de glioma descritos en Reardon, D.A., et al., An update on vaccine therapy and other immunotherapeutic approaches for glioblastoma. Expert Rev Vaccines, 2013. 12(6): p. 597-615. Con mayor preferencia, el complejo para su uso según la presente invención comprende al menos un epítipo tumoral que es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo consistente en CMV, EGFRvIII, EphA2, gp100, Her2/neu, IL-13R α 2, survivina, hTert, TRP-2, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, brevicin, neuroligin 4 y PTPRz1. Esos antígenos son particularmente útiles en el contexto del glioma, en particular del glioblastoma. También es preferente que el complejo para su uso según la presente invención comprenda al menos un antígeno tumoral seleccionado del grupo consistente en CMV, EGFRvIII, EphA2, gp100, Her2 / neu, IL-13R α 2, survivina, hTert, TRP-2, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, brevicin, neuroligin 4 y PTPRz1, o un fragmento del mismo, o una variante de secuencia de un antígeno tumoral o una variante de secuencia de un fragmento del mismo. Tal como se usa aquí, un "fragmento" de un antígeno comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos del antígeno, preferiblemente al menos 15 aminoácidos consecutivos del antígeno, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos consecutivos del antígeno, incluso más preferiblemente al
- 50
- 55

menos 25 aminoácidos consecutivos del antígeno y con total preferencia al menos 30 aminoácidos consecutivos del antígeno. Una "variante de secuencia" es como se ha definido anteriormente, es decir, una variante de secuencia tiene una secuencia (de aminoácidos) que es al menos un 70%, al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, con particular preferencia al menos un 95%, con total preferencia al menos un 99% idéntica a la secuencia de referencia. Una variante de secuencia "funcional" significa en el contexto de un antígeno/fragmento de antígeno/epítipo que la función del (de los) epítipo(s), por ejemplo comprendido por el antígeno (fragmento), no está deteriorada ni abolida. Sin embargo, preferentemente, la secuencia de aminoácidos del (de los) epítipo(s), por ejemplo comprendidos en el antígeno (fragmento) de cáncer/tumor como se describe aquí, no está mutada y, por tanto, es idéntica a la secuencia del epítipo de referencia.

Como se describió anteriormente, los epítipos adecuados de cáncer/tumor de esos antígenos son conocidos de la literatura o se pueden identificar usando bases de datos de epítipos de cáncer/tumor, por ejemplo van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Base de datos de péptidos: antígenos tumorales definidos por células T. *Cancer Immun* 201 3; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T CD4⁺ o CD8⁺ se clasifican en cuatro grupos principales según su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (versión TANTIGEN 1.0, 1 de diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en el Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

CMV

El citomegalovirus humano (CMV), un miembro de la familia del virus del herpes, persiste después de una infección generalmente no reconocida de por vida en el cuerpo. El CMV es la infección oportunista del SNC más frecuente en pacientes gravemente inmunocomprometidos. El ácido nucleico CMV postmortem puede detectarse en el SNC en más del 20% de las personas sin enfermedades del SNC, lo que confirma el tropismo del CMV a las células del SNC e indica que el CMV puede persistir en el SNC de por vida sin causar daño (obvio). Sin embargo, la expresión de proteínas y oligonucleótidos del CMV también se ha identificado en un alto porcentaje de gliomas (Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, et al. *Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma*. *Cancer Res*. 2002;62:3347-3350).

Los antígenos CMV preferentes son aquellos descritos en la WO 2009/155535, tal como un polipéptido, o un fragmento inmunogénico del mismo, seleccionado del grupo consistente en polipéptidos de cápside, polipéptidos de tegumento y polipéptidos de envoltura; preferiblemente seleccionado del grupo consistente en fosfoproteína única larga 83 (ppUL83; a/k/a pp65), glicoproteína UL55 (gpUL55; a/k/a gB), proteína UL123 inmediata temprana 1 (IE1), proteína UL122 IE2, UL111A (a/k/a mtrII), US28, ppUL32, ppUL65, ppUL80a, ppUL82, ppUL98a, ppUL99, gpUL4 (a/k/a gp48), gpUL1β, gpUL18 (a/k/a MHC), gpUL75 (a/k/a gH), gpULIOO, gpULHO (a/k/a gM), gpUL115 (a/k/a gL), pUL46, pUL48, pUL56, pUL86 (a/k/a MCP), glucoproteína única corta 10 (gpUSIO), gpUSI 1, complejo de glucoproteína II (gclI), gp65 y gp93. Preferiblemente, el antígeno CMV es un polipéptido, o un fragmento inmunogénico del mismo, que está codificado por un gen correspondiente a la cepa CMV depositada con el N° de acceso GENBANK BK000394.2 o XI 7403.1. Además, la WO 2009/155535 también describe epítipos de CMV preferentes, tales como péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos descritas por Trivedi et al., *Blood*, 105: 2793 (2005) y la publicación de solicitud de patente US 2005/0019344 y otros epítipos de CMV como se describe la WO 2009/155535.

EGFRvIII

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; ErbB-1; HER1 en humanos) es el receptor de la superficie celular para miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (familia EGF) de ligandos proteicos extracelulares. EGFRvIII es una forma mutada de EGFR, conocida por jugar un papel destacado en la tumorigénesis. A saber, EGFRvIII es una tirosina quinasa activada constitutivamente derivada de una mutación por delección en EGFR. EGFRvIII es sobreexpresado en gran medida por las células de glioblastoma (Saikali, S., et al., *Expression of nine tumour antigens in a series of human glioblastoma multiforme: interest of EGFRvIII, IL-13Ralpha2, gp100 and TRP-2 for immunotherapy*. *J Neurooncol*, 2007. 81(2): p. 139-48), que adquieren una mayor capacidad para el crecimiento no regulado, la supervivencia, la invasión y el reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos tumorales.

El experto en la materia conoce varios epítipos de EGFRvIII. Un epítipo EGFRvIII preferente, que está preferiblemente comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, incluye el siguiente epítipo (la siguiente secuencia de epítipos puede referirse a un epítipo o más de uno (superposición) epítipos):

LEEKKGNYVVDHC

[SEQ ID NO: 47]

EphA2

- Las efrinas y sus receptores (receptores de efrina, "Ephs") pertenecen a una subfamilia de proteínas involucradas en procesos cruciales que ocurren durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso central, incluyendo mapeo de axones, migración celular y angiogénesis. Hallazgos recientes sugieren que las células de glioma sobreexpresan Eph/ephrin y su señalización afecta el crecimiento, la migración y la invasión de las células de glioma (Nakada, M., Y. Hayashi, and J. Hamada, Role of Eph/ephrin tyrosine kinase in malignant glioma. *Neuro Oncol*, 2011. 13(11): p. 1163-70). Se han identificado 16 receptores de efrina (Ephs). Los receptores de efrina se dividen en dos grupos en función de la similitud de sus secuencias de dominio extracelular y sus afinidades para unir ligandos de efrina-A y efrina-B. El receptor de EPH A2 (receptor 2 de efrina tipo A) se une a los ligandos de efrina-A. La secuencia de aminoácidos de EphA2 se muestra a continuación:

GEWLVPIGQCLCQAGYEKVEDACQACSPGFFKFEASESPCLECPEHTLPSPEGATSCCEEGFFR
APQDPASMPCTRPPSAPHYLTAVGMGAKVELRWTPPQDSGGREDIVYSVTCEQCWPESGEC
GPCEASVRYSEPPHGLTRTSVTVDLEPHMNYTFTVEARNGVSGLVTSRSFRTASVSINQTEPPK
VRLEGRSTTSLSVWSI PPPQSRVWKYEVTYRKKGDSNSYNVRRTEGFSVTLDDLAPDTTYLV
QVQALTQEGQGAGSKVHEFQTLSPGSGNLA VIGGVAVGVVLLVLAVGVFFIHRRRKNQR
ARQSPEDVYFSKSEQLKPLKTYVDPHTYEDPNQAVLKFTTEIHPSCVTRQKVIGAGEFGEVYKG
MLKTSSGKKEVPVAIKTLKAGYTEKQRVDFLGEAGIMGQFSHHNIIRLEGVISKYKPMMIITEYM
ENGALDKFLREKDGESVLQLVGMRLGIAAGMKYLANMNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVS
DFGLSRVLEDDPEATYTTSGGKIPIRWTAPEAISYRKFTSASDVWSFGIVMWEVMTYGERPYWE
LSNHEVMKAINDGFR LPTPMDCP SAIYQLMMQCWQQERARRPKFADIVSILDKLIRAPDSLKT
LADFDPRVSIRLPSTSGSEGV PFRTVSEWLESIKMQQYTEHFMAAGYTAIEKVVMQMTNDDIKRI
GVRLPGHQKRIAYSLLGLKDQVNTVGIP

[SEQ ID NO: 48]

- Por consiguiente, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 48 o un fragmento o una variante de la misma como se describe aquí. Como se describió anteriormente, los epítopos adecuados de cáncer/tumor de EphA2 son conocidos en la literatura o se pueden identificar usando bases de datos de epítipo de cáncer/tumor, por ejemplo de van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. *Cancer Immun* 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T CD4⁺ o CD8⁺ se clasifican en cuatro grupos principales según su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (versión TANTIGEN 1.0, 1 de diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

Gp100

- La glucoproteína 100, gp100 o proteína de melanocitos PMEL tiene 661 aminoácidos de longitud y es una glucoproteína transmembrana tipo I enriquecida en melanosomas, que son los orgánulos productores de melanina en los melanocitos. Gp100 participa en la maduración del melanosoma. La proteína gp100 es un antígeno de melanoma, es decir, un antígeno asociado a tumor. La secuencia de aminoácidos de gp100 se muestra a continuación:

MDLVLRCLLHLAVIGALLAVGATKVPNRQDWLGVSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQRDC
 WRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPQSGQKVLDPGQVWVNNIINGSQVWGGQPV
 YPQETDDACIFPDGGPCPSGWSQKRSFVYVWKTWGQYVQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGT
 HTMEVTYHRRGSRYSYVPLAHSSSAFTITDQVPFSVSVSQRALDGGNKHFLRNQPLTFALQL
 HDPSGYLAEADLSYTWDFDSSGTLISRALVVHTYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVPG
 TTDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPTAEPSTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAEST
 GMTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPE
 GPDASSIMSTESITGSLGPLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQGIESAEILQAVPS
 GEGDAFELTVSCQGGPKACMEISSPGCQPPAQRLCQPVLPSPACQLVLHQILKGGSGTYCL
 NVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPLIVGILLVLMVAVLASLIYRRRLMKQDFSVQPLP
 HSSSHWLRLPRIFCSCPIGENSPLLSGQQV
 [SEQ ID NO: 49]

- Por consiguiente, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 49 o un fragmento o variante de la misma como se describe aquí. Como se describió anteriormente, epítomos de cáncer/tumor de gp100 adecuados son conocidos de la literatura o se pueden identificar mediante el uso de bases de datos de epítomos de cáncer/tumor, por ejemplo de van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T CD4+ o CD8+ se clasifican en cuatro grupos principales según su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (versión TANTIGEN 1.0, 1 de diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

HER-2/neu

Her-2 pertenece a la familia EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). El experto en la materia conoce muchos epítomos de HLA-A. La secuencia de aminoácidos de HER2 se muestra a continuación:

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHDMLRHLYQGCQVVGQGNLE
 LTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNNQVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNGDPLN
 NTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTIDTNR
 SRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTRTVACAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKH
 SDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTYFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTL
 VCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAF
 LPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRILHNGAY
 SLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDEC
 VGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNAHCLPCH
 PECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPGSKVLPDLSYMPIWKFPDEEGACQP
 CPINCTHSCVDLDDKGCPAEQASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKYTMRRLL
 QETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLR
 ENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPPVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGS
 QDLLNWCMQIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEHAD
 GKGVPKWMALLESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQ
 PPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVEFSRMARDPQRFVVIQNEGLGPASPLDSTFYRSL
 LEDDDMGDLVDAEEYLPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEE
 APRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLT
 CSPQPEYVNPDPVRQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLPSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPE
 YLTPQGGGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV
 [SEQ ID NO: 50]

- Por consiguiente, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 50 o un fragmento o variante de la misma como se describe aquí. Como se describió anteriormente, los epítomos adecuados de cáncer/tumor de Her-2 se conocen de la literatura o se pueden identificar utilizando bases de datos de epítomo de cáncer/tumor, por ejemplo van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Base de datos de péptidos: antígenos tumorales definidos por células T. Cancer Immun 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T CD4⁺ o CD8⁺ se clasifican en cuatro grupos principales según su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (versión TANTIGEN 1.0, 1 de diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en el Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

Survivina

- La survivina, también llamada inhibidor de la apoptosis baculoviral que contiene repeticiones 5 o BIRC5, es un miembro de la familia de los inhibidores de la apoptosis (IAP). La proteína survivina funciona inhibiendo la activación de la caspasa, lo que conduce a una regulación negativa de la apoptosis o muerte celular programada. La secuencia de aminoácidos de survivina se muestra a continuación:

MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFELEGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFCKEL
EGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKLDREKAKNIAKETNNKKKEFEETAKK
VRRAIQQLAAMD
[SEQ ID NO: 52]

- Por consiguiente, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 52 o un fragmento o variante de la misma como se describe aquí.
- El experto en la materia conoce varios epítomos de survivina. Un epítomo de survivina preferido, que está preferiblemente comprendido en el complejo para su uso según la presente invención, incluye el siguiente epítomo (la secuencia del epítomo que se muestra a continuación es un fragmento de la secuencia de survivina anterior y, por tanto, se muestra en la secuencia de survivina anterior subrayada; la siguiente secuencia de epítomos puede referirse a un epítomo o más de uno (superposición) epítomos):

RISTFKNWPF

- [SEQ ID NO: 53]

Así, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 53.

Antígeno asociado a melanoma (MAGE)

- Los miembros mamíferos de la familia de genes MAGE (antígeno asociado al melanoma) se describieron originalmente como completamente silenciosos en los tejidos adultos normales, con la excepción de las células germinales masculinas y, para algunos de ellos, la placenta. Por el contrario, estos genes se expresan en varios tipos de tumores. Por tanto, el complejo para su uso según la presente invención comprende preferiblemente un antígeno de la familia MAGE (un antígeno "MAGE") o un epítomo del mismo. De la familia MAGE, son especialmente preferentes MAGE-A3 y MAGE-D4, y en particular MAGE-A3. Se desconoce la función normal de MAGE-A3 en las células sanas. MAGE-A3 es una proteína específica de tumor y se ha identificado en muchos tumores. La secuencia de aminoácidos de MAGE-A3 se muestra a continuación:

MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSTLVEVTLGEVPAAESPDPQPS
PQGASSLPMTMNYPLWSQSYEDSSNQEEGPSTFPDLESEFQAALSRKVAELVHFLLLKYRAREP
VTKAEMLGSVVGNWQYFFPVIFSKAFSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGLSYDGLLGDN
QIMPKAGLLIIVLAIAREGDCAPEEKIWEELSVLEVFEGRSILGDPKKLLTQHVFQENYLEYRQ
VPGSDPACYEFLWGPRLVETSIVKVLHMHMVKISGGPHIS YPPLHEWVLREGEE
[SEQ ID NO: 59]

Así, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 59.

- 5 El experto en la materia conoce diversos epítomos de MAGE-A3. Un epítomo MAGE-A3 preferente que está comprendido preferiblemente en el complejo para su uso según la presente invención incluye el siguiente epítomo (la secuencia del epítomo mostrada a continuación es un fragmento de la secuencia MAGE-A3 anterior y, por tanto, se muestra en la secuencia MAGE-A3 anterior subrayada; la siguiente secuencia de epítomos puede referirse a un epítomo o más de uno (superposición) epítomos):

KVAELVHFL
[SEQ ID NO: 60]

- 10 Por consiguiente, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 60.

IL13Ralpha2

- 15 IL13Ralpha2 se une a la interleuquina 13 (IL-13) con una afinidad muy alta (y por tanto puede secuestrarla), pero no permite la unión de IL-4. Actúa como un regulador negativo tanto de IL-13 como de IL-4, sin embargo, este mecanismo aún no se ha determinado. La secuencia de aminoácidos de IL13Ralpha2 se muestra a continuación:

MAFVCLAIGCLYTLISTTFGCTSSSDTEIKVNPPQDFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLDHFKECT
VEYELKYRNIGSETWKTITKNLHYKDGFDLNKGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWIS
PQGIPETKVQDMDCVYYNWQYLLCSWKPQIGVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQCVDYIKAD
GQNIGCRFPYLEASDYKDFYICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLPPVYLTFTRESSCEIKLKW
SIPLGPIPARCFDYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNETRQLCFVVRKVNIIYCSDDGIWSEW
SDKQCWEGEDLSKKTLLRFWLPFGFILVIFVTG LLLRKPNTPKMIPEFFCDT
[SEQ ID NO: 61]

- 20 Así, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 61 o un fragmento o variante de la misma como se describe aquí.

- 25 El experto en la materia conoce diversos epítomos de IL13Ralpha2. Un epítomo de IL13Ralpha2 preferente que está comprendido preferiblemente en el complejo para su uso según la presente invención incluye el siguiente epítomo (la secuencia de epítomo que se muestra a continuación es un fragmento de la secuencia de IL13Ralpha2 anterior y, por tanto, se muestra en el IL13Ralpha2 anterior secuencia subrayada; la siguiente secuencia de epítomos puede referirse a un epítomo o más de uno (superposición) epítomos):

LPFGFIL
[SEQ ID NO: 62]

En consecuencia, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 62.

hTert

- 30 La transcriptasa inversa de telomerasa (abreviada como TERT o hTERT en humanos) es una subunidad catalítica de la enzima telomerasa, que, junto con el componente de ARN de la telomerasa (TERC), comprende la unidad más importante del complejo de telomerasa. Las telomerasas son parte de un subgrupo distinto de polimerasas dependientes de ARN. La telomerasa alarga los telómeros en las cadenas de ADN, lo que permite a células senescentes que de otro modo se volverían postmitóticas y sufrir apoptosis superar el límite de Hayflick y volverse potencialmente inmortales, como suele ser el caso de las células cancerosas. La secuencia de aminoácidos de hTert se muestra a continuación:
- 35

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCPWD
 ARPPPAAPSRQVSLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPN
 TVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPP
 PHASGPRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTP
 VGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPRAEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHAGPPSTSR
 PPRPWDTPCPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLSRPWMPGTPRR
 LRLPQRYWQMRPLFELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPPEE
 EDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRLRVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKL
 SLQELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLSFFVYTETT
 FQKNRLFFYKRSVWSKLQSIGIRQHLLKRVQLRELSEAEVRQHREARPAALLTSRLRFIPKPDGLRPI
 VNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVSLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRWRTFVLR
 VRAQDPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAF
 KSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGK
 SYVQCQGPQGSILSTLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTL
 RGVPYGCVVNLKTKTVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYA
 RTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHAC
 VLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQA
 FLLKLTRHRVTYVPLLSLRTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAANPALPSDFKTILD
 [SEQ ID NO: 51]

- Por consiguiente, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 51 o un fragmento o variante de la misma como se describe aquí. Como se describió anteriormente, los epítomos adecuados de cáncer/tumor de hTert son conocidos de la literatura o se pueden identificar utilizando bases de datos de epítomo de cáncer/tumor, por ejemplo van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Base de datos de péptidos: antígenos tumorales definidos por células T. Cancer Immun 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T CD4⁺ o CD8⁺ se clasifican en cuatro grupos principales según su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (versión TANTIGEN 1.0, 1 de diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en el Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

TRP-2

- La proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP-2, también conocida como "L-DOPAcrómico tautomerasa") es una enzima melanogénica. TRP-2 regula un interruptor que controla la proporción de subunidades carboxiladas en el biopolímero de melanina. Por tanto, TRP-2 es una proteína melanosómica involucrada en la producción de melanina. También se sobreexpresa en las células de glioblastoma. La secuencia de aminoácidos de TRP-2 se muestra a continuación:

MSPLWWGFLSCLGCKILPGAQGGQFPRVCMTVDSL NKECCPRLGAESANVCGSQQGRGQ
 CTEVRADTRPWSGPYILRNQDDRELWPRKFFHRTCKCTGNFAGYNCGDCKFGWTGPNCER
 KKPPVIRQNIHSLSPQEREQFLGALDLAKKRVPDYPVITQHWVGLLPNGTQPQFANCSVY
 DFFVWLHYYSVRD TLLGGFFPWLVKYYYRFVIGLRVWQWEVISCKLIK RATTRQP
 [SEQ ID NO: 54]

- Por consiguiente, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 54 o un fragmento o variante de la misma como se describe aquí. Como se describió anteriormente, los epítomos adecuados de cáncer/tumor de TRP-2 son conocidos de la literatura o se pueden identificar utilizando bases de datos de epítomo de cáncer/tumor, por ejemplo van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Base de datos de péptidos: antígenos tumorales definidos por células T. Cancer Immun 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T CD4⁺ o CD8⁺ se clasifican en cuatro grupos principales según su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (versión TANTIGEN 1.0, 1 de

diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en el Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

YKL-40

- 5 YKL-40 (también conocida como glucoproteína-39 del cartilago humano (HC gp-39) y como proteína 1 similar a la quitinasa-3 (CHI3L1)), es una glicoproteína secretada y un miembro de la familia de las 18 glicosil hidrolasas. El nombre YKL-40 se deriva de los tres aminoácidos N-terminales presentes en la forma secretada y su masa molecular. YKL-40 es secretada por varios tipos de células, incluyendo condrocitos, células sinoviales, macrófagos y algunos tipos de células cancerosas. La secuencia de aminoácidos de YKL-40 se muestra a continuación:

```
MGVKASQTGFVVLVLLQCCSAYKLVCYYTSWSQYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISN
DHIDTWEWNDVTLYGMLNTLKNRPNLKTLLSVGGWNFGSQRFKIASNTQSRRTFIKSVPP
FLRTHGFDGLDLAWLYPGRRDKQHFTTLIKEMKAEFIKEAQPGKKQLLSAALSAGKVTIDSSY
DIAKISQHLDFISIMTYDFHGAWRGTTGHHSPFRGQEDASPDRFSNTDYAVGYMLRLGAPA
SKLVMGIPTFGRSFTLASSETGVGAPISGPGIPGRFTKEAGTLAYEICDFLRGATVHRILGQQVP
YATKGNQWVGYYDDQESVSKVQYLKDRQLAGAMVWALDLDQFQGSFCGQDLRFPLTNAI
KDALAAT
```

- 10 [SEQ ID NO: 55]

- Por consiguiente, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 55 o un fragmento o variante de la misma como se describe aquí. Como se describió anteriormente, los epítomos adecuados de cáncer/tumor de YKL-40 son conocidos de la literatura o se pueden identificar utilizando bases de datos de epítomo de cáncer/tumor, por ejemplo van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Base de datos de péptidos: antígenos tumorales definidos por células T. Cancer Immunol 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T CD4⁺ o CD8⁺ se clasifican en cuatro grupos principales según su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (versión TANTIGEN 1.0, 1 de diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en el Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).
- 15
- 20

Brevican

- La proteína núcleo Brevican es una proteína que en los humanos está codificada por el gen BCAN. Brevican es miembro de la familia de proteínas lecticanas. Brevican se localiza en la superficie de las neuronas en el cerebro. En células melanocíticas, la expresión del gen BCAN puede estar regulada por MITF. La secuencia de aminoácidos de brevican se muestra a continuación:
- 25

MAQLFLPLLAALVLAQAPAALADVLEGDSSDRAFRVRIAGDAPLQGVLGALTIPCHVHYLR
 PPPSRRAVLGSPRVKWTFLSRGREAEVLVARGVRVKVNEAYRFRVALPAYPASLTDVSLALSELR
 PNDSGIYRCEVQHGIDSSDAVEVKVKGVVFLYREGSARYAFSFGAQEACARIGAHIAITPEQL
 YAAYLGGYEQCDAGWLSAQTVRYPIQTPREACYGDMGDFGVRNYGVVDPDDLVDVYCY
 AEDLNGELFLGDPPEKLTLEEARAYCQERGAEIATTGQLYAAWDGGLDHCSPGWLADGSVRY
 PIVTPSQRCCGGGLPGVKTLFLFPNQTFPNKHSRNFVYCFRDSAQPSAIPASNPASNPASDGL
 EAIVTVTETLEELQLPQEATESERGAISIPIMEDGGGGSSTPEDPAEAPRTLLEFETQSMVPPTGF
 SEEEGKALEEEKEYEDEEEKEEEEEVEDEALWAWPSELSSPGPEASLPTEPAAQEEESLQAPARA
 VLQPGASPLPDGESEASRPPRVHGPPTETLPTPRERNLASPSSTLVEAREVGEATGGPELSGVPR
 GESEETGSSEGAAPSLPATRAPEGTRELEAPSEDNSGRAPAGTSVQAQPVLPDTSASRGGVAV
 VPASGDCVPSPCHNGGTCLEEEGVRLCLPGYGGDLCDVGLRFCNPGWDAFQAGACYKHF
 STRRSWEAEATQCRMYGAHLASISTPEEQDFINNRYREYQWIGLNDRTIEGDFLWSDGVPLLYE
 NWNPGQPDSYFLSGENCVMVWHDQGGQWSDVPCNYHLSYCKMGLVSCGPPPELPLAQ
 VFGRPLRYEVDTVLRYRCREGLAQRNLPLIRCQENGRWEAPQISCVPRRPARALHPEEDPEGR
 QGRLLGRWKALLIPPSSPMGP
 [SEQ ID NO: 56]

Por consiguiente, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 56 o un fragmento o variante de la misma como se describe aquí. Como se describió anteriormente, los epítopos adecuados de cáncer/tumor de Brevican son conocidos de la literatura o se pueden identificar utilizando bases de datos de epítipo de cáncer/tumor, por ejemplo van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Base de datos de péptidos: antígenos tumorales definidos por células T. Cancer Immun 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T CD4⁺ o CD8⁺ se clasifican en cuatro grupos principales según su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (versión TANTIGEN 1.0, 1 de diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en el Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

Neuroligina 4

La neuroligina (NLGN), una proteína de membrana tipo I, es una proteína de adhesión celular en la membrana postsináptica que media la formación y el mantenimiento de la sinapsis entre neuronas. Las neuroliginas actúan como ligandos para las β -neurexinas, que son proteínas de adhesión celular localizadas presinápticamente. Las neuroliginas también afectan las propiedades de las redes neuronales especificando funciones sinápticas, y median la señalización reclutando y estabilizando componentes sinápticos clave. Las neuroliginas interactúan con otras proteínas postsinápticas para localizar receptores y canales neurotransmisores en la densidad postsináptica a medida que la célula madura. La secuencia de aminoácidos de la neuroligina 4 se muestra a continuación:

MSRPQGLLWLPFLFTPCVMLNSNVLLWLTALAIFKTLIDSQAQYPPVNTNYGKIRGLRPLPN
 EILGPVEQYLGVPYASPTGERRFQPEPPSSWTGIRNTTQFAAVCPQHLDERSLLHDMPLPIWF
 TANLDTLMTYVQDQNECLYLNIYVPTEDDIHDQNSKKPMVMYIHGGSYMEGTGNMIDGSI
 LASYGNVIVITINYRLGILGLSTGDAQAKGNYGLLDQIQALRWIEENVGAFFGDPKRVTFGS
 GAGASCVSLTLSHYSEGLFQKAIQSGTALSSWAVNYQPAKYTRILADKVGCMMLDITDMVE
 CLRNKNYKELIQQTITPATYHIAFGPVIDGDVIPDDPQILMEQGEFLNYDIMLGVNQGEGLKFV
 DGIVDNEDGVTPNDFDFSVSNFVDNLYGYPEGKDTLRETIKFMYTDWADKENPERRKTLVA
 LFTDHQWVAPAVATADLHAQYGSPTYFYAFYHHCQSEMKPWADSAHGDEVYVFGIPMI
 GPTELFSCNFSKNDVMSAVVMYWTNFAKTGDPNQVPVQDTKFIHTKPNRFEVAVWSKYNP
 KDQLYLHIGLKPRVRDHYRATKVAFWLELVPHLHNLNEIFQYVSTTKVPPDMSFPGYTRRS
 PAKIWPTTKRPAITPANNPKHSDPHKTPGPDITVLIETKRDYSTELSVTIAGASLLFLNLAFAA

 LYYKKDKRRHETHRRPSPQRNTTNDIAHIQNEEIMSLQMKQLEHDHECESLQAHDTLRLTCPP
 DYTLTLRRSPDDIPLMTPNTIT MIPNTLTGMQPLHTFNTFSGGQNSTNLPHGHSTTRV
 [SEQ ID NO: 57]

- Por consiguiente, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 57 o un fragmento o variante de la misma como se describe aquí. Como se describió anteriormente, los epítomos adecuados de cáncer/tumor de neuroligina 4 son conocidos de la literatura o se pueden identificar utilizando bases de datos de epítomo de cáncer/tumor, por ejemplo van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Base de datos de péptidos: antígenos tumorales definidos por células T. Cancer Immun 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T CD4⁺ o CD8⁺ se clasifican en cuatro grupos principales según su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (versión TANTIGEN 1.0, 1 de diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en el Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

PTPRz1

- La tirosina-proteína fosfatasa zeta de tipo receptor, también conocida como fosfacano, es una proteína de membrana de tipo I de paso único con dos dominios citoplasmáticos tirosina-proteína fosfatasa, un dominio de anhidrasa alfa-carbónica y un dominio de fibronectina tipo III y pertenece a la familia de receptores de la tirosina fosfatasa. Tanto la proteína como el transcrito son sobreexpresados en células de glioblastoma, promoviendo su migración haptotáctica. La secuencia de aminoácidos de PTPRz1 se muestra a continuación:

```
MRILKRFLACIQLLCVCRLDWANGYYRQQRKLVEEIGWSYTGALNQKNWGGKYPTCNSPKQ
SPINIDEDLTQVNVNLKKLFQGWDKTSLENTFIHNTGKTVEINLTNDYRVSGGVSEMFVFKASK
ITFWHGKCNMSSDGESEHSLEGQKPLEMQICYCFDADRFSFEEAVKGGKGLRALSILFEVGTEN
LDFKAIIDGVEVSFRFGKQAALDPFILLNLLPNSTDKYYIYNGSLTSPCTDVTVDWVFKDVTISIE
SQLAVFCEVLTMQQSGYVMLMDYLQNNFREQYKFSRQVFSSYTGKEEIHAEVCSSEPENVQ
ADPENYTSLLVTWERPRVYDTMIEKFAVLYQQLDGEDQTKHEFLTDGYQDLGAILNLLPN
MSYVLQIVAICTNGLYGKYSDDLIVDMPTDNPELDLPELIGTEEIIKEEEEGKDIEEGAIVNPGRD
SATNQIRKKEPQISTTTTHYNRIGTKYNEAKTNRSPTRGSEFSGKGDVPNTSLNSTSQPVTKLATE
KDISLTSQVTLEPHTVEGTSASLNDGSKTVLRSPHMNLSGTAESLNTVSITEYEESLLTSFKLDT
GAEDSSGSSPATSAIPFISENISQGYIFSENPETITYDVLIPESARNASEDSTSSGSESLKDPSMEG
NVWFPSSTDITAQPDVGSGRESFLQNTYETIRVDESEKTKSFSAGPVMSQGSPVTDLEMPHYS
TFAYFPTVTPHAFTPSSRQQLVSTVNVVYSQTTPQPVYNGETPLQPSYSSEVFPLVTPLLLDNQ
ILNTTPAASSSDSALHATPVFSPVDVSFESILSSYDGAPLLPFSSASFSELFRLHHTVSQILPQVTS
TESDKVPLHASLPVAGGDLLEPSLAQYSDVLSTTHAASETFEGSESGVLYKTMFSQVEPPSSD
AMMHARSSGPEPSYALSDNEGSQHIFTVSYSIAIPVHDSVGVTYQGSLSFGPSHIPKSSLITPT
ASLLQPTHALSGDGEWGSASSDSEFLPDGLTALNISSPVSVAEFTYTTSVFGDDNKALSKEI
IYGNETELQIPSFNEMVYPSESTVMPNMYDNVNKLNASLQETSVSISSTKGMFPGSLAHTTTKV
DHEISQVPENNFVQPTHTVSQASGDTSLKPVLSENPASSDPASSEMLSPSTQLLFYETSASF
TEVLLQPSFQASDQVDTLLKTVLPAVPSDPILVETPKVDKISSTMLHLIVSNSASSENMLHSTSPVF
DVSPTSHMHSASLQGLTISYASEKYEPVLLKSESSHQVVPVSLYSNDELFTQANLEINQAHPPKGR
HVFATPVLSIDEPLNLTINKLIHSDEILTSTKSSVTGKVFAGIPTVASDFTVSTDHSPVIGNGHVAIT
AVSPHRDGSVTSTKLLFSPKATSELSHSAKSDAGLVGGGEDGDTDDDDDDDDDRGSDGLS
IHKCMSCSSYRESQEKVMNDSDTHENSLMDQNNPISYLSSENSEEDNRVTSVSSDSQTGMDRS
PGKSPSANGLSQKHNDGKEENDIQTGSALLPLSPESKAWAVLTSDEESGGQGTSDSLNENET
STDFSFADTNEKDADGILAAGDSEITPGFPQSPTSSVTSSENSEVFHVSEAEASNSSHESRIGLAEGL
ESEKKAVIPLVIVSALTICLVVLVGLIYWRKCFQTAHFYLEDSTSPRVISTPPTPIFISDDVGAIPK
HFPKHVADLHASSGFTEEFELKEFYQEVQSCVTLGITADSSNHPDNKHKNRYINIVAYDHSR
VKLAQLAEKDGLTDYINANYVDGYNRPKAYIAAQGPLKSTAEDFWRMIWEHNVEVIMITN
LVEKGRRKCDQYWPADGSEYGNFLVTQKSVQVLAAYTVRNFTLRNTKIKKGSQKGRPSGRV
VTQYHYTQWPDMPGVPEYSLPVLTFVRKAAYAKRHAVGPVVVHCSAGVGRTGTIYVLDMLQ
QIQHEGTVNIFGLKHRSQRNYLVQTEEQYVFIHDTLVEAILSKETEVLDSHIHAYVNALLIPGP
AGKTKLEKQFQLLSQSNIQSDYSAALKQCNREKNRTSSIIIPVERSRVGISSLSGEGTDYINASY
```

MGYYQSNFIITQHPLLHTIKDFWRMIWDHNAQLVVMIPDGQNMAEDEFVYWPKNKDEPIN
CESFKVTLMAEEHKCLSNEEKLIQDFILEATQDDYVLEVRHFQCPKWPNPDSPISKTFELISVIKEE
AANRDGPMIVHDEHGGVTAGTFCALTLMHQLEKENSVDVYQVAKMINLMRPGVFADIEQ
YQFLYKVL SLVSTRQEENPSTSLDSNGAALPDGNIAESLES LV
[SEQ ID NO: 58]

Por consiguiente, un complejo preferente para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 58 o un fragmento o variante de la misma como se describe aquí. Como se describió anteriormente, los epítopos adecuados de cáncer/tumor de PTPRz1 son conocidos de la literatura o se pueden identificar utilizando bases de datos de epítipo de cáncer/tumor, por ejemplo van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Base de datos de péptidos: antígenos tumorales definidos por células T. Cancer Immun 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por las células T CD4⁺ o CD8⁺ se clasifican en cuatro grupos principales según su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (versión TANTIGEN 1.0, 1 de diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en el Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

Preferiblemente, el complejo para uso según la presente invención comprende al menos un epítipo tumoral de un antígeno seleccionado del grupo consistente en EGFRvIII, EphA2, Her2/neu, IL-13R α 2, survivina, TRP-2, brevicin, neuroligina 4 y PTPRz1, tal como un epítipo según cualquiera de las SEQ ID NO: 47, 53 y 62; en especial, el al menos un epítipo tumoral es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo consistente en EGFRvIII, EphA2, IL-13R α 2, TRP-2 y brevicin, tal como un epítipo de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 47 y 62; e incluso con mayor preferencia, el al menos un epítipo tumoral es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo consistente en EGFRvIII, EphA2 y brevicin, tal como un epítipo según la SEQ ID NO: 47.

También es preferente que el complejo para su uso según la presente invención comprenda

- uno o más epítopos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales del mismo;
- uno o más epítopos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de Her2/neu o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de IL-13R α 2 (tales como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de survivina (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de brevicin o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de neuroligina 4 o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y/o
- uno o más epítopos de PTPRz1 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Como se describió anteriormente, otros epítopos adicionales de esos antígenos (además de los epítopos ilustrados) se pueden recuperar fácilmente de las bases de datos de epítopos de cáncer/tumor, por ejemplo de van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Base de datos de péptidos: antígenos tumorales definidos por células T. Cancer Immun 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, o de la base de datos "Tantigen" (TANTIGEN versión 1.0, 1 de diciembre de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en el Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

Una "variante de secuencia" es como se definió anteriormente, es decir, una variante de secuencia tiene una secuencia (de aminoácidos) que es al menos un 70%, al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, con particular preferencia al menos un 95%, con total preferencia al menos un 99% idéntica a la secuencia de referencia. Una variante de secuencia "funcional" significa, en el contexto de un epítipo, que la función como epítipo no se ve afectada o abolida. Sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de un epítipo de un antígeno de cáncer/tumor como se describe aquí no está mutada y, por tanto, es idéntica a la secuencia de epítipo de referencia.

Es igualmente preferente que el complejo para su uso según la presente invención comprenda

- un fragmento de EGFRvIII que comprende uno o más epítopos o una variante de secuencia funcional del mismo;

- un fragmento de EphA2 (tal como un fragmento del polipéptido según la SEQ ID NO: 48) que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional del mismo;
- un fragmento de Her2/neu (tal como un fragmento del polipéptido según la SEQ ID NO: 50) que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional del mismo;
- 5 – un fragmento de L-13Rα2 (tal como un fragmento del polipéptido según la SEQ ID NO: 61) que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional del mismo;
- un fragmento de survivina (tal como un fragmento del polipéptido según la SEQ ID NO: 52) que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional del mismo;
- 10 – un fragmento de TRP-2 (tal como un fragmento del polipéptido según la SEQ ID NO: 54) que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional del mismo;
- un fragmento de brevicin (tal como un fragmento del polipéptido según la SEQ ID NO: 56) que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional del mismo;
- un fragmento de neurologina 4 (tal como un fragmento del polipéptido según la SEQ ID NO: 57) que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional del mismo; y/o
- 15 – un fragmento de PTPRz1 (tal como un fragmento del polipéptido según la SEQ ID NO: 58) que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional del mismo.

Tal como se usa aquí, un "fragmento" de un antígeno comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos del antígeno, preferiblemente al menos 15 aminoácidos consecutivos del antígeno, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos consecutivos del antígeno, incluso más preferiblemente al menos 25 aminoácidos consecutivos del antígeno y con total preferencia al menos 30 aminoácidos consecutivos del antígeno. Así, un fragmento de EGFRvIII comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de EGFRvIII, preferiblemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de EGFRvIII, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de EGFRvIII, incluso más preferiblemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de EGFRvIII y con total preferencia al menos 30 aminoácidos consecutivos de EGFRvIII; un fragmento de survivina comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de survivina (SEQ ID NO: 52), preferiblemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de survivina (SEQ ID NO: 52), más preferiblemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de survivina (SEQ ID NO: 52), incluso más preferiblemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de survivina (SEQ ID NO: 52) y con total preferencia al menos 30 aminoácidos consecutivos de survivina (SEQ ID NO: 52); un fragmento de EphA2 comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de EphA2 (SEQ ID NO: 48), preferiblemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de EphA2 (SEQ ID NO: 48), más preferiblemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de EphA2 (SEQ ID NO: 48), incluso más preferiblemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de EphA2 (SEQ ID NO: 48) y con total preferencia al menos 30 aminoácidos consecutivos de EphA2 (SEQ ID NO: 48); un fragmento de Her2/neu comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de Her2/neu (SEQ ID NO: 50), preferiblemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de Her2/neu (SEQ ID NO: 50), más preferiblemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de Her2/neu (SEQ ID NO: 50), incluso más preferiblemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de Her2/neu (SEQ ID NO: 50) y con total preferencia al menos 30 aminoácidos consecutivos de Her2/neu (SEQ ID NO: 50); un fragmento de IL-13Rα2 comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de IL-13Rα2 (SEQ ID NO: 61), preferiblemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de IL-13Rα2 (SEQ ID NO: 61), más preferiblemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de IL-13Rα2 (SEQ ID NO: 61), incluso más preferiblemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de IL-13Rα2 (SEQ ID NO: 61) y con total preferencia al menos 30 aminoácidos consecutivos de IL-13Rα2 (SEQ ID NO: 61); un fragmento de TRP-2 comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de TRP-2 (SEQ ID NO: 54), preferiblemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de TRP-2 (SEQ ID NO: 54), más preferiblemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de TRP-2 (SEQ ID NO: 54), incluso más preferiblemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de TRP-2 (SEQ ID NO: 54) y con total preferencia al menos 30 aminoácidos consecutivos de TRP-2 (SEQ ID NO: 54); un fragmento de brevicin comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de brevicin (SEQ ID NO: 56), preferiblemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de brevicin (SEQ ID NO: 56), más preferiblemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de brevicin (SEQ ID NO: 56), incluso más preferiblemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de brevicin (SEQ ID NO: 56) y con total preferencia al menos 30 aminoácidos consecutivos de brevicin (SEQ ID NO: 56); un fragmento de neurologina 4 comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de neurologina 4 (SEQ ID NO: 57), preferiblemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de neurologina 4 (SEQ ID NO: 57), más preferiblemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de neurologina 4 (SEQ ID NO: 57), incluso más preferiblemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de neurologina 4 (SEQ ID NO: 57) y con total preferencia al menos 30 aminoácidos consecutivos de neurologina 4 (SEQ ID NO: 57); un fragmento de PTPRz1 comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de PTPRz1 (SEQ ID NO: 58), preferiblemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de PTPRz1 (SEQ ID NO: 58), más preferiblemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de PTPRz1 (SEQ ID NO: 58), incluso más preferiblemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de PTPRz1 (SEQ ID NO: 58) y con total preferencia al menos 30 aminoácidos consecutivos de PTPRz1 (SEQ ID NO: 58).

60 Una variante de secuencia funcional de dicho fragmento tiene una secuencia (de aminoácidos) que es al menos un 70%, al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, incluso

más preferiblemente al menos un 90%, con particular preferencia al menos un 95%, con total preferencia al menos un 99% idéntica a la secuencia de referencia y se mantiene la función del epítipo de al menos uno, preferiblemente de todos, los epítipos comprendidos por el fragmento.

Preferentemente, dicho complejo comprende

- 5 – uno o más epítipos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales del mismo;
- uno o más epítipos de EphA2 o sus variantes de secuencia funcionales; y
- uno o más epítipos de IL-13Rα2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- 10 – uno o más epítipos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y/o
- uno o más epítipos de brevicin o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGEA3, YKL-40, neuropilina 4 o PTPRz1.

Con mayor preferencia, dicho complejo comprende

- 15 – uno o más epítipos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales del mismo;
- uno o más epítipos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítipos de IL-13Rα2 (tales como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- 20 – uno o más epítipos de TRP-2 o variantes de secuencia funcional de los mismos y
- uno o más epítipos de brevicin o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGEA3, YKL-40, neuropilina 4 o PTPRz1.

También es preferente que dicho complejo comprenda

- 25 – uno o más epítipos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales del mismo;
- uno o más epítipos de IL-13Rα2 (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítipos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- uno o más epítipos de brevicin o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

- 30 Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGEA1, MAGE-A3, YKL-40, neuropilina 4 o PTPRz1..

También es preferente que dicho complejo comprenda

- uno o más epítipos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales del mismo;
- 35 – uno o más epítipos de IL-13Rα2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítipos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- uno o más epítipos de brevicin o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

- 40 Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EphA2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGEA1, MAGE-A3, YKL-40, neuropilina 4 o PTPRz1.

También es preferente que dicho complejo comprenda

- uno o más epítipos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítipos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- 45 – uno o más epítipos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítipos de brevicin o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de IL-13Ralpha2, CMV, gp100, Her2/neu, survivin, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

Con mayor preferencia, dicho complejo comprende

- 5
- uno o más epítipos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales del mismo;
 - uno o más epítipos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - uno o más epítipos de IL-13Rα2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
 - uno o más epítipos de brevicin o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

- 10 Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de 2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGEA1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 or PTPRz1.

ES también muy preferente que dicho complejo comprenda

- 15
- uno o más epítipos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales del mismo;
 - uno o más epítipos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - uno o más epítipos de IL-13Rα2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
 - uno o más epítipos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

- 20 Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de brevicin, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGEA1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda

- 25
- uno o más epítipos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales del mismo;
 - uno o más epítipos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - uno o más epítipos de IL-13Rα2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, βhCG, survivina, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralpha2.

También se prefiere particularmente que dicho complejo comprenda

- 30
- uno o más epítipos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales del mismo;
 - uno o más epítipos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - uno o más epítipos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

- 35 Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de brevicin, IL-13Ralpha2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda

- 40
- uno o más epítipos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales del mismo;
 - uno o más epítipos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - uno o más epítipos de brevicin o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de IL-13Ralpha2, TRP-2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítopos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de IL-13R α 2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- 5 – uno o más epítopos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EphA2, brevicán, CMV, gp100, Her2/neu, survivin, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- 10 – uno o más epítopos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de IL-13R α 2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de brevicán o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

- 15 Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EphA2, TRP-2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítopos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- 20 – uno o más epítopos de brevicán o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EphA2, IL-13R α 2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítopos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- 25 – uno o más epítopos de IL-13R α 2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- uno o más epítopos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, brevicán, CMV, gp100, Her2/neu, survivin, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

- 30 También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítopos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de IL-13R α 2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- uno o más epítopos de brevicán o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

- 35 Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, TRP-2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítopos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítopos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- 40 – uno o más epítopos de brevicán o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, IL-13R α 2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligin 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítomos de IL-13Rα2 (tal como el epítomo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
- uno o más epítomos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- uno o más epítomos de brevicin o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

5 Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítomo EGFRvIII, EphA2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítomos de EGFRvIII (tal como el epítomo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- 10 - uno o más epítomos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítomo de IL-13Rα2, brevicin, TRP-2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- 15 - uno o más epítomos de EGFRvIII (tal como el epítomo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- uno o más epítomos de IL-13Rα2 (tal como el epítomo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

20 Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítomo de EphA2, brevicin, TRP-2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítomos de EGFRvIII (tal como el epítomo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- uno o más epítomos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

25 Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítomo de EphA2, IL-13Rα2, brevicin, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítomos de EGFRvIII (tal como el epítomo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- 30 - uno o más epítomos de brevicin o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítomo de EphA2, IL-13Rα2, TRP-2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítomos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- 35 - uno o más epítomos de IL-13Rα2 (tal como el epítomo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítomo de EGFRvIII, TRP-2, brevicin, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- 40 - uno o más epítomos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- uno o más epítomos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, IL-13Ralpha2, brevicán, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- 5
- uno o más epítipos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
 - uno o más epítipos de brevicán o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, IL-13Ralpha2, TRP-2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- 10
- uno o más epítipos de IL-13Rα2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
 - uno o más epítipos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, EphA2, brevicán, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- 15
- uno o más epítipos de IL-13Rα2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
 - uno o más epítipos de brevicán o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, EphA2, TRP-2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

- 20
- También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítipos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos; y
- uno o más epítipos de brevicán o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, EphA2, IL-13Ralpha2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

- 25
- También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítipos de EGFRvIII (tal como el epítipo de acuerdo con la SEQ ID NO: 47) o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EphA2, TRP-2, brevicán, IL-13Ralpha2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

- 30
- También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítipos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, IL-13Ralpha2, TRP-2, brevicán, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

- 35
- Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EphA2, TRP-2, brevicán, IL-13Ralpha2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuroligina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- uno o más epítipos de IL-13Rα2 (tal como el epítipo según la SEQ ID NO: 62) o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, EphA2, TRP-2, brevicán, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuropilina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- 5 – uno o más epítipos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, EphA2, IL-13Ralpha2, brevicán, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuropilina 4 o PTPRz1.

También es particularmente preferente que dicho complejo comprenda:

- 10 – uno o más epítipos de brevicán o variantes de secuencia funcionales de los mismos.

Tal complejo preferiblemente no comprende ningún epítipo de EGFRvIII, EphA2, IL-13Ralpha2, TRP-2, CMV, gp100, Her2/neu, survivina, hTert, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, neuropilina 4 o PTPRz1.

Componente c) – Péptido agonista de TLR

- 15 En el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, el péptido agonista de TLR permite un aumento de la dirección de la vacuna hacia las células dendríticas junto con autoajustabilidad. El enlace físico de un péptido agonista de TLR al CPP y el al menos un antígeno o epítipo antigénico de acuerdo con la presente invención en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención proporciona una respuesta inmune mejorada mediante la estimulación simultánea de células presentadoras de antígeno, en particular células dendríticas, que interiorizan, metabolizan y presentan antígeno(s).

- 20 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, un "péptido agonista de TLR" es un agonista de un receptor tipo Toll (TLR), es decir, se une a un TLR y activa el TLR, en particular para producir una respuesta biológica. Además, el péptido agonista de TLR es un péptido, polipéptido o proteína como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, el péptido agonista de TLR comprende de 10 a 150 aminoácidos, más preferiblemente de 15 a 130 aminoácidos, incluso más preferiblemente de 20 a 120 aminoácidos, con particular
- 25 preferencia de 25 a 110 aminoácidos y con total preferencia de 30 a 100 aminoácidos.

- Los receptores tipo Toll (TLR) son proteínas transmembrana que se caracterizan por dominios extracelulares, transmembrana y citosólicos. Los dominios extracelulares, que contienen repeticiones ricas en leucina (LRR), con forma de herradura, están implicados en el reconocimiento de patrones moleculares comunes derivados de diversos microbios. Los receptores tipo Toll incluyen TLRs1-10. En la técnica están bien documentados
- 30 compuestos capaces de activar los receptores TLR y modificaciones y derivados de los mismos. TLR1 puede ser activado por las lipoproteínas bacterianas y sus formas acetiladas, TLR2 también puede ser activado por glucolípidos bacterianos Gram positivos, LPS, LP A, LTA, fimbrias, proteínas de la membrana externa, proteínas de choque térmico bacterianas o del huésped y Mycobacterial lipoarabinomananos TLR3 puede ser activado por ARNs, en particular de origen viral, o por el compuesto químico poli(LC). TLR4 puede ser activado
- 35 por LPS Gram negativas, LTA, proteínas de choque térmico del huésped o de origen bacteriano, proteínas de envoltura o revestimiento viral, taxol o derivados de los mismos, oligosacáridos y fibronectinas que contienen hialuronano. TLR5 puede activarse con flagelos bacterianos o flagelina. TLR6 puede ser activado por lipoproteínas micobacterianas y factor soluble termo lábil de estreptococos del grupo B (GBS-F) o staphylococcus modulin. TLR7 puede ser activado por imidazoquinolinas. TLR9 puede activarse mediante
- 40 ADN CpG no metilado o complejos cromatina-IgG.

- Preferiblemente, el péptido agonista de TLR comprendido en el complejo para su uso según la presente invención es un agonista de TLR1, 2, 4, 5, 6 y/o 10. Los TLR se expresan en la superficie celular (TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10) o en membranas de orgánulos intracelulares, como los endosomas (TLR3, 4, 7, 8 y 9). Los ligandos naturales para los receptores endosomales resultaron ser moléculas basadas en ácido nucleico (excepto
- 45 TLR4). Los TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10 expresados en la superficie celular reconocen patrones moleculares de microbios extracelulares (Monie, T. P., Bryant, C. E., et al. 2009: Activating immunity: Lessons from the TLRs and NLRs. Trends Biochem. Sci. 34(11), 553-561). Los TLR se expresan en diversos tipos de células, pero prácticamente todos los TLR se expresan en DC, lo que permite que estas células especializadas detecten todos los posibles patógenos y señales de peligro.

- 50 Sin embargo, TLR2, 4 y 5 se expresan constitutivamente en la superficie de las CD. Por consiguiente, preferentemente el péptido agonista de TLR comprendido en el complejo para su uso según la presente invención es un péptido agonista de de TLR2, TLR4 y/o TLR5. Incluso más preferiblemente, el péptido agonista

de TLR es un péptido agonista de TLR2 y/o de TLR4. De manera particularmente preferente, el péptido agonista de TLR es un péptido agonista de TLR4. Con total preferencia, el péptido agonista de TLR es un péptido agonista de TLR que es a la vez agonista de TLR2 y TLR4. TLR2 puede detectar una amplia variedad de ligandos derivados de bacterias, virus, parásitos y hongos. La especificidad del ligando a menudo se determina por la interacción de TLR2 con otros TLR, como TLR1, 6 o 10, o moléculas no TLR, como dectina-1, CD14 o CD36. La formación de un heterodímero con TLR1 permite que TLR2 identifique lipoproteínas o triacil lipopéptidos de origen (mico)bacteriano, como Pam3CSK4 y peptidoglucano (PGA; Gay, NJ y Gangloff, M. (2007) Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 141-165; Spohn, R., Buwitt-Beckmann, U., et al. (2004): Synthetic lipopeptide adjuvants and Toll-like receptor 2-Structure-activity relationships. *Vaccine* 22(19), 2494-2499). La heterodimerización de TLR2 y 6 permite la detección de diacil lipopéptidos y zimosan. El lipopolisacárido (LPS) y sus derivados son ligandos para TLR4 y flagelina para TLR5 (Bryant, C. E., Spring, D. R., et al. (2010). The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(1), 8-14).

TLR2 interactúa con una amplia gama de ligandos estructuralmente diversos, incluidas moléculas expresadas por microbios y hongos. Se han identificado múltiples agonistas de TLR2, incluyendo lipopéptidos naturales y sintéticos (por ejemplo *Mycoplasma fermentans*, lipopéptido activador de macrófagos (MALP-2)), peptidoglucanos (PG tal como de *S. aureus*), lipopolisacáridos de diversas cepas bacterianas (LPS), polisacáridos (por ejemplo zimosan), estructuras de anclaje glicosilfosfatidil-inositol de bacterias grampositivas (por ejemplo ácido lipoteicoico (LTA) y lipo-arabinomano de micobacterias y lipomannas de *M. tuberculosis*). Ciertos determinantes virales también pueden desencadenarse a través de TLR2 (Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol.* 2009; 10(11):1200-7). Los lipopéptidos bacterianos son componentes estructurales de las paredes celulares. Consisten en una fracción s-glicerilcisteína acilada con la que se puede conjugar un péptido a través del residuo cisteína. Ejemplos de agonistas de TLR2 que son lipopéptidos bacterianos incluyen MALP-2 y su análogo sintético di-palmitoil-S-gliceril cisteína (Pam2Cys) o tri-palmitoil-S-gliceril cisteína (Pam3Cys).

Diversos ligandos interactúan con TLR4, incluyendo monofosforil lípido A de *Salmonella minnesota* R595 (MPLA), lipopolisacáridos (LPS), mananos (*Candida albicans*), glucoinositolfosfolípidos (*Trypanosoma*), proteínas de envoltura viral (RSV y MMTV) y antígenos endógenos, incluyendo fibrinógeno y proteínas de choque térmico. Tales agonistas de TLR4 se describen, por ejemplo, en Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* Feb 24; 2006; 124(4):783-801 o en Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 30; 2009 388(4):621-. LPS, que se encuentra en la membrana externa de bacterias gramnegativas, es el ligando TLR4 más ampliamente estudiado. Péptidos agonistas de TLR4 derivados de LPS adecuados se describen, por ejemplo, en la WO 2013/120073 (A1).

El TLR5 se desencadena por una región de la molécula de flagelina expresada por casi todas las bacterias móviles. Por tanto, la flagelina, o los péptidos o proteínas derivados de flagelina y/o variantes o fragmentos de la flagelina también son adecuados como péptidos agonistas de TLR comprendidos en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención.

Así, ejemplos de péptidos agonistas de TLR incluyen los lipopéptidos agonistas de TLR2 MALP-2, Pam2Cys y Pam3Cys o modificaciones de los mismos, diferentes formas del agonista de TLR4 LPS, por ejemplo L3-LPS de tipo salvaje de *N. meningitidis* y el mutante penta-acilado LpxL1-LPS, y el agonista de TLR5 flagelina.

Sin embargo, es preferente que el péptido agonista de TLR comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención no sea un lipopéptido ni una lipoproteína, ni un glucopéptido ni una glucoproteína, más preferiblemente, el péptido agonista de TLR comprendido en el complejo para su uso según la presente invención es un péptido, polipéptido o proteína clásico tal como se definen aquí.

Un péptido agonista de TLR2 preferente es la anexina II o un fragmento inmunomodulador de la misma, descrito en detalle en la WO 2012/048190 A1 y en la solicitud de patente US 13/0331546, en particular un péptido agonista de TLR2 que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 7 de la WO 2012/048190 A1 o fragmentos o variantes de los mismos.

Así, es particularmente preferente un péptido agonista de TLR2 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 15 o una variante de secuencia del mismo como se describió anteriormente como componente c), es decir, como al menos un péptido agonista de TLR, comprendido en el complejo para su uso según la presente invención.

STVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 15 (péptido agonista de TLR2 Anaxa)

- Con respecto a TLR4, los péptidos agonistas de TLR particularmente preferentes corresponden a motivos que se unen a TLR4, en particular (i) péptidos miméticos del ligando natural de LPS (RS01: Gln-Glu-Ile-Asn-Ser-Ser-Tyr y RS09: Ala-Pro-Pro-His-Ala-Leu-Ser) y (ii) péptidos derivados de fibronectina. La glucoproteína celular fibronectina (FN) tiene múltiples isoformas generadas a partir de un solo gen mediante empalme alternativo de tres exones. Una de estas isoformas es el dominio extra A (EDA), que interactúa con TLR4.

- Otros péptidos agonistas de TLR adecuados comprenden un dominio EDA de fibronectina o un fragmento o variante del mismo. Dichos dominios EDA de fibronectina adecuados o fragmentos o variantes de los mismos se describen en la EP 1913954 B1, EP 2476440 A1, US 2009/0220532 A1 y WO 2011/101332 A1. De este modo, un péptido agonista de TLR4 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 45 o una variante de secuencia del mismo como se describió anteriormente es particularmente preferente como componente c), es decir, como al menos un péptido agonista de TLR comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención.

NIDRPKGLAFTDQDVDSIKIAWESPQGQVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELQGLRP

- GSEYTVSVVALHDDMESQPLIGQST
SEQ ID NO: 45 (péptido agonista de TLR4 EDA)

Además, se supone que la proteína del grupo de alta movilidad box 1 (HMGB1) y sus fragmentos peptídicos son agonistas de TLR4. Dichos péptidos derivados de HMGB1 se describen, por ejemplo, en la US 2011/0236406 A1.

- El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos un péptido agonista de TLR, preferiblemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende más de un péptido agonista de TLR, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más péptidos agonistas de TLR, más preferiblemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende (al menos) dos o tres péptidos agonistas de TLR, incluso más preferiblemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende (al menos) cuatro o cinco péptidos agonistas de TLR. Si está comprendido más de un péptido agonista de TLR en el complejo para su uso según la presente invención, se entiende que dicho péptido agonista de TLR en particular también está unido covalentemente en el complejo para su uso según la presente invención, por ejemplo a otro péptido agonista de TLR y/ o a un componente a), es decir, un péptido de penetración celular, y/o a un componente b), es decir un antígeno o epítipo antigénico.
- En una realización particularmente preferente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende un único péptido agonista de TLR. En particular, en esta realización particularmente preferida, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende un único péptido agonista de TLR y ningún otro componente con propiedades agonistas de TLR excepto el único péptido agonista de TLR como se describe.
- Los diversos péptidos agonistas de TLR comprendidos en el complejo para su uso según la presente invención pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, los diversos péptidos agonistas de TLR comprendidos en el complejo para su uso según la presente invención son diferentes entre sí.

- Además, es preferente que el más de un antígeno o epítipo antigénico, en particular los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 antígenos o epítopos antigénicos, o más péptidos agonistas de TLR, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 agonistas de TLR se dispongan consecutivamente en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. Esto significa, en particular, que todos los péptidos agonistas de TLR comprendidos en el complejo se disponen en un tramo que no está interrumpido ni por el componente a), es decir el péptido de penetración celular, ni por el componente b), es decir el al menos un antígeno o epítipo antigénico. Por el contrario, el componente a) y el componente b) se disponen en el complejo, por ejemplo, antes o después de dicho tramo de todos los péptidos agonistas de TLR. Sin embargo, los péptidos agonistas de TLR dispuestos consecutivamente de esta manera pueden estar unidos entre sí, por ejemplo, mediante un espaciador o enlazador como se describe a continuación, que no es el componente a), es decir, un péptido de penetración celular, ni el componente b), es decir al menos un antígeno o epítipo antigénico.

- Alternativamente, sin embargo, los diversos péptidos agonistas de TLR también pueden disponerse de cualquier otra manera en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, por ejemplo con el componente a) y/o el componente b) dispuestos entre dos o más péptidos agonistas de TLR, es decir, donde

uno o más péptidos agonistas de TLR están entre el componente a) y el componente b) (o viceversa) y, opcionalmente, uno o más péptidos agonistas de TLR en el otro extremo respectivo del componente a) y/o del componente b).

- Se entiende que varios péptidos agonistas de TLR diferentes que activan los mismos o diferentes receptores TLR pueden estar comprendidos ventajosamente en un único complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, se pueden distribuir varios péptidos agonistas de TLR diferentes que activan los mismos o diferentes receptores TLR en subconjuntos de diferentes péptidos agonistas de TLR que activan los mismos o diferentes receptores TLR, comprendidos en diferentes complejos de acuerdo con la presente invención, por lo que dichos complejos diferentes que comprenden diferentes subconjuntos ventajosamente pueden administrarse simultáneamente, por ejemplo en una sola vacuna, a un sujeto que lo necesite.

Enlace de los componentes a), b) y c) en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención

- En el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, los componentes a), b) y c) están enlazados covalentemente, es decir, el enlace entre dos de los tres componentes a), b) y c) del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un enlace covalente. Preferiblemente, dos de los tres componentes a), b) y c) del complejo para su uso según la presente invención están unidos covalentemente entre sí (es decir, el "primer" y el "segundo" componente), y el tercer componente de los tres componentes a), b) y c) está unido covalentemente al primer componente de los tres componentes a), b) y c) o al segundo componente de los tres componentes a), b) y c). Así, preferiblemente, se forma una molécula lineal. Sin embargo, también es concebible que cada uno de los tres componentes a), b) y c) esté enlazado covalentemente a los otros dos componentes de los tres componentes a), b) y c).

- Un "enlace covalente" (también unión covalente) tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a un enlace químico que implica el intercambio de pares de electrones entre átomos. En particular, un "enlace covalente" (también unión covalente) implica un equilibrio estable de fuerzas de atracción y repulsión entre los átomos que comparten electrones. Para muchas moléculas, el intercambio de electrones permite que cada átomo alcance el equivalente de una capa externa completa, correspondiente a una configuración electrónica estable. El enlace covalente incluye muchos tipos de interacciones, incluyendo, por ejemplo, enlace σ , enlace π , enlace metal-metal, interacciones agósticas y enlaces de tres electrones y dos centros. Por consiguiente, el complejo para su uso según la presente invención también puede denominarse "compuesto", en particular puede denominarse "molécula".

- Preferiblemente, en el complejo para su uso según la presente invención, los componentes a), b) y c) están unidos covalentemente por acoplamiento químico de cualquier manera adecuada conocida en la técnica, tal como métodos de reticulación. Sin embargo, se llama la atención sobre el hecho de que muchos métodos de reticulación química conocidos no son específicos, es decir, no dirigen el punto de acoplamiento a ningún sitio en particular de los componentes a), b) y c). Por tanto, el uso de agentes de reticulación no específicos puede atacar sitios funcionales o bloquear estéricamente sitios activos, haciendo que los componentes fusionados del complejo para su uso según la presente invención sean biológicamente inactivos. Se hace referencia al conocimiento del experto en la técnica para bloquear grupos potencialmente reactivos mediante el uso de grupos protectores apropiados. Alternativamente, se puede aplicar el uso de las potentes y versátiles técnicas de unión de oxima e hidrazona, que son entidades químico-selectivas que se pueden utilizar para la reticulación de los componentes a), b) y c). Esta tecnología de enlace se describe, por ejemplo, en Rose et al. (1994), JACS 116, 30.

- La especificidad de acoplamiento se puede aumentar mediante el acoplamiento químico directo a un grupo funcional que se encuentra solo una o varias veces en los componentes a), b) y/o c), qué grupo funcional se debe reticular con el otro de los componentes a), b) y c). Como ejemplo, se puede usar el grupo tiol de cisteína cuando solo un residuo cisteína está presente en un cierto componente a), b) o c) del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. Además, por ejemplo, si un determinado componente a), b) o c) no contiene residuos lisina, un reactivo de reticulación específico para aminas primarias será selectivo para el terminal amino del componente respectivo. Alternativamente, la reticulación también se puede llevar a cabo a través de la cadena lateral de un residuo ácido glutámico en el extremo N del péptido, de modo que se puede generar un enlace amida mediante su cadena lateral. Por tanto, puede ser ventajoso unir un residuo ácido glutámico al extremo N de un cierto componente a), b) o c). Sin embargo, si se va a introducir un residuo cisteína en un cierto componente a), b) o c), es preferente su introducción en o cerca de su extremo N o C-terminal. Existen métodos convencionales para tales alteraciones de la secuencia de aminoácidos basadas en modificaciones de ciertos componentes a), b) o c) por adición de uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo, entre otros, un residuo cisteína, a la secuencia de translocación, o por sustitución de al menos un residuo de la secuencia o secuencias de translocación que están comprendidas en el componente respectivo. En caso de que se use una cadena lateral de cisteína para fines de acoplamiento, un determinado componente a), b) o c)

preferiblemente tiene un residuo cisteína. Preferentemente, se debe evitar cualquier segundo residuo cisteína y, opcionalmente, se puede reemplazar cuando aparecen en el componente respectivo comprendido en el complejo para su uso según la presente invención. Cuando un residuo cisteína se reemplaza en la secuencia original de un cierto componente a), b) o c), normalmente es deseable minimizar los cambios resultantes en el plegamiento peptídico del componente respectivo. Los cambios en el plegamiento se minimizan cuando el reemplazo es química y estéricamente similar a la cisteína. Por tanto, es preferente la serina como reemplazo de la cisteína.

El acoplamiento de dos de los tres componentes a), b) y c) se puede llevar a cabo mediante un agente de acoplamiento o de conjugación que incluye reactivos de acoplamiento de síntesis peptídica estándar, tales como HOBt, HBTU, DICl, TBTU. Se pueden emplear diversos agentes de reticulación intermoleculares, véase, por ejemplo, Means y Feeney, *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, 1974, pp. 39-43. Entre estos reactivos se encuentran, por ejemplo, N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) o N,N'-(1,3-fenilen)bismaleimida; N,N'-etilen-bis(yodoacetamida) u otro reactivo de este tipo con 6 a 11 puentes de carbono metileno; y 1,5-difluor-2,4-dinitrobenceno. Otros agentes de reticulación útiles para este propósito incluyen: p,p'-difluor-m,m'-dinitrodifenilsulfona; adipimidato de dimetilo; cloruro de fenol-1,4-disulfonilo; hexametilendiisocianato o diisotiocianato, o azofenil-p-diisocianato; glutaraldehído y disdiazobencidina. Los agentes de reticulación pueden ser homobifuncionales, es decir, tener dos grupos funcionales que experimenten la misma reacción. Un agente de reticulación homobifuncional preferente es bismaleimidohexano (BMH). El BMH contiene dos grupos funcionales maleimida que reaccionan específicamente con compuestos que contienen sulfhidrilo en condiciones suaves (pH 6,5-7,7). Los dos grupos maleimida están unidos por una cadena hidrocarburo. Por lo tanto, el BMH es útil para la reticulación irreversible de proteínas (o polipéptidos) que contienen residuos cisteína. Los agentes de reticulación también pueden ser heterobifuncionales. Los agentes de reticulación heterobifuncionales tienen dos grupos funcionales diferentes, por ejemplo un grupo reactivo con amina y un grupo reactivo con tiol, que reticulan dos proteínas que tienen aminas y tioles libres, respectivamente. Ejemplos de agentes de reticulación heterobifuncionales son succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) y 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimida (SMPB), un análogo de cadena extendida de MBS. El grupo succinimidilo de estos reticulantes reacciona con una amina primaria y la maleimida reactiva con tiol forma un enlace covalente con el tiol de un residuo cisteína. Dado que los agentes de reticulación a menudo tienen baja solubilidad en agua, se puede agregar una fracción hidrófila, tal como un grupo sulfonato, al agente de reticulación, para mejorar su solubilidad en agua. Sulfo-MBS y sulfo-SMCC son ejemplos de agentes de reticulación modificados en relación a la solubilidad en agua. Muchos agentes de reticulación producen un conjugado que es esencialmente no escindible en condiciones celulares. Por tanto, algunos agentes de reticulación contienen un enlace covalente, tal como disulfuro, que se puede escindir en condiciones celulares. Por ejemplo, el reactivo de Traut, ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP) y 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) son entintadores reticulantes escindibles bien conocidas. El uso de un agente de reticulación escindible permite que el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o epítipo antigénico y el al menos un péptido agonista de TLR comprendidos en el complejo para su uso según la presente invención se separen entre sí después del suministro dentro de la célula diana. Para ello, también puede ser útil el enlace disulfuro directo. La reticulación química también puede incluir el uso de brazos espaciadores. Los brazos espaciadores proporcionan flexibilidad intramolecular o ajustan las distancias intramoleculares entre grupos conjugados y, por tanto, pueden ayudar a preservar la actividad biológica. Un brazo espaciador puede tener la forma de un resto proteico (o polipéptido) que incluye aminoácidos espaciadores, por ejemplo prolina. Alternativamente, un brazo espaciador puede ser parte del agente de reticulación, tal como en el "SPDP de cadena larga" (Pierce Chem. Co., Rockford, IL, cat. 21651 H). Numerosos agentes de reticulación, incluidos los discutidos anteriormente, están disponibles comercialmente. Las instrucciones detalladas para su uso están fácilmente disponibles de los proveedores comerciales. Se puede obtener más información detallada sobre la protección de la reticulación y la preparación del conjugado, útil en el contexto del enlace de los componentes a), b) y c) comprendidos en el complejo para su uso según la presente invención en Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press (1991).

Los agentes de reticulación para la reticulación de péptidos o proteínas incluyen, por ejemplo (i) reticulantes amina-a-amina, por ejemplo reactivos reticulantes de proteínas amino-específicas homobifuncionales basadas en grupos reactivos éster de NHS e imidoéster para la conjugación selectiva de aminas primarias; disponible en las variedades cortas, largas, divisibles, irreversibles, permeables a la membrana y de superficie celular; (ii) reticulantes sulfhidrilo-a-carbohidrato, por ejemplo reactivos de reticulación basados en grupos reactivos con maleimida e hidrazida para la conjugación y formación de enlaces covalentes reticulados; (iii) reticulantes sulfhidrilo-a-sulfhidrilo, por ejemplo reactivos de reticulación homobifuncionales sulfhidrilo-específicos basados en grupos reactivos maleimida o piridilditio para la conjugación selectiva covalente de proteínas y péptido-tioles (cisteínas reducidas) formando enlaces tioéter estables; (iv) reticulantes fotorreactivos, por ejemplo arilazida, diazirina y otros reactivos de reticulación heterobifuncionales químicos fotorreactivos (activados por la luz) para conjugar proteínas, ácidos nucleicos y otras estructuras moleculares involucradas en los complejos de interacción receptor-ligando mediante la activación en dos etapas; (v) reticulantes amina-a-sulfhidrilo, por

ejemplo reactivos de reticulación de proteínas heterobifuncionales para la conjugación entre grupos de proteínas con amina primaria (lisina) y sulfhidrilo (cisteína) y otras moléculas, disponible con diferentes longitudes y tipos de brazos espaciadores; y (vi) reticulantes amina-a-amina, por ejemplo reticulantes carboxilo-a-amina, por ejemplo reticulantes carbodiimida, DCC y EDC (EDAC), para conjugar grupos carboxilo (glutamato, aspartato, C-terminal) con aminas primarias (lisina, N-terminal) y también N-hidroxisuccinimida (NHS) para la activación estable de carboxilatos para conjugación amina.

Ejemplos de reticulantes, en general, que se pueden usar en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, incluyen éster de N-(a-maleimidoacetoxi-succinimida, N-5-azido-2-nitrobenzilo-succinimida, 1,4-bis-maleimidobutano, 1,4-bis-maleimidil-2,3-dihidroxibutano, bis-maleimidoheptano, bis-maleimidoetano, hidrazida de ácido N-(β-maleimidopropiónico)·TFA, éster de N-(β-maleimidopropilo-succinimida, 1,8-bis-maleimidodietilenglicol, 1,11-bis-maleimidotrietilenglicol, suberato de bis(sulfosuccinimidilo), bis(sulfosuccinimidil)glutarato-d0, bis(sulfosuccinimidil)-2,2,4,4-glutarato-d4, bis(sulfosuccinimidil)suberato-d0, bis(sulfosuccinimidil)-2,2,7,7-suberato-d4, bis(NHS)PEG5, bis(NHS)PEG9, bis(2-[succinimidoxicarbonilo]etil)sulfona, N,N-diciclohexilcarbodiimida, 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzoceno, dimetil adipimidato·2HCl, dimetil pimelimidato·2HCl, dimetil suberimida·2HCl, glutarato de disuccinimidilo, ditiobis(succinimidilpropionato) (reactivo de Lomant), suberato de disuccinimidilo, tartarato de disuccinimidilo, dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato·2HCl, ditiobis-maleimidoetano, 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, etilenglicol-bis(succinimidilsuccinato), ácido N-ε-maleimidocaproico, hidrazina de ácido N-(ε-maleimidocaproico), éster N-(ε-maleimidocaproilo) succinimida, éster N-(γ-maleimidobutirilo) succinimida, hidrazida de ácido N-(κ-maleimidoundecanoico), NHS-LC-diazirina, 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) de succinimidilo, 6-(3'-[2-piridilditio]propionamido)hexanoato de succinimidilo, L-Foto-Leucina, L-Foto-Metionina, éster m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida, hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico·HCl, 2-[N2-(4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzil)-N6-(6-biotinamidocaproil)-L-lisinil]etilmetanostiosulfato, 2-[N2-[N6-(4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzil)-N6-(6-biotinamidocaproil)-L-lisinil]etilmetanostiosulfato, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxisuccinimida éster de etano azida, N-hidroxisuccinimida éster de tetraoxapentadecano azida, N-hidroxisuccinimida éster de dodecaoxanonatriacontano azida, NHS-fosfina, 3-(2-piridilditio)propionilhidrazida, 2-piridilditio-tetraoxatetradecano-N-hidroxisuccinimida, 2-piridilditio-tetraoxaoxaoctatriacontano-N-hidroxisuccinimida, N-(p-maleimidofenil)socianato, succinimidil 3-(bromoacetamido)propionato, NHS-diazirina, NHS-SS-diazirina, N-succinimidil-yodoacetato, N-succinimidil-(4-yodoacetil)aminobenzoato, succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, NHS-PEG2-maleimida, NHS-PEG4-maleimida, NHS-PEG6-maleimida, NHS-PEG8-maleimida, NHS-PEG12-maleimida, NHS-PEG24-maleimida, succinimidil 4-(p-maleimid-fenil)butirato, succinimidil-6-(β-maleidoamidopropioamido)hexanoato, 4-succinimidiloxycarbonil-metil-α-(2-piridilditio)tolueno, succinimidil-(4-psoraleno-8-iloxi)butirato, N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato, etilenglicol bis(sulfo-succinil-succinato), éster N-(ε-maleimidocaproilo) sulfosuccinimida, éster N-(γ-maleimidobutirilo) sulfosuccinimida, éster N-(κ-maleimidoundecanoilo) sulfosuccinimida, Sulfo-NHS-LC-diazirina, sulfosuccinimidil 6-(3'-[2-piridilditio]propionamido)hexanoato, éster m-maleimidobenzil-N-hidroxisulfosuccinimida, N-hidroxisuccinimida, Sulfo-NHS-fosfina, sulfosuccinimidil 6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato, Sulfo-NHS-(2-6-[biotinamido]-2-(p-azidobezamido), Sulfo-NHS-diazirina, Sulfo-NHS-SS-diazirina, sulfosuccinimidil (4-yodoacetil)aminobenzoato, sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, sulfosuccinimidil 4-(p-maleimidofenil)butirato, tris-(2-maleimidoetil)amina (trifuncional) y tris-(succinimidil aminotricetrato) (trifuncional).

La unión entre dos de los tres componentes a), b) y c) del complejo para su uso según la presente invención puede ser directa o indirecta, es decir, dos componentes unidos directamente o pueden estar unidos por un componente adicional del complejo, por ejemplo un espaciador o un enlazador.

Preferentemente, el enlace directo puede llevarse a cabo mediante un puente amida, cuando los componentes a ser unir tienen grupos reactivos amino o carboxi. Más específicamente, cuando los componentes a unirse son péptidos, polipéptidos o proteínas, es preferente un enlace peptídico. Tal enlace peptídico puede formarse usando una síntesis química que involucra ambos componentes a unirse (un extremo N-terminal de un componente y el extremo C-terminal del otro componente) o puede formarse directamente mediante una síntesis proteica de la secuencia peptídica completa de ambos componentes, donde ambos componentes (proteína o péptido) preferentemente se sintetizan en una etapa. Dichos métodos de síntesis de proteínas incluyen, por ejemplo, sin imitarse a, métodos de síntesis de péptidos en fase líquida o métodos de síntesis de péptidos sólidos, por ejemplo métodos de síntesis de péptidos sólidos de acuerdo con Merrifield, síntesis de péptidos en fase sólida t-Boc, síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc, síntesis peptídica en fase sólida basado en BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio), etc. Alternativamente, son preferentes los enlaces éster o éter.

Además, en particular cuando los componentes a unir son péptidos, polipéptidos o proteínas, el enlace puede producirse a través de las cadenas laterales, por ejemplo mediante un puente disulfuro. Otros componentes de

otra naturaleza química, por ejemplo el al menos un antígeno o epítipo antigénico si no es de naturaleza peptídica, pueden unirse de manera similar a los componentes de naturaleza peptídica, por ejemplo el péptido de penetración celular, el al menos un péptido agonista de TLR y el al menos un antígeno o epítipo antigénico si es de naturaleza peptídica. La unión a través de una cadena lateral se basa preferiblemente en grupos amino, tiol o hidroxilo de la cadena lateral, por ejemplo mediante un enlace amida o éster o éter. El enlace de una cadena principal peptídica con una cadena lateral peptídica de otro componente también puede realizarse a través de un enlace isopeptídico. Un enlace isopeptídico es un enlace amida que no está presente en la cadena principal de una proteína. El enlace se forma entre el terminal carboxilo de un péptido o proteína y el grupo amino de un residuo lisina de otro péptido o proteína (diana).

- 10 El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente un espaciador o enlazador, que son grupos no inmunológicos, preferiblemente escindibles, y que enlazan el componente a) y b) y/o el componente a) y c) y/o el componente b) y c) y/o unen antígenos o epítopos antigénicos consecutivos y/o unen péptidos agonistas de TLR consecutivos y/o unen péptidos de penetración celular consecutivos y/o que pueden disponerse en la parte C-terminal de los componentes b) y/o c). Preferentemente, un enlazador o espaciador puede proporcionar funcionalidades adicionales, además del enlace de los componentes, y preferiblemente ser escindible, en especial escindible naturalmente dentro de la célula diana, por ejemplo por escisión enzimática. Sin embargo, tales funcionalidades adicionales, en particular, no incluyen ninguna funcionalidad inmunológica. Se pueden encontrar ejemplos de funcionalidades adicionales, en particular con respecto a los enlazadores de las proteínas de fusión, en Chen X. et al., 2013: Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. Adv Drug Deliv Rev. 65 (10): 1357 - 1369, donde, por ejemplo, también se describen enlaces escindibles *in vivo*. Además, Chen X. et al., 2013: Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. Adv Drug Deliv Rev. 65 (10): 1357 - 1369 también describen diversos enlazadores, por ejemplo enlazadores flexibles y rígidos, y herramientas y bases de datos de diseño de enlazadores que pueden ser útiles en el complejo para su uso según la presente invención o para diseñar un enlazador a emplear en el complejo para su uso según la presente invención.

- Dicho espaciador puede ser peptídico o no peptídico, preferentemente el espaciador es peptídico. Preferentemente, el espaciador peptídico consiste en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos del espaciador peptídico puede ser idéntica a la de la región flanqueante N-terminal o C-terminal de cualquiera de los componentes a), b) o c). Alternativamente, un espaciador peptídico puede consistir en secuencias de aminoácidos no naturales, tales como una secuencia de aminoácidos resultante de sustituciones conservadoras de aminoácidos de dichas regiones flanqueantes naturales o secuencias de sitios de escisión para proteasas conocidos, tales como un sitio diana de enteroquinasa (secuencia de aminoácidos: DDDK, SEQ ID NO: 16), un sitio diana de factor Xa (secuencia de aminoácidos: IEDGR, SEQ ID NO: 17), un sitio diana de trombina (secuencia de aminoácidos: LVPRGS, SEQ ID NO: 18), un sitio diana de proteasa TEV (secuencia de aminoácidos: ENLYFQG, SEQ ID NO: 19), un sitio diana de proteasa PreScission (secuencia de aminoácidos: LEVLFQGP, SEQ ID NO: 20), aminoácidos policatiónicos, por ejemplo poli K, un sitio diana de furina (secuencia de aminoácidos RX (R/K)R, SEQ ID NO: 21). En una realización particular, el espaciador peptídico no contiene ningún residuo Cys (C). En una realización preferente, la secuencia enlazadora contiene al menos un 20%, más preferiblemente al menos un 40% e incluso más preferiblemente al menos un 50% de residuos Gly o β -alanina, por ejemplo GlyGlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 22), GlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 23), GlyGlyGly, CysGlyGly o GlyGlyCys, etc. el experto en la materia puede seleccionar y preparar las secuencias enlazadoras apropiadas. Pueden estar compuestas de D- y/o L-aminoácidos. Otros ejemplos de espaciador peptídico incluyen las secuencias de aminoácidos EQLE (SEQ ID NO: 24) o TEWT (SEQ ID NO: 25) o cualquier sustitución conservadora de las mismas.

Un espaciador no peptídico puede incluir o ser un éster, un tioéster y un disulfuro.

- En particular, el complejo para su uso según la invención puede comprender un espaciador o enlazador, en particular un espaciador peptídico dispuesto entre el componente a) y b) y/o entre el componente a) y c) y/o entre el componente b) y c). El experto en la materia puede elegir este espaciador peptídico para que pueda ser cortado por la maquinaria celular una vez que el complejo que comprende el péptido de penetración celular y la molécula de carga se han internalizado.

- Cuando el complejo comprende varios antígenos o epítopos antigénicos o cuando el complejo comprende varios péptidos agonistas de TLR, será claro para el experto en la técnica que cada uno de los antígenos o epítopos antigénicos y/o cada uno de los péptidos agonistas de TLR comprendidos en el complejo de la invención puede estar unido entre sí directamente o mediante separadores o enlazadores tales como, por ejemplo, un espaciador peptídico consistente en unos pocos aminoácidos. Alternativamente, cuando el complejo para su uso según la presente invención comprende varios antígenos o epítopos antigénicos o cuando el complejo comprende varios péptidos agonistas de TLR, también es posible que algunos antígenos o epítopos

antigénicos y/o algunos péptidos agonistas de TLR comprendidos en el complejo de la invención estén directamente unidos entre sí y algunos otros antígenos o epítopos antigénicos y/o algunos otros péptidos agonistas de TLR estén unidos a través de espaciadores o enlazadores tales como un espaciador peptídico consistente en unos pocos aminoácidos.

- 5 Por ejemplo, dos antígenos o epítopos antigénicos sucesivos o dos péptidos agonistas de TLR sucesivos comprendidos en el complejo de la invención están unidos entre sí por espaciadores consistentes en las regiones flanqueantes naturales de dichos antígenos o epítopos antigénicos o de dichos péptidos agonistas de TLR, respectivamente. Por ejemplo, el espaciador usado para unir un primer antígeno/epítipo antigénico o un primer péptido agonista de TLR a un segundo antígeno/epítipo antigénico o a un segundo péptidos agonista de TLR, respectivamente, puede tener hasta aproximadamente 8 aminoácidos, correspondientes a hasta 10 aproximadamente 4 aminoácidos de la región flanqueante N-terminal o C-terminal del primer antígeno/epítipo antigénico o del primer péptidos agonista de TLR, seguido de hasta aproximadamente 4 aminoácidos de la región flanqueante N-terminal o C-terminal del segundo antígeno/epítipo antigénico o del segundo péptido agonista de TLR. En una ilustración de la presente invención, el espaciador utilizado para unir un primer antígeno/epítipo antigénico o un primer péptido agonista de TLR ("antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 1") a un segundo epítipo ("antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2") consta de aproximadamente 8 aminoácidos correspondientes a cualquier combinación posible que va desde: 0 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 1 y 8 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2, hasta 8 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista del péptido TLR 1 y 0 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2, es decir, incluyendo 1 aminoácido flanqueante del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 1 y 7 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2, 2 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 1 y 6 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2, 3 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 1 y 5 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2, 4 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 1 y 4 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2, 5 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 1 y 3 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2, 6 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 1 y 2 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2, 7 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 1 y 1 aminoácido flanqueante del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2, 8 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista péptido TLR 1 y 0 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2. Se entenderá que el total de 8 aminoácidos que constituyen un espaciador que une dos antígenos/epítopos/péptidos agonistas de TLR no es un valor absoluto y el espaciador también podría estar compuesto por un total de, por ejemplo, 3 aminoácidos, 4 aminoácidos, 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, 7 aminoácidos, 9 aminoácidos o 10 aminoácidos. De manera similar, las combinaciones equivalentes como se mencionó anteriormente también son una ilustración de la invención en aquella situación donde un espaciador tiene menos o más de 8 aminoácidos.

- 40 En otra ilustración particular de la presente invención, el espaciador utilizado para unir un primer antígeno/epítipo antigénico o un primer péptido agonista de TLR ("antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 1") a un segundo antígeno/epítipo antigénico o a un segundo péptido agonista de TLR, respectivamente, ("antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2") consiste en, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos. Más particularmente, dicha secuencia de aminoácidos del espaciador puede corresponder a los 4 aminoácidos de la región flanqueante N-terminal o C-terminal del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 1 o del antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR 2. También se puede disponer un espaciador como se describe anteriormente en la parte C-terminal del último antígeno/epítipo/péptido agonista de TLR comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención.

- 50 Las técnicas para vincular dos de los tres componentes a), b) y c) están bien documentadas en la literatura y pueden depender de la naturaleza del al menos un antígeno o epítipo antigénico. Por ejemplo, los enlaces entre dos de los tres componentes a), b) y c) se pueden lograr a través de uniones disulfuro escindibles mediante síntesis total en fase sólida o acoplamiento de fragmentos en fase sólida o en solución, o por enlaces amida, tiazolidina, oxima e hidrazina, disulfuro, tiomaleimida, enlace peptídico estables (incluyendo enlaces peptídicos entre aminoácidos de una proteína de fusión) o por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas.

- 55 Preferiblemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico comprendido en el complejo para su uso según la presente invención, así como cualquier espaciador o enlazador opcional comprendido en el complejo para su uso según la presente invención, son de naturaleza peptídica. En especial, todos los componentes del complejo para su uso según la presente invención, por ejemplo el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o epítipo antigénico, que es un péptido, polipéptido o proteína, el al menos un péptido agonista de TLR y cualquier enlazador o separador peptídico opcional están unidos en el complejo para su uso de

acuerdo con la presente invención mediante un enlace peptídico. Con total preferencia, el complejo para su uso según la presente invención es, por tanto, un péptido, polipéptido o proteína, tal como una proteína de fusión, por ejemplo una proteína de fusión recombinante.

- En este contexto, es particularmente preferente un complejo que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 69 o un complejo que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 69; en especial un complejo que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según las SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 69 o un complejo que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 69; en particular, un complejo que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según las SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 69 o un complejo que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 69.

SEQ ID NO: 26:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYP VTYSSPEDGI
RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKS
AKFKQLQHY REVAAKSSE NDRLRLLLKE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV
PRNQDWLGVP RFAKFAFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFELTE WTGS

SEQ ID NO: 27:

MHHHHHHSTV HEILCKLSLE GDHSTPPSAY GSVKPYTNFD AEKRYKNRVA SRKSRAKFKQ
LLQHYREVAA AKSENDRRLR LLLKESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVGV GALKVPRNQD
WLGVPFAKF ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGS

SEQ ID NO: 28:

MHHHHHHKRYKNRVA SRKSRAKFKQ LLQHYREVAA AKSENDRRLR LLLKESLKIS
QAVHAAHAEI NEAGREVGV GALKVPRNQD WLGVPFAKF ASFEAQGALA

- 30 NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGS TVHEILCKLS LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE

SEQ ID NO: 33:

MHHHHHHKRY KNRVASRKS AKFKQLLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV
VGVGALKVPR NQDWLGVPRF AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTWT
GSSTVHEILC KLSLEGDHST PPSAYGSVKP YTNFDAE

SEQ ID NO: 34:

MHHHHHHREV AAKSSENDR LRLKESLK ISQAVHAAH EINEAGREV GVGALKVPRN
QDWLGVPRFA KASFEAQGA LANIAVDKAN LDVEQLESII NFEKLTWTG SSTVHEILCK
LSLEGDHSTP PSAYGSVKPY TNFDAE

SEQ ID NO: 37:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKS AKFKQLLQHY
REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPRF AKFASFEAQG
ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTWT GS

SEQ ID NO: 38:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTREV AAKSSENDR LRLKESLK
ISQAVHAAH EINEAGREV GVGALKVPRN QDWLGVPRFA KASFEAQGA LANIAVDKAN
LDVEQLESII NFEKLTWTG S

SEQ ID NO: 39:

KRYKNRVASRSRAKFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLKLVYHSPSYAYHQFERRAILNRLV
QFIKDRISVVQALVLTSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTN FDAE

SEQ ID NO: 40:

KRYKNRVASRSRAKFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLKKNYRIATFKNWPFLEDCAMEELT
VSEFLKDRQRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 41:

KRYKNRVASRSRAKFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLKHLASMTNMELMSSIVSTVHEI
LCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 46:

RKKRRQRRRVKRISQAVHAAHAEINEAGRRVKRVPRNQDWLVRKASFEAQGALANIAVD
KARVKRSIINFELRVKRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 69:

KRYKNRVASRSRAKFKQLLQHYREVAAKSSENDRLRLKLFRQAQLANDVVLQIMEHLELA
SMTNMELMSSIVVISIIVFNLELEGSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

Disposición de los componentes a), b) y c) en el complejo para su uso según la presente invención

5 Los componentes a), b) y c) pueden estar dispuestos en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención de cualquier manera.

En particular, cuando el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende más de un péptido de penetración celular y/o más de un antígeno o epítipo antigénico y/o más de un péptido agonista de TLR, el péptido de penetración celular de más puede disponerse de manera no consecutiva, es decir, al menos un antígeno o epítipo antigénico (componente b)) y/o al menos un péptido agonista de TLR (componente c))

- puede interrumpir un tramo de péptidos de penetración celular dispuestos consecutivamente y/o los péptidos de penetración celular pueden disponerse con el componente b) y/o con el componente c) de manera alterna. De forma similar, el más de un antígeno o epítipo antigénico puede disponerse de manera no consecutiva, es decir, al menos un péptido de penetración celular (componente a)) y/o al menos un péptido agonista de TLR (componente c)) puede interrumpir un tramo de antígenos dispuestos o de epítopos antigénicos consecutivos y/o los antígenos o epítopos antigénicos pueden posicionarse con el componente a) y/o con el componente c) de manera alterna. De forma similar, el más de un péptido agonista de TLR puede disponerse de manera no consecutiva, es decir, al menos un péptido de penetración celular (componente a)) y/o al menos un antígeno o epítipo antigénico (componente b)) puede interrumpir un tramo de péptidos agonistas de TLR dispuestos consecutivamente y/o los péptidos agonistas de TLR pueden disponerse con el componente a) y/o con el componente b) de manera alterna.

- Sin embargo, es preferente que el péptido de penetración celular de más célula se disponga en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención de manera consecutiva y/o que el antígeno o epítipo antigénico de más se disponga en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención de manera consecutiva y/o que el péptido agonista de TLR de más se disponga en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención de manera consecutiva. En particular, esto significa que todas las unidades individuales de un determinado componente, es decir, todos los péptidos de penetración celular, todos los antígenos o epítopos antigénicos o todos los péptidos agonistas de TLR comprendidos en el complejo se disponen en un tramo que no está interrumpido por ninguno de los otros dos componentes. Por el contrario, los otros dos componentes se disponen en el complejo, por ejemplo, antes o después de un tramo de todas las unidades individuales de dichos componentes. Sin embargo, las unidades individuales de dicho cierto componente dispuestas consecutivamente de tal manera pueden estar unidas entre sí, por ejemplo, mediante un espaciador o enlazador como se describe aquí, el cual no es de los otros dos componentes.

Es particularmente preferente que cada uno de los componentes a), b) y c) se posicione de manera consecutiva.

- Estructuralmente, cada componente a), b) y c) comprende típicamente una única cadena principal y al menos una cadena lateral. El término "cadena principal" (también "esqueleto principal"), tal como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a la cadena continua principal de átomos enlazados covalentemente en una molécula. Por ejemplo, en péptidos, polipéptidos y proteínas, la cadena principal (esqueleto principal) comprende típicamente átomos de carbono alfa y átomos de nitrógeno de los aminoácidos constituyentes unidos por enlaces peptídicos. El esqueleto no incluye las cadenas laterales. El término "cadena lateral" (también "cadena colgante"), tal como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a un grupo químico que está unido a una parte central de la molécula llamada "cadena principal" o esqueleto. Por ejemplo, en péptidos, polipéptidos y proteínas, las cadenas laterales típicamente representan las partes (principales) de los aminoácidos constituyentes que están unidos a los átomos de carbono alfa del esqueleto.
- En el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, los componentes a), b) y c) pueden estar unidos covalentemente a través de un enlazador o espaciador como se describe aquí o pueden estar unidos directamente de forma covalente. Independientemente de si se usa un espaciador o enlazador para el enlace covalente o no, en principio existen cuatro opciones de cómo dos de los tres componentes están unidos entre sí en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, a saber:
- i) vía enlace cadena principal/cadena principal,
 - ii) vía enlace cadena principal/cadena lateral,
 - iii) vía enlace cadena lateral/cadena principal o
 - iv) vía enlace cadena lateral/cadena lateral.

- Preferiblemente, los tres componentes a), b) y c) están unidos vía enlace cadena principal/cadena principal, resultando, en particular, en una cadena principal del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención que comprende la cadena principal de uno o más péptidos de penetración celular, la cadena principal de uno o más antígenos o epítopos antigénicos y la cadena principal de uno o más péptidos agonistas de TLR. En otras palabras, la cadena principal de uno o más péptidos de penetración celular, la cadena principal de uno o más antígenos o epítopos antigénicos y la cadena principal de uno o más péptidos agonistas de TLR constituyen la cadena principal del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, opcionalmente junto con otros componentes, por ejemplo enlazador(es), espaciador(es), etc. Por consiguiente, son preferentes las siguientes disposiciones de los componentes a), b) y c), en particular si el al menos un antígeno o epítipo antigénico es un péptido, polipéptido o proteína, por lo que dichas disposiciones preferidas se muestran a continuación en dirección N-terminal → C-terminal de la cadena principal del complejo y donde los tres componentes a), b) y c) están unidos vía un enlace cadena principal/cadena principal y pueden estar opcionalmente unidos por un enlazador, un espaciador u otro componente adicional:

- (α) componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - componente c) (al menos un péptido agonista de TLR);
 (β) componente c) (al menos un péptido agonista de TLR) - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico);
 5 (γ) componente a) (péptido de penetración celular) - componente c) (al menos un péptido agonista de TLR) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico);
 (δ) componente c) (al menos un péptido agonista de TLR) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - componente a) (péptido de penetración celular);
 10 (ϵ) componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - componente a) (péptido de penetración celular) - componente c) (al menos un péptido agonista de TLR); o
 (ζ) componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - componente c) (al menos un péptido agonista de TLR) - componente a) (péptido de penetración celular).

En particular, si todos los tres componentes a), b) y c) están unidos vía enlace cadena principal/cadena principal, es preferente que el al menos un antígeno o epítipo antigénico esté situado C-terminal al péptido de penetración celular, por lo que el péptido de penetración celular y el al menos un antígeno o epítipo antigénico están opcionalmente unidos por un componente adicional, por ejemplo un enlazador, un espaciador o al menos un péptido agonista de TLR. En consecuencia, esto corresponde a las disposiciones (α), (β) y (γ) de las mostradas anteriormente, es decir, de las disposiciones anteriores, las disposiciones (α), (β) y (γ) son especialmente preferentes.

20 Incluso más preferiblemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico se dispone en el extremo C-terminal del péptido de penetración celular, por lo que el péptido de penetración celular y el al menos un antígeno o epítipo antigénico están opcionalmente unidos por un componente adicional, por ejemplo un enlazador, un espaciador, pero no por el al menos un péptido agonista de TLR. Por consiguiente, esto corresponde a las disposiciones (α) y (β) de las disposiciones mostradas anteriormente, es decir, de las disposiciones anteriores, las disposiciones (α) y (β) son particularmente preferentes. Con particular preferencia, el complejo para su uso según la presente invención es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante y los componentes a) a c) se disponen en la dirección N-terminal \rightarrow C-terminal de la cadena principal de dicho complejo en el orden:

- 30 (α) componente a) - componente b) - componente c),
 (β) componente c) - componente a) - componente b),

donde los componentes pueden estar unidos por otro componente, en particular por un enlazador o un espaciador.

Es particularmente preferente la disposición (α), donde el al menos un agonista de TLR comprende o consiste en al menos un agonista de TLR2, por ejemplo:

- 35 ($\alpha 1$) componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más péptidos agonistas de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR2;
 ($\alpha 2$) componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más péptidos agonistas de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR2, uno o más péptidos agonistas de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR4 y uno o más péptidos agonistas de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR5;
 40 ($\alpha 3$) componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más péptidos agonistas de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR2 y uno o más péptidos agonistas de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR4; o
 45 ($\alpha 4$) componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más péptidos agonistas de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR2 y uno o más péptidos agonistas de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR5.

Alternativamente, en dicha disposición que comprende un péptido agonista de TLR2, también pueden disponerse péptidos agonistas de TLR adicionales en otras posiciones en el complejo, por ejemplo:

- 50 ($\alpha 5$) uno o más péptidos agonistas de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR4 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más péptidos agonistas de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR2;
 55 ($\alpha 6$) uno o más péptidos agonistas de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR5 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo

- antigénico) - uno o más péptidos agonistas de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de péptidos TLR2; o
 (α7) uno o más péptidos agonistas de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR4 y uno o más péptidos agonistas de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR5 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más péptidos agonistas de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR2.

Es particularmente preferente la disposición (β), donde el al menos un agonista de TLR comprende o consiste en al menos un agonista de TLR4, por ejemplo:

- (β1) uno o más péptidos agonistas de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR4 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico);
 (β2) uno o más péptidos agonistas de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR4, uno o más péptidos agonistas de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR2 y uno o más péptidos agonistas de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR5 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico);
 (β3) uno o más péptidos agonistas de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR4 y uno o más péptidos agonistas de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR2 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico); o
 (β4) uno o más péptidos agonistas de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR4 y uno o más péptidos agonistas de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR5 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico).

Alternativamente, en tal disposición que comprende un péptido agonista de TLR4, también pueden disponerse péptidos agonistas de TLR adicionales en otras posiciones en el complejo, por ejemplo:

- (β5) uno o más péptidos agonistas de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR4 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más péptidos agonistas de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR2;
 (β6) uno o más péptidos agonistas de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR4 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más péptidos agonistas de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR5; o
 (β7) uno o más péptidos agonistas de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR4 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más péptidos agonistas de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR2 y uno o más péptidos agonistas de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas de TLR5.

Alternativamente, solo dos de los tres componentes a), b) y c) están unidos mediante un enlace cadena principal/cadena principal en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención.

- Por ejemplo, los componentes a) y b) están unidos mediante la unión cadena principal/cadena principal, lo que da como resultado las siguientes disposiciones de los componentes a) y b) en el complejo, que se muestran en la dirección N-terminal → C-terminal de la cadena principal del complejo, por lo que los componentes a) y b) pueden estar opcionalmente unidos por un componente adicional, por ejemplo un enlazador, un espaciador, etc.:

- (1) péptido de penetración celular (a) - antígeno/epítipo antigénico (b); o
- (2) antígeno/epítipo antigénico (b) - péptido de penetración celular (a).

- En tal caso, el componente c), es decir, el al menos un péptido agonista de TLR, puede disponerse mediante un enlace cadena principal/cadena lateral, mediante un enlace cadena lateral/cadena principal o mediante un enlace cadena lateral/cadena lateral, ya sea al péptido de penetración celular (a) o al antígeno/epítipo antigénico (b) o, si está presente, a un componente adicional tal como un espaciador o un enlazador, que, por ejemplo, puede colocarse entre el péptido de penetración celular (a) y el antígeno/epítipo antigénico (b). Esto incluye los siguientes arreglos:

- (i) el componente c) puede unirse, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena principal/cadena lateral al componente a), es decir, la cadena principal del al menos un péptido agonista de TLR está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena lateral del péptido de penetración celular;
- (ii) el componente c) puede unirse, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena lateral/cadena principal al componente a), es decir, la cadena lateral del al menos un agonista del

péptido TLR está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena principal del péptido de penetración celular;

(iii) el componente c) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena lateral/cadena lateral al componente a), es decir, la cadena lateral del al menos un péptido agonista de TLR está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena lateral del péptido de penetración celular;

(iv) el componente c) puede unirse, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena principal/cadena lateral al componente b), es decir, la cadena principal del al menos un péptido agonista de TLR está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico;

(v) el componente c) puede unirse, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena lateral/cadena principal al componente b), es decir, la cadena lateral del al menos un péptido agonista de TLR está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena principal del al menos un antígeno o epítipo antigénico;

(vi) el componente c) puede unirse, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena lateral/cadena lateral al componente b), es decir, la cadena lateral del al menos un péptido agonista de TLR está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico;

(vii) el componente c) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena principal/cadena lateral a un enlazador o espaciador entre el componente a) y el componente b), es decir, la cadena principal del al menos un péptido agonista de TLR está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena lateral de un espaciador o un enlazador dispuesto entre el componente a) y el componente b);

(viii) el componente c) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena lateral/cadena principal a un enlazador o un espaciador entre el componente a) y el componente b), es decir, la cadena lateral del al menos un péptido agonista de TLR está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena principal de un enlazador o un espaciador dispuesto entre el componente a) y el componente b); o

(ix) el componente c) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena lateral/cadena lateral a un enlazador o un espaciador entre el componente a) y el componente b), es decir, la cadena lateral del al menos un péptido agonista de TLR está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral de un enlazador o espaciador dispuesto entre el componente a) y el componente b).

Por ejemplo, los componentes b) y c) están unidos vía enlace cadena principal/cadena principal, lo que da como resultado las siguientes disposiciones de los componentes b) y c) en el complejo, que se muestran en la dirección N-terminal → C-terminal de la cadena principal del complejo, por lo que los componentes b) y c) pueden estar opcionalmente unidos por un componente adicional, por ejemplo un enlazador, un espaciador, etc.:

(3) antígeno/epítipo antigénico (b) - péptido agonista de TLR (c); o

(4) Péptido agonista de TLR (c) - antígeno/epítipo antigénico (b).

En tal caso, el componente a), es decir, el péptido de penetración celular, puede disponerse vía el enlace cadena principal/cadena lateral, vía el enlace cadena lateral/cadena principal o vía el enlace cadena lateral/cadena lateral al antígeno/epítipo antigénico (b) o al péptido agonista de TLR (c) o, si está presente, a un componente adicional, tal como un espaciador o un enlazador, que puede estar dispuesto, por ejemplo, entre el antígeno/epítipo antigénico (b) y el péptido agonista de TLR (c).

(x) el componente a) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena principal/cadena lateral al componente b), es decir, la cadena principal del péptido de penetración celular está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico;

(xi) el componente a) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena lateral/cadena principal al componente b), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena principal de al menos un antígeno o epítipo antigénico;

(xii) el componente a) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena lateral/cadena lateral al componente b), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico;

(xiii) el componente a) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena principal/cadena lateral al componente c), es decir, la cadena principal del péptido de penetración celular está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena lateral del al menos un péptido agonista de TLR;

- (xiv) el componente a) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena lateral/cadena principal al componente c), es decir, la cadena lateral al péptido de penetración celular está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena principal del al menos un péptido agonista de TLR;
- 5 (xv) el componente a) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena lateral/cadena lateral al componente c), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador, a la cadena lateral del al menos un péptido agonista de TLR;
- 10 (xvi) el componente a) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena principal/cadena lateral a un enlazador o espaciador dispuesto entre el componente b) y el componente c), es decir, la cadena principal del péptido de penetración celular está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral de un espaciador o enlazador dispuesto entre el componente b) y el componente c);
- 15 (xvii) el componente a) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena lateral/cadena principal a un enlazador o un espaciador dispuesto entre el componente b) y el componente c), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena principal de un enlazador o espaciador dispuesto entre el componente b) y el componente c); o
- 20 (xviii) el componente a) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía enlace cadena lateral/cadena lateral a un enlazador o espaciador dispuesto entre el componente b) y el componente c), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está covalentemente unida, opcionalmente a través de un espaciador o enlazador, a la cadena lateral de un enlazador o espaciador dispuesto entre el componente b) y el componente c).

- 25 Por ejemplo, los componentes a) y c) están unidos vía cadena principal/cadena principal, lo que resulta en las siguientes disposiciones de los componentes a) y b) en el complejo, que se muestran en la dirección N terminal → C terminal de la cadena principal del complejo, por lo que los componentes a) y c) pueden estar opcionalmente unidos por un componente adicional, por ejemplo un enlazador, un espaciador, etc.:

(5) péptido de penetración celular (a) - péptido agonista de TLR (c); o
(6) péptido agonista de TLR (c) - péptido de penetración celular (a).

- 30 En tal caso, el componente b), es decir, el al menos un antígeno o epítipo antigénico, puede disponerse vía enlace cadena principal/cadena lateral, vía enlace cadena lateral/cadena principal o vía enlace cadena lateral/cadena lateral con el péptido de penetración celular (a) o con el péptido agonista de TLR (c) o, si está presente, con un componente adicional, tal como un espaciador o enlazador, que puede estar dispuesto, por ejemplo, entre la el péptido de penetración celular (a) y el péptido agonista de TLR (c). Esto incluye los
- 35 siguientes arreglos:

- (xix) el componente b) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena principal/cadena lateral al componente a), es decir, la cadena principal del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral del péptido de penetración celular;
- 40 (xx) el componente b) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena lateral/cadena principal al componente a), es decir, la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena principal del péptido de penetración celular;
- 45 (xxi) el componente b) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena lateral/cadena lateral al componente a), es decir, la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral del péptido de penetración celular;
- (xxii) el componente b) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena principal/cadena lateral al componente c), es decir, la cadena principal del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral del al menos un péptido agonista de TLR;
- 50 (xxiii) el componente b) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena lateral/cadena principal al componente c), es decir, la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena principal del al menos un péptido agonista de TLR;
- 55 (xxiv) el componente b) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena lateral/cadena lateral al componente c), es decir, la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral del al menos un péptido agonista de TLR;

(xxv) el componente b) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena principal/cadena lateral a un enlazador o un espaciador dispuesto entre el componente a) y el componente c), es decir, la cadena principal del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral de un enlazador o espaciador dispuesto entre el componente a) y el componente c);

(xxvi) el componente b) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena lateral/cadena principal a un enlazador o un espaciador dispuesto entre el componente a) y el componente c), es decir, la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena principal de un enlazador o un espaciador dispuesto entre el componente a) y el componente c); o

(xxvii) el componente b) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena lateral/cadena lateral a un enlazador o espaciador dispuesto entre el componente a) y el componente c), es decir, la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral de un enlazador o espaciador dispuesto entre el componente a) y el componente c).

Alternativamente, también es concebible que, en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, los tres componentes a), b) y c) estén dispuestos vía un enlace cadena principal/cadena lateral, vía un enlace cadena lateral/cadena principal o vía un enlace cadena lateral/cadena lateral, opcionalmente unidos mediante un componente adicional, por ejemplo un espaciador o un enlazador.

20 *Glioma, en particular glioblastoma*

La presente invención proporciona el complejo tal como se describe anteriormente para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma.

Los gliomas son la forma más frecuente de tumores cerebrales primarios en adultos, teniendo el glioblastoma multiforme (GBM) el peor pronóstico. Este tumor es conocido por su comportamiento altamente invasivo y agresivo. En particular, el complejo para su uso según la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo como se describe aquí, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden usarse junto con modalidades existentes de glioma, en particular GBM (invasivo). Los linfocitos T pueden buscar activamente células neoplásicas en el cerebro y tienen el potencial de eliminar de forma segura células tumorales específicas sin dañar los tejidos sanos circundantes.

Los gliomas se clasifican por tipo de célula, por grado y/o por ubicación.

Los gliomas se nombran de acuerdo con el tipo específico de célula con la que comparten características histológicas, pero no necesariamente de donde se originan. Los principales tipos de gliomas incluyen (i) ependimomas (células ependimarias); (ii) astrocitomas (astrocitos); (iii) oligodendrogliomas (oligodendrocitos); (iv) glioma del tronco encefálico (que se desarrolla en el tronco encefálico); (v) glioma del nervio óptico (que se desarrolla dentro o alrededor del nervio óptico); y (vi) gliomas mixtos (que contienen células de diferentes tipos de glía), como los oligoastrocitomas. Por consiguiente, el glioma a tratar y/o prevenir mediante un complejo para su uso según la presente invención se selecciona preferiblemente del grupo consistente en (i) ependimomas (células ependimales); (ii) astrocitomas (astrocitos); (iii) oligodendrogliomas (oligodendrocitos); (iv) glioma del tronco encefálico (que se desarrolla en el tronco encefálico); (v) glioma del nervio óptico (que se desarrolla dentro o alrededor del nervio óptico); y (vi) gliomas mixtos (que contienen células de diferentes tipos de glía), como los oligoastrocitomas.

Además, los gliomas se clasifican según su grado, que se determina por evaluación patológica del tumor. Los gliomas de bajo grado [grado II de la OMS] están bien diferenciados (no son anaplásicos), tienden a exhibir tendencias benignas y presagian un mejor pronóstico para el paciente. Sin embargo, tienen una tasa uniforme de recurrencia y un aumento de grado con el tiempo, por lo que deben clasificarse como malignos. Los gliomas de alto grado [OMS grado III-IV] son indiferenciados o anaplásicos, son malignos y tienen un peor pronóstico. De los numerosos sistemas de clasificación en uso, el más común es el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el astrocitoma, según el cual los tumores se clasifican de I (enfermedad menos avanzada - mejor pronóstico) a IV (enfermedad más avanzada - peor pronóstico). Los tumores se clasifican según su apariencia microscópica. El grado indica el nivel de malignidad. El sistema de clasificación considera aspectos tales como: índice mitótico (tasa de crecimiento), vascularización (suministro de sangre), presencia de un centro necrótico, potencial invasivo (distinción del borde) y similitud con las células normales. Como los tumores malignos pueden contener células en varios grados, es el grado de las células más maligno el que determina el grado de todo el tumor.

El sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud define cuatro grados diferentes:

Grado I

- 5 Los tumores de grado 1 son los menos malignos. Estos tumores crecen lentamente y al microscopio parecen casi normales, la cirugía sola puede ser efectiva. Incluso aunque los tumores de grado 1 deben considerarse como un agente potencialmente mortal, los tumores de grado 1 a menudo se asocian con la supervivencia a largo plazo.

Grado II

- 10 Los tumores de grado II, como el astrocitoma, crecen un poco más rápido que los tumores de grado I y tienen un aspecto microscópico ligeramente anormal. Estos tumores pueden invadir el tejido normal circundante y pueden reaparecer como un tumor de grado II o superior.

Grado III

- 15 Los astrocitomas anaplásicos, como cualquier otro tumor de grado III, son malignos. Estos tumores presentan una reproducción activa de células anormales e invaden el tejido circundante normal. Los tumores de grado III con frecuencia son recurrentes, a menudo como tumores de grado IV, ya que su tendencia a extenderse al tejido circundante hace que sea difícil su total extirpación quirúrgica.

Grado IV

- 20 El glioblastoma multiforme es el tumor de grado IV más común. Estos tumores son los más malignos e invaden amplias áreas del tejido normal circundante. Estos tumores se reproducen rápidamente, al microscopio aparecen muy anormales y son necróticos (tienen células muertas) en el centro. Los tumores de grado IV hacen que se formen nuevos vasos sanguíneos para ayudar a mantener su rápido crecimiento.

- 25 Mientras que los tumores de grado I y II se consideran de bajo grado, los grados III y IV se denominan gliomas de alto grado. Los pacientes con glioma de bajo grado tienen un mejor pronóstico, con una mediana de supervivencia de 5-10 años. Sin embargo, el 50-75% de estos pacientes tienen tumores que tienden a evolucionar continuamente a un glioma de alto grado ((Shaw, E.G., et al., Recurrence following neurosurgeon-determined gross-total resection of adult supratentorial low-grade glioma: results of a prospective clinical trial. J Neurosurg, 2008. 109(5): p. 835-41).

- 30 Preferiblemente, el glioma a tratar y/o prevenir mediante un complejo para su uso según la presente invención es un glioma de grado I, tal como un astrocitoma de grado I, un oligodendroglioma de grado I, un ependimoma de grado I o un oligoastrocitoma de grado I; un glioma de grado II, tal como un astrocitoma de grado II, un oligodendroglioma de grado II, un ependimoma de grado II o un oligoastrocitoma de grado II; un glioma de grado III, tal como un astrocitoma de grado III, un oligodendroglioma de grado III, un ependimoma de grado III o un oligoastrocitoma de grado III; y/o un glioma de grado IV, como un astrocitoma de grado IV, un oligodendroglioma de grado IV, un ependimoma de grado IV o un oligoastrocitoma de grado IV.

- 35 Con mayor preferencia, el glioma a tratar y/o prevenir mediante un complejo para su uso según la presente invención es un glioma de grado II, tal como un astrocitoma de grado II, un oligodendroglioma de grado II, un ependimoma de grado II o un grado II oligoastrocitoma; un glioma de grado III, tal como un astrocitoma de grado III, un oligodendroglioma de grado III, un ependimoma de grado III o un oligoastrocitoma de grado III; y / o un glioma de grado IV, como un astrocitoma de grado IV, un oligodendroglioma de grado IV, un ependimoma de grado IV o un oligoastrocitoma de grado IV.

- 40 Incluso con mayor preferencia, el glioma a tratar y/o prevenir mediante un complejo para su uso según la presente invención es un glioma de grado III, tal como un astrocitoma de grado III, un oligodendroglioma de grado III, un ependimoma de grado III o un grado III oligoastrocitoma; y / o un glioma de grado IV, como un astrocitoma de grado IV, un oligodendroglioma de grado IV, un ependimoma de grado IV o un oligoastrocitoma de grado IV.

- 45 Con total preferencia, el glioma a tratar y/o prevenir mediante un complejo para su uso según la presente invención es un astrocitoma de grado IV, un oligodendroglioma de grado IV, un ependimoma de grado IV o un oligoastrocitoma de grado IV. Es particularmente preferente un astrocitoma de grado IV, esto es un glioblastoma (GBM).

- Además, los gliomas se pueden clasificar según si están por encima o por debajo de una membrana del cerebro llamada tentorio. El tentorio separa el cerebro (arriba) del cerebelo (abajo). El supratentorial está por encima del tentorio, en el cerebro, y aparece principalmente en adultos (70%). El infratentorial está debajo del tentorio, en el cerebelo, y aparece principalmente en niños (70%). El pontino se encuentra en las protuberancias del tronco encefálico. Preferiblemente, el glioma a tratar y/o prevenir mediante un complejo para su uso según la presente invención es un glioma supratentorial. Preferiblemente, el glioma a tratar y/o prevenir mediante un complejo para su uso según la presente invención es un glioma infratentorial. Preferiblemente, el glioma a tratar y/o prevenir mediante un complejo para su uso según la presente invención es un glioma pontino.

Ácido nucleico que codifica los complejos de péptidos y proteínas

- 10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica el complejo como se describe aquí, donde el complejo es un polipéptido o una proteína, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma. En particular, la presente invención proporciona polinucleótidos para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, donde dichos polinucleótidos codifican el complejo como se ha definido anteriormente.
- 15 En este contexto, preferentemente los ácidos nucleicos comprenden ácidos nucleicos monocatenarios, bicatenarios o parcialmente bicatenarios, preferiblemente seleccionados de ADN genómico, ADNc, ARN, ARNip, ADN antisentido, ARN antisentido, ribozimas, secuencias complementarias de ARN/ADN con o sin elementos de expresión, un mini-gen, fragmentos de genes, elementos reguladores, promotores y combinaciones de los mismos.
- 20 Preferiblemente, la invención se refiere a un ácido nucleico para su uso de acuerdo con la presente invención, donde dicho ácido nucleico codifica un complejo, que es en particular un polipéptido o proteína, comprendiendo dicho complejo un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico, que es un polipéptido o proteína, y al menos un péptido agonista de TLR, donde el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o epítipo antigénico y el al menos un péptido agonista de TLR están unidos covalentemente, opcionalmente con espaciador(es) o enlazador(es) peptídico(s) como se describe aquí.
- 25 Si dicho complejo comprende más de un antígeno o epítipo antigénico, que es un polipéptido o proteína, los más de un antígeno o epítipo antigénico también están unidos covalentemente, opcionalmente con espaciador(es) o enlazador(es) peptídico(s) como se describe aquí.
- 30 De manera similar, si dicho complejo comprende más de un péptido agonista de TLR, los más de un péptido agonista de TLR también están unidos covalentemente, opcionalmente con separador(es) o enlazador(es) peptídico(s) como se describe aquí.

- De manera particularmente preferente, el ácido nucleico para su uso según la presente invención codifica un complejo que es una proteína de fusión (recombinante) que comprende (a) un péptido de penetración celular como se describe anteriormente, (b) al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, incluso más preferiblemente al menos cuatro, con particular preferencia al menos cinco, con total preferencia al menos seis antígenos o epítopos antigénicos como se describen anteriormente, preferiblemente dispuestos de manera consecutiva como se describió anteriormente y (c) al menos un agonista de TLR como se describió anteriormente.
- 35

Producción y purificación de los complejos.

- 40 Según otro aspecto, la presente invención proporciona un vector para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, en particular un vector recombinante que comprende un ácido nucleico como se describe anteriormente.
- El término "vector", tal como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a una molécula de ácido nucleico, preferiblemente a una molécula de ácido nucleico artificial, es decir, una molécula de ácido nucleico que no existe en la naturaleza. Un vector en el contexto de la presente invención es adecuado para incorporar o albergar una secuencia de ácido nucleico deseada. Dichos vectores pueden ser vectores de almacenamiento, vectores de expresión, vectores de clonación, vectores de transferencia, etc. Un vector de almacenamiento es un vector que permite el almacenamiento conveniente de una molécula de ácido nucleico. Por tanto, el vector puede comprender una secuencia correspondiente a, por ejemplo, un anticuerpo deseado o fragmento de anticuerpo del mismo según la presente invención. Se puede usar un vector de expresión para la producción de productos de expresión tales como ARN, por ejemplo ARNm, o péptidos, polipéptidos o proteínas. Por ejemplo, un vector de expresión puede comprender las secuencias necesarias para la transcripción de un tramo
- 45
- 50

de secuencia del vector, tal como una secuencia promotora. Un vector de clonación es típicamente un vector que contiene un sitio de clonación, que puede usarse para incorporar secuencias de ácido nucleico en el vector. Un vector de clonación puede ser, por ejemplo, un vector plasmídico o un vector bacteriófago. Un vector de transferencia puede ser un vector adecuado para transferir moléculas de ácido nucleico a células u organismos, por ejemplo, vectores virales. Un vector en el contexto de la presente invención puede ser, por ejemplo, un vector de ARN o un vector de ADN. Preferiblemente, un vector es una molécula de ADN. Por ejemplo, un vector en el sentido de la presente solicitud comprende un sitio de clonación, un marcador de selección, tal como un factor de resistencia a antibióticos, y una secuencia adecuada para la multiplicación del vector, tal como un origen de replicación. Preferiblemente, un vector en el contexto de la presente solicitud es un vector plasmídico. Preferentemente, un vector en el contexto de la presente solicitud es un vector de expresión.

Las células transformadas con un vector tal como se describe anteriormente para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, también se incluyen dentro del alcance de la invención. Ejemplos de tales células incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, por ejemplo *E. coli*, y células eucariotas, por ejemplo células de levadura, células animales o células vegetales. En una realización, las células son de mamífero, por ejemplo células humanas CHO, HEK293T, PER.C6, NSO, mieloma o hibridoma. Así, la presente invención también se refiere a una célula que expresa el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso según la presente invención; o que comprende el vector para su uso de acuerdo con la presente invención.

En particular, una célula puede transfectarse con un vector como se describe anteriormente, preferiblemente con un vector de expresión. El término "transfección" se refiere a la introducción de moléculas de ácido nucleico, como moléculas de ADN o ARN (por ejemplo ARNm), en las células, preferiblemente en células eucariotas. En el contexto de la presente invención, el término "transfección" abarca cualquier método conocido por el experto para introducir moléculas de ácido nucleico en células, preferiblemente en células eucariotas, tales como células de mamífero. Dichos métodos abarcan, por ejemplo, electroporación, lipofección, por ejemplo basada en lípidos catiónicos y/o liposomas, precipitación de fosfato de calcio, transfección basada en nanopartículas, transfección basada en virus o transfección basada en polímeros catiónicos, como DEAE-dextrano o polietilénimina, etc. Preferiblemente, la introducción es no viral.

Se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión, incluyendo, entre otros, cromosomas, episomas y virus derivados. Más particularmente, el vector tal como se describió anteriormente, en particular el vector recombinante usado, puede derivarse de plásmidos bacterianos, transposones, episomas de levadura, elementos de inserción, elementos cromosómicos de levadura, virus como baculovirus, virus de papiloma como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela del zorro, virus de la seudorrabia, retrovirus.

Por ejemplo, tales vectores, en particular vectores recombinantes, pueden ser también derivados de cósmidos o fagémidos. La secuencia de nucleótidos, en particular el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, puede insertarse en el vector de expresión recombinante por métodos bien conocidos por el experto en la técnica tales como, por ejemplo, los descritos en MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Sambrook et al., 4th Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.

El vector, en particular el vector recombinante, también puede incluir secuencias de nucleótidos que controlan la regulación de la expresión, en particular del ácido nucleico, para su uso de acuerdo con la presente invención, así como secuencias de nucleótidos que permiten la expresión, la transcripción y la traducción, en particular del ácido nucleico, para su uso según la presente invención. Típicamente, estas secuencias se seleccionan de acuerdo con las células huésped utilizadas.

Así, por ejemplo, se puede integrar una señal de secreción apropiada en el vector para su uso de acuerdo con la presente invención, en particular en un vector recombinante, de modo que el polipéptido o proteína codificado por el ácido nucleico para su uso de acuerdo con la presente invención, se dirija, por ejemplo, hacia el lumen del retículo endoplásmico, hacia el espacio periplásmico, sobre la membrana o hacia el entorno extracelular. La selección de una señal de secreción apropiada puede facilitar la posterior purificación de proteínas.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona una célula huésped para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, comprendiendo la célula huésped un vector, en particular un vector recombinante como se describe aquí.

La introducción del vector, en particular el vector recombinante, en una célula huésped puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos por el experto en la técnica, tales como los descritos en BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., 2nd ed., McGraw-Hill Professional Publishing, 1995, and MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, *supra*, incluyendo, por ejemplo, la transfección como se

describió anteriormente, por ejemplo por fosfato de calcio, por DEAE dextrano o por lípidos catiónicos; microinyección, electroporación, transducción o infección.

5 Las células huésped pueden ser, por ejemplo, células bacterianas como E. coli, células de hongos como células de levadura y de Aspergillus, Streptomyces, células de insectos y/o cualquier línea celular, por ejemplo células de ovario de hámster chino (CHO), línea celular de ratón C127, línea celular BHK de células de hámster sirio, células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293). Preferiblemente, la célula huésped para su uso según la presente invención es de mamífero, por ejemplo células humanas CHO, HEK293T, PER.C6, NSO, mieloma o hibridoma. Las células dendríticas y las líneas celulares dendríticas son particularmente preferentes como células huésped. Típicamente, la selección de un medio de cultivo depende en particular de la elección del tipo celular y/o línea celular, por lo que el experto conoce medios de cultivo adecuados que son apropiados para un tipo celular y/o línea celular seleccionado.

15 Las células huésped pueden usarse, por ejemplo, para expresar un polipéptido o proteína, en particular el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, sobre la base del vector y/o del ácido nucleico como se describe aquí. Después de la purificación por métodos estándar, el polipéptido o proteína expresados, en particular el complejo para su uso según la presente invención, se puede emplear como se describe en este documento.

Así, la presente invención también proporciona un método para preparar el complejo tal como se define aquí, en particular donde el complejo es un polipéptido o proteína. Dicho método comprende los pasos de:

- 20 i) cultivar una célula huésped como se describe anteriormente en un medio de cultivo; y
- ii) separar el complejo como se define aquí del medio de cultivo o separar el complejo como se define aquí del lisado de la célula huésped después de la lisis de la célula huésped.

Por lo tanto, el complejo obtenido por dicho método de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención como se describe aquí.

25 Para la extracción de proteínas se pueden usar kits y/o reactivos disponibles comercialmente, por ejemplo BugBuster™ de Novagen.

Preferiblemente, el método para preparar el complejo tal como se define aquí comprende además el siguiente paso:

- 30 iii) solubilizar el complejo como se define aquí, por ejemplo por resuspensión en soluciones que contienen urea o clorhidrato de guanidina (GuHCl),
- donde el paso (iii) sigue al paso (ii) como se describe anteriormente.

Además, es preferente que el método para preparar el complejo como se define aquí comprenda además el siguiente paso:

- iv) purificar el complejo como se define aquí, preferiblemente por cromatografía de afinidad de una etapa, donde el paso (iv) sigue al paso (ii), o, si está presente, al paso (iii) como se describió anteriormente.

35 Además, el complejo como se define aquí también se puede preparar por métodos de química sintética, por ejemplo por síntesis de péptidos en fase sólida.

La purificación de esos péptidos o proteínas se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica conocida de la purificación de proteínas/péptidos. Técnicas ilustrativas incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y métodos de inmunoafinidad.

40 Así, la presente invención también proporciona un método para preparar el complejo como se define aquí que comprende los pasos de:

- i) sintetizar químicamente dicho complejo; y
- ii) purificar dicho complejo.

45 Preferentemente, en el método para preparar un complejo como se define aquí, el complejo sintetizado químicamente en el paso (i) y purificado en el paso (ii) comprende una secuencia de aminoácidos como se describe aquí para un péptido de penetración celular, una secuencia de aminoácidos como se describe aquí para un péptido agonista de TLR y, opcionalmente, si el al menos un antígeno y/o epítipo antigénico es un

péptido o una proteína, una secuencia de aminoácidos como se describe aquí para un antígeno o epítipo antigénico.

Alternativamente, la presente invención también proporciona un método para preparar el complejo como se define aquí, donde

- 5 i) el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o fragmento antigénico y/o el al menos un péptido agonista de TLR se sintetizan por separado;
- ii) opcionalmente, el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o fragmento antigénico y/o el al menos un péptido agonista de TLR se purifican; y
- 10 iii) el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o fragmento antigénico y/o el al menos un péptido agonista de TLR están unidos covalentemente como se describe anteriormente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador o con un agente de reticulación como se describe anteriormente.

Células cargadas con los complejos según la invención

- 15 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una célula cargada con el complejo como se define aquí para su uso en la prevención y/o tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma. Por ejemplo, las células cargadas con el complejo como se define aquí son células de un sujeto a tratar, en particular células aisladas de un sujeto a tratar, es decir, células aisladas de un sujeto a tratar.

- 20 Como se usa en el contexto de la presente invención, el término "sujeto" se refiere en particular a mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos contemplados por la presente invención incluyen humanos, primates, animales domesticados tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, caballos, roedores de laboratorio y similares. Más preferiblemente, el término "sujeto" se refiere a un sujeto humano.

- 25 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, "tratamiento" y "tratar" y similares en general significan obtener un efecto farmacológico y fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención o de prevención parcial de una enfermedad, un síntoma o una condición de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad, una condición, un síntoma o un efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" tal como se usa aquí abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular en un ser humano, e incluye: (a) evitar que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero el brote de la enfermedad aún no ha ocurrido y/o la enfermedad aún no ha sido diagnosticada en este sujeto, por ejemplo una intervención preventiva asintomática temprana; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener o ralentizar su desarrollo; o (c)
- 30 aliviar la enfermedad, es decir, causar una regresión al menos parcial de la enfermedad y/o de al menos uno de sus síntomas o afecciones, como la mejora o la reparación del daño. En particular, los métodos, usos, formulaciones y composiciones según la invención son útiles en el tratamiento de cánceres o enfermedades infecciosas y/o en la prevención de la evolución de cánceres en una etapa avanzada o metastásica en sujetos con cáncer en etapa temprana, mejorando así la estadificación del cáncer. Cuando se aplica a los cánceres, la prevención de una enfermedad o trastorno incluye la prevención de la aparición o el desarrollo de un cáncer en un individuo identificado como en riesgo de desarrollar dicho cáncer, por ejemplo debido a la ocurrencia pasada de dicho cáncer en el círculo familiar del individuo, y la prevención de infecciones con agentes patógenos promotores de tumores, por ejemplo virus de Epstein-Barr (VEB), virus del papiloma humano (VPH), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus del herpes humano 8 (HHV8), virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), poliomavirus de células de Merkel (MCV) y *Helicobacter pylori*.
- 35 Igualmente, los términos "prevención/tratamiento" de un cáncer abarcan la estabilización o el retraso de un cáncer ya diagnosticado en un individuo. Por "estabilización" se entiende la prevención de la evolución del cáncer en estadio avanzado o metastásico en sujetos con cáncer en estadio temprano.

- 45 Preferiblemente, la célula cargada con el complejo tal como se define aquí es una célula presentadora de antígeno (APC). Preferiblemente, la célula presentadora de antígeno se selecciona del grupo consistente en una célula dendrítica (DC), un macrófago y una célula B. Las células dendríticas, en particular las células dendríticas (convencionales y/o plasmacitoides) aisladas de un sujeto a tratar son especialmente preferentes.

- 50 Los expertos en la materia conocen métodos para aislar células presentadoras de antígeno, en particular células dendríticas, de un sujeto. Éstos incluyen la recogida de monocitos o células madre hematopoyéticas de médula ósea, sangre del cordón umbilical o sangre periférica. También incluyen el uso de células madre embrionarias (ES) y células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células presentadoras de antígeno, en particular las células dendríticas o sus precursores, pueden enriquecerse mediante métodos que incluyen elutriación y separación basada en perlas magnéticas, lo que puede implicar el enriquecimiento de las células precursoras CD14⁺.

Métodos para cargar el complejo tal como se define aquí en las células, preferiblemente en las células presentadoras de antígeno mencionadas anteriormente, en especial en las células dendríticas, y además para preparar tales células antes de la administración a un sujeto son conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, la preparación de células dendríticas puede incluir su cultivo o diferenciación usando citocinas, que pueden incluir, por ejemplo, CM-CSF e IL-4. También se pueden emplear líneas celulares dendríticas. La carga del complejo de la invención en las células, preferiblemente en APC, más preferiblemente en las células dendríticas, puede implicar la incubación conjunta del complejo de la invención con las células en cultivo, haciendo uso de las propiedades intrínsecas del péptido de penetración celular comprendido en el complejo como se define aquí (es decir, su capacidad de internalización). Un cultivo adicional de las células, por ejemplo células dendríticas, así cargadas para inducir una maduración eficiente puede incluir la adición de citocinas que incluyen IL-1 β , IL-6, TNF α , PGE2, IFN α y adyuvantes, que pueden incluir poli-IC, poli-ICLC (es decir un complejo sintético de carboximetilcelulosa, ácido poliinosínico-policitidílico y ARN bicatenario poli-L-lisina) y otros agonistas de TLR y agonistas de NLR (receptores de dominio de oligomerización de nucleótidos).

Un método para preparar células, en particular células presentadoras de antígeno, cargadas con el complejo como se define aquí puede comprender los pasos de:

- i) transducir o transfectar dichas celdas con el complejo de la invención;
- ii) cultivar dichas células en un medio de cultivo; y
- iii) separar dichas células del medio de cultivo.

Preferiblemente, las células se cargan con un complejo como se define aquí, donde el complejo es un polipéptido o una proteína y se usa en la prevención y/o tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma.

Preferiblemente, las células cargadas con uno o varios complejos según se definen aquí y usadas en la prevención y/o tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, presentan al menos un antígeno o epítipo antigénico comprendido en dicho complejo en la superficie celular en contexto MHC de clase I y/o en un contexto MHC de clase II.

25 *Composiciones y kits según la presente invención*

Según otro aspecto, la invención proporciona una composición para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, comprendiendo la composición al menos un componente seleccionado entre:

- i) un complejo como se describe anteriormente,
- ii) un ácido nucleico como se describe anteriormente,
- iii) un vector como se describe anteriormente,
- iv) una célula huésped como se describe anteriormente, y
- v) una célula cargada con un complejo como se define aquí, tal como se describe anteriormente.

Preferentemente, la composición según la presente invención comprende el complejo como se define aquí.

La composición para su uso de acuerdo con la presente invención también puede comprender más de uno de los componentes anteriores (i) a (v). Por ejemplo, la composición para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos dos complejos diferentes bajo (i), al menos dos ácidos nucleicos diferentes bajo (ii), al menos dos vectores diferentes bajo (iii), al menos dos células huésped diferentes bajo (iv) y/o al menos dos celdas diferentes bajo (v); por ejemplo, la composición para su uso según la invención puede comprender al menos dos complejos diferentes (i) y/o al menos dos ácidos nucleicos diferentes (ii).

Por ejemplo, los diferentes complejos (i) comprendidos en la composición como se describió anteriormente pueden diferir en cualquiera de los componentes a), es decir, en los péptidos de penetración celular, en el componente b), es decir, en los antígenos o epítipos antigénicos o en los subconjuntos de más de un antígeno o epítipo antigénico, o en el componente c), es decir, en el péptido agonista de TLR o en el subconjunto de más de un péptido agonista de TLR; o los diferentes complejos (i) comprendidos en la composición como se describió anteriormente pueden diferir en dos de los tres componentes a), b) y c); o los diferentes complejos (i) comprendidos en la composición como se describe anteriormente pueden diferir en los tres componentes a), b) y c) del complejo. Así, los diferentes ácidos nucleicos (ii) comprendidos en la composición como se describe anteriormente pueden diferir en que codifican tales complejos diferentes; los diferentes vectores (iii) comprendidos en la composición como se describió anteriormente pueden diferir en que comprenden tales ácidos nucleicos diferentes; las diferentes células huésped (iv) comprendidas en la composición como se describió anteriormente pueden diferir en que comprenden tales vectores diferentes; y las diferentes células

cargadas con un complejo (v) comprendido en la composición como se describe anteriormente pueden diferir en que están cargadas con tales complejos diferentes.

La presente invención también proporciona una vacuna para su uso en la prevención y/o el tratamiento del del glioma, en particular del glioblastoma, comprendiendo la vacuna al menos un componente seleccionado de:

- 5
 - i) un complejo como se describe anteriormente,
 - ii) un ácido nucleico como se describe anteriormente,
 - iii) un vector como se describe anteriormente,
 - iv) una célula huésped como se describe anteriormente, y
 - v) una célula cargada con un complejo como se describe anteriormente.

- 10 Preferiblemente, la vacuna para su uso según la presente invención comprende el complejo como se define aquí.

Así, los detalles anteriores descritos para la composición para su uso de acuerdo con la presente invención con respecto a más de uno de los componentes (i) a (v), también se aplican para la vacuna para su uso de acuerdo con la presente invención.

- 15 Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "vacuna" se refiere a una preparación biológica que proporciona inmunidad innata y/o adaptativa, típicamente a una enfermedad particular, preferentemente cáncer. Por tanto, una vacuna facilita en particular una respuesta inmune innata y/o adaptativa del sistema inmune de un sujeto a tratar. Por ejemplo, el antígeno o epítipo antigénico del complejo como se define aquí típicamente conduce o apoya una respuesta inmune adaptativa en el paciente a tratar y el péptido agonista de TLR del complejo como se define aquí puede conducir a o apoyar una respuesta inmune.
- 20

- 25 La composición inventiva, en particular la vacuna inventiva, también puede comprender un vehículo, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable como se define a continuación para la composición farmacéutica inventiva. En el contexto específico de la composición inventiva, en particular de la vacuna inventiva, la selección de un vehículo farmacéuticamente aceptable viene determinada, en principio, por la manera en que se administra la composición inventiva, en particular la vacuna inventiva. La composición inventiva, en particular la vacuna inventiva, puede administrarse, por ejemplo, sistémica o localmente. Las vías de administración sistémica en general incluyen, por ejemplo, las vías transdérmica, oral, parenteral, incluyendo inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarteriales, intradérmicas e intraperitoneales, y/o vías de administración intranasales. Las vías de administración local en general incluyen, por ejemplo, vías de administración tópica, pero también inyecciones intradérmicas, transdérmicas, subcutáneas o intramusculares o inyecciones intralesionales, intracraneales, intrapulmonares, intracardíacas, intranodales y sublinguales. Con especial preferencia, la composición de la invención, en particular la vacuna, puede administrarse vía intradérmica, subcutánea, intranodal o intramuscular. Con mayor preferencia, la composición inventiva, en particular la vacuna, se puede administrar vía subcutánea, intranodal o intramuscular. De manera particularmente preferente, la composición de la invención, en particular la vacuna, puede administrarse vía subcutánea o intranodal. Con total preferencia, la composición inventiva, en particular la vacuna, puede administrarse vía subcutánea. Para ello, la composición inventiva, en particular las vacunas inventivas, preferentemente se formulan en forma líquida (o a veces en forma sólida).
- 30
- 35

- 40 La cantidad adecuada de la composición inventiva, en particular de la vacuna inventiva, a administrar puede determinarse mediante experimentos de rutina con modelos animales. Dichos modelos incluyen, sin limitación, modelos de conejo, oveja, ratón, rata, perro y primates no humanos. Las formas de dosis unitarias preferentes para la inyección incluyen soluciones acuosas estériles, solución salina fisiológica o mezclas de las mismas. El pH de tales soluciones debe ajustarse a aproximadamente 7,4. Vehículos adecuados para la inyección incluyen hidrogeles, dispositivos de liberación controlada o retardada, ácido poliláctico y matrices de colágeno.
- 45 Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración tópica incluyen aquellos adecuados para su uso en lociones, cremas, geles y similares. Si la composición inventiva, en particular la vacuna no inventiva, se administra vía oral, las tabletas, cápsulas y similares son la forma de dosis unitaria preferente. Vehículos farmacéuticamente aceptables para la preparación de formas de dosis unitarias que pueden usarse para la administración oral son bien conocidos en la técnica anterior. La selección de éstos dependerá de consideraciones secundarias, tales como sabor, coste y capacidad de almacenamiento, que no son críticas para los fines de la presente invención y que un experto en la técnica puede evaluar sin dificultad.
- 50

- 55 La composición de la invención, en particular la vacuna de la invención, puede contener además una o más sustancias auxiliares para aumentar aún más su inmunogenicidad. Preferentemente, de este modo se consigue una acción sinérgica del complejo inventivo como se definió anteriormente y de una sustancia auxiliar opcionalmente contenida en la vacuna inventiva como se describe anteriormente. Dependiendo de los diversos

tipos de sustancias auxiliares, a este respecto pueden tenerse en cuenta diversos mecanismos. Por ejemplo, los compuestos que permiten la maduración de las células dendríticas (DC), por ejemplo lipopolisacáridos, TNF-alfa o ligando CD40, forman una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas. En general, es posible usar como sustancia auxiliar cualquier agente que influya en el sistema inmune en forma de una "señal de peligro" (LPS, GP96, etc.) o citocinas, como GM-CSF, que permiten una respuesta inmune producida por el adyuvante inmunoestimulante de acuerdo con la invención para su potenciación y/o para influenciarla de manera dirigida. Sustancias auxiliares particularmente preferentes son citocinas, como monocinas, linfoquinas, interleucinas o quimiocinas, que promueven aún más la respuesta inmune innata, por ejemplo IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta o TNF-alfa, factores de crecimiento, como hGH.

Otros aditivos que pueden incluirse en la vacuna de la invención son emulsionantes, por ejemplo Tween®; agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes, vehículos farmacéuticos; agentes formadores de tabletas; estabilizadores; antioxidantes; conservantes

La composición de la invención, en particular la vacuna de la invención, también puede contener además cualquier compuesto adicional conocido por ser inmunoestimulante debido a su afinidad de unión (como ligando) a los receptores humanos tipo Toll TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, o debido a su afinidad de unión (como ligando) a los receptores tipo Toll murinos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13.

En este contexto, otra clase de compuestos que pueden añadirse a una composición inventiva, en particular a una vacuna inventiva pueden ser ácidos nucleicos CpG, en particular CpG-ARN o CpG-ADN. Un CpG-ARN o CpG-ADN puede ser un CpG-ADN monocatenario (CpG-ADNss), un CpG-ADN bicatenario (ADNds), un CpG-ARN monocatenario (CpG-ARNss) o un CpG-ARN bicatenario (CpG-ARNds). El ácido nucleico CpG está preferiblemente en forma de CpG-ARN, más preferiblemente en forma de CpG-ARN monocatenario (CpG-ARNss). El CpG-ácido nucleico contiene preferiblemente al menos una o más secuencias de dinucleótidos de citosina/guanina (mitogénicas) (motivo(s) CpG). Según una primera alternativa preferente, al menos un motivo CpG contenido en estas secuencias, en particular C (citosina) y G (guanina) del motivo CpG, no está metilado. Todas las citosinas o guaninas adicionales opcionalmente contenidas en estas secuencias pueden estar o no metiladas. Sin embargo, según otra alternativa preferente, la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG también pueden estar presentes en forma metilada.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, en particular una composición de vacuna como se describió anteriormente, y un método para tratar a un sujeto, preferiblemente un sujeto mamífero, y con mayor preferencia un sujeto humano, que padece un glioma, en particular un glioblastoma.

En particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, que comprende al menos un complejo como se define aquí o al menos una célula cargada con un complejo como se define aquí, y opcionalmente vehículo y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable o cualquier excipiente, tampón, estabilizador u otros materiales conocidos por los expertos en la técnica, en particular la composición farmacéutica que comprende al menos un complejo como se define aquí o al menos una célula cargada con un complejo como se define aquí y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como ingrediente adicional, la composición farmacéutica de la invención puede comprender en particular un vehículo y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la presente invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable típicamente incluye la base líquida o no líquida de la composición farmacéutica de la invención. Si la composición farmacéutica de la invención se proporciona en forma líquida, el vehículo típicamente será agua libre de pirógenos; soluciones isotónicas de solución salina o tamponadas (acuosas), por ejemplo soluciones tamponadas fosfato, citrato, etc. Particularmente para la inyección de la composición farmacéutica inventiva, se puede usar agua o preferiblemente un tampón, en especial un tampón acuoso que contiene una sal de sodio, preferiblemente una sal de sodio al menos 30 mM, una sal de calcio, preferiblemente al menos una sal de calcio 0,05 mM y opcionalmente una sal de potasio, preferiblemente al menos una sal de potasio 1 mM. Según una realización preferentes, las sales de sodio, calcio y opcionalmente potasio pueden estar presentes en forma de sus haluros, por ejemplo cloruros, yoduros o bromuros, en forma de sus hidróxidos, carbonatos, hidrogenocarbonatos o sulfatos, etc. Sin limitarse a, ejemplos de sales de sodio incluyen NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, ejemplos de sales de potasio opcionales incluyen KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄ y ejemplos de sales de calcio incluyen CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. Además, los aniones orgánicos de los cationes mencionados anteriormente pueden estar contenidos en el tampón. De acuerdo con una realización más preferente, el tampón adecuado para la inyección como se definió

- anteriormente puede contener sales seleccionadas de cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl₂) y opcionalmente cloruro de potasio (KCl), donde pueden estar presentes aniones adicionales al cloruro. El CaCl₂ también puede reemplazarse por otra sal, como KCl. Típicamente, las sales del tampón de inyección están presentes en una concentración de al menos 30 mM de cloruro de sodio (NaCl), al menos 1 mM de cloruro de potasio (KCl) y al menos 0,05 mM de cloruro de calcio (CaCl₂). El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico en relación al medio de referencia específico, es decir, el tampón puede tener un contenido de sal más alto, idéntico o más bajo en relación al medio de referencia específico, donde preferiblemente pueden emplearse las concentraciones de las sales mencionadas anteriormente sin que conduzcan a un daño celular debido a ósmosis u otros efectos de la concentración. Los medios de referencia son, por ejemplo, líquidos que se producen en métodos "*in vivo*", como sangre, linfa, líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, o, por ejemplo, líquidos que pueden usarse como medios de referencia en métodos "*in vitro*", como tampones o líquidos comunes. Tales tampones o líquidos comunes son conocidos por el experto en la técnica. La solución salina (NaCl 0,9%) y Ringer-Lactato son particularmente preferentes como base líquida.
- 15 Sin embargo, también se pueden usar una o más cargas o diluyentes sólidos o líquidos compatibles o compuestos encapsulantes para la composición farmacéutica de la invención, adecuados para la administración a un sujeto a tratar. El término "compatible" tal como se usa aquí significa que estos constituyentes de la composición farmacéutica de la invención son capaces de mezclarse con el complejo como se define aquí anteriormente de manera que no se produce ninguna interacción que reduzca sustancialmente la efectividad farmacéutica de la composición farmacéutica de la invención en las condiciones de uso típicas. Por supuesto, los vehículos, cargas y diluyentes farmacéuticamente aceptables deben tener una pureza lo suficientemente alta y una toxicidad lo suficientemente baja para que sean adecuados para la administración a un sujeto a tratar. Algunos ejemplos de compuestos que se pueden usar como vehículos, cargas o constituyentes farmacéuticamente aceptables de los mismos son azúcares, por ejemplo lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, por ejemplo almidón de maíz o almidón de patata; celulosa y sus derivados, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; sebo; deslizantes sólidos, por ejemplo ácido esteárico, estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles, por ejemplo polipropilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido algínico.

- La composición farmacéutica de la invención puede administrarse vía oral, parenteral, por pulverización inhalatoria, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término parenteral tal como se usa aquí incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardial, intraarterial, intranodal y sublingual o técnicas de fusión. Preferentemente, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse vía intradérmica, intramuscular, intranodal o subcutánea. Más preferiblemente, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse vía intramuscular, intranodal o subcutánea. Incluso más preferiblemente, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse vía intranodal o subcutánea. Con total preferencia, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse vía subcutánea.

- Preferentemente, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse por inyección parenteral, en especial vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, inyección intraperitoneal, intracardiaca, intraarterial, intranodal y sublingual o mediante técnicas de infusión. Las formas inyectables estériles de las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser suspensiones acuosas u oleosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas bien conocidas usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteral no tóxico aceptable, por ejemplo una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para ello, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa, o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos de uso común, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u

otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables también se pueden emplear para la formulación de la composición farmacéutica de la invención.

5 Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea o la inyección en el sitio de aflicción, el ingrediente activo estará preferiblemente en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos y con un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia pueden preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos, como la inyección de cloruro de sodio, la inyección de Ringer, la inyección de Ringer-lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos según sea necesario. Ya se trate de un polipéptido, péptido o molécula de ácido nucleico u otro compuesto farmacéuticamente útil de acuerdo con la presente invención el que se administra a un individuo, la administración se lleva a cabo preferentemente en una "cantidad profilácticamente efectiva" o en una "cantidad terapéuticamente efectiva" (según el caso), esto es, suficiente para demostrar un beneficio en el individuo. La cantidad real administrada y la velocidad y el tiempo de administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se esté tratando.

15 La composición farmacéutica de la invención como se definió anteriormente también se puede administrar vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable, incluyendo, sin limitarse a, cápsulas, tabletas, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de las tabletas de uso oral, los vehículos comúnmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. También se suelen añadir agentes lubricantes, como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo, es decir, la molécula conjugada transportadora de carga de la invención como se definió anteriormente se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

25 La composición farmacéutica de la invención también se puede administrar vía tópica, especialmente cuando la diana de tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, por ejemplo incluyendo enfermedades de la piel o de cualquier otro tejido epitelial accesible. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos. Para aplicaciones tópicas, la composición farmacéutica inventiva puede formularse en una pomada adecuada que contiene la composición inmunoestimuladora inventiva, particularmente sus componentes como se definieron anteriormente, suspendidos o disueltos en uno o más vehículos. Los vehículos para la administración tópica incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, la composición farmacéutica de la invención se puede formular en una loción o crema adecuada. En el contexto de la presente invención, los vehículos adecuados incluyen, sin limitación, aceite mineral, monoestearato de sorbitano, polisorbato 60, cetil ésteres de ceras, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

35 En este contexto, la prescripción del tratamiento, por ejemplo las decisiones sobre la dosificación, etc., cuando se usa la composición farmacéutica anterior, generalmente son responsabilidad del médico general y de otros sanitarios y generalmente tienen en cuenta el trastorno a tratar, la condición del paciente individual, el punto de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los profesionales. Se pueden encontrar ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en REMINGTON'S FARMACEUTICAL SCIENCES, 1 6ta edición, Osol, A. (ed), 1980.

45 Por consiguiente, la composición farmacéutica de la invención típicamente comprende una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la composición farmacéutica inventiva, en particular del complejo como se define aquí definido anteriormente y/o células cargadas con dicho complejo. Ta como se usa aquí, una "cantidad segura y efectiva" significa una cantidad del complejo como se define aquí que es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva de una enfermedad o trastorno, es decir, una cantidad del complejo como se define aquí o de células cargadas con dicho complejo que provoca la respuesta biológica o medicinal buscada en un tejido, sistema, animal o humano. Una cantidad efectiva puede ser una "cantidad terapéuticamente efectiva" para alterar los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando y/o una "cantidad profilácticamente efectiva" para la profilaxis de los síntomas de la enfermedad o afección que se está evitando. El término también incluye la cantidad de complejo activo suficiente para reducir la progresión de la enfermedad, en particular para reducir o inhibir el crecimiento del tumor o la infección y, por tanto, provocar la respuesta que se busca, en particular, tal respuesta podría ser una respuesta inmune dirigida contra los antígenos o epítopos antigénicos comprendidos en el complejo (es decir, una "cantidad eficaz de inhibición"). Al mismo tiempo, sin embargo, una "cantidad segura y efectiva" es lo suficientemente pequeña como para evitar efectos secundarios graves, es decir, para permitir una relación sensata entre ventajas y riesgos. La determinación de estos límites típicamente está dentro del alcance del juicio médico sensato. Una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la composición farmacéutica de la invención, en particular del complejo como se define aquí descrito anteriormente, variará además en relación con la condición particular a

tratar y también con la edad y la condición física del paciente a tratar, su peso corporal, su estado general de salud, su sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de medicamentos, la actividad de los componentes específicos a), b) y c) del complejo como se define anteriormente, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia de acompañamiento, del vehículo farmacéuticamente aceptable particular utilizado y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del médico. La composición farmacéutica de la invención puede usarse para humanos y también para fines médicos veterinarios, preferiblemente para fines médicos humanos, como una composición farmacéutica en general o como una vacuna.

Las composiciones farmacéuticas, en particular las composiciones de vacuna, o las formulaciones de acuerdo con la invención pueden administrarse como una formulación farmacéutica que puede contener un complejo como se define aquí en cualquier forma descrita aquí.

Los términos "formulación farmacéutica" y "composición farmacéutica" tal como se usan en el contexto de la presente invención se refieren en particular a preparaciones que están en una forma tal que permiten que la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos sea inequívocamente efectiva y que no contienen ningún componente adicional tóxico para los sujetos a los que se administraría dicha formulación.

En el contexto de la presente invención, la "eficacia" de un tratamiento puede medirse en función de los cambios en el transcurso de una enfermedad en respuesta a un uso o un método de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, la eficacia de un tratamiento del cáncer puede medirse mediante una reducción del volumen del tumor y/o un aumento del tiempo de supervivencia libre de progresión y/o una disminución del riesgo de recaída después de la resección del cáncer primario. Más específicamente, para el cáncer tratado por inmunoterapia, la evaluación de la eficacia puede ser según el espectro de patrones clínicos de respuesta antitumoral para agentes inmunoterapéuticos mediante nuevos criterios de respuesta inmunológica (irRC) que están adaptados de los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) y Criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (J. Natl. Cáncer Inst. 2010, 02(18): 1388-1397). La eficacia de la prevención de enfermedades infecciosas se evalúa en última instancia mediante estudios epidemiológicos en poblaciones humanas, que a menudo se correlacionan con los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero y la inducción de respuestas de células T específicas para patógenos multifuncionales. La evaluación preclínica puede incluir la resistencia a la infección después del desafío con un patógeno infeccioso. El tratamiento de una enfermedad infecciosa se puede medir mediante la inhibición del crecimiento del patógeno o la eliminación del patógeno (y, por tanto, la ausencia de detección del patógeno), correlacionando con anticuerpos específicos del patógeno y/o respuestas inmunes de células T.

Las composiciones farmacéuticas, en particular las composiciones de vacuna, o las formulaciones de acuerdo con la invención también pueden administrarse como una formulación farmacéutica que puede contener células presentadoras de antígeno cargadas con un complejo de acuerdo con la invención en cualquier forma descrita aquí.

La vacuna y/o la composición para su uso según la presente invención también se pueden formular como composiciones farmacéuticas y dosis unitarias de las mismas, en particular junto con un adyuvante, material inmunomodulador, vehículo, diluyente o excipiente empleado convencionalmente como se describe arriba y abajo, y en tal forma pueden emplearse como sólidos, como tabletas o cápsulas cargadas, o como líquidos, como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires o cápsulas cagadas con los mismos, todos para su uso oral, o en forma de soluciones inyectables estériles para uso parenteral (incluyendo subcutáneo e intradérmico) por inyección o infusión continua.

En el contexto de la presente invención, en particular en el contexto de una composición farmacéutica y de las vacunas de acuerdo con la presente invención, las composiciones inyectables se basan típicamente en una solución salina estéril inyectable o una solución salina tamponada con fosfato u otros vehículos inyectables conocidos en la técnica. Dichas composiciones farmacéuticas y sus formas de dosificación unitarias pueden comprender los ingredientes en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y dichas formas de dosificación unitarias pueden contener cualquier cantidad efectiva adecuada del ingrediente activo que sea proporcional al intervalo de dosificación diario previsto empleado.

Ejemplos de adyuvantes y/o materiales inmunomoduladores adecuados en el contexto de la presente invención incluyen MPL® (Corixa), minerales a base de aluminio que incluyen compuestos de aluminio (llamados genéricamente alumbre), ASO1-4, MF59, fosfato de calcio, liposomas, Iscom, ácido poliinosínico:ácido policitídico (polyIC), incluyendo su forma estabilizada poli-ICLC (Hiltonol), oligodesoxinucleótidos CpG, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), lipopolisacárido (LPS), montanide, polilactida co-glicólido (PLG), flagelina, saponinas de árbol de corteza de jabón (QS21), compuestos aminaalquil-glucosamida (por ejemplo RC529), péptidos antibacterianos de dos componentes con oligodesoxinucleótidos

sintéticos (por ejemplo IC31), imiquimod, resiquimod, secuencias inmunoestimuladoras (ISS), monofosforil lípido A (MPLA), lipopéptido estimulante de fibroblastos (FSL1) y anticuerpos anti-CD40.

- 5 Las composiciones, en particular las composiciones farmacéuticas y las vacunas, para su uso de acuerdo con la presente invención pueden ser formulaciones líquidas que incluyen, pero no se limitan a, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes y elixires. Las composiciones también pueden formularse como un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

- 10 Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos, incluyendo, sin limitarse a, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes. Los agentes de suspensión incluyen, pero no se limitan a, jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas. Los agentes emulsionantes incluyen, entre otros, lecitina, monooleato de sorbitano y acacia. Los conservantes incluyen, pero no se limitan a, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico. Los agentes dispersantes o humectantes incluyen, entre otros, poli(etilenglicol), glicerol, albúmina de suero bovino, Tween®, Span®.

- 15 Las composiciones, en particular las composiciones farmacéuticas y las vacunas, para su uso de acuerdo con la presente invención también pueden formularse como una preparación en depósito que puede administrarse por implantación o por inyección intramuscular.

- 20 Las composiciones, en particular las composiciones farmacéuticas y las vacunas, para su uso según la presente invención también pueden ser composiciones sólidas, que pueden estar en forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional. Por ejemplo, las tabletas y cápsulas para la administración oral pueden contener excipientes convencionales, incluyendo, pero sin limitarse a, agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes y agentes humectantes. Los aglutinantes incluyen, sin limitarse a, jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón y polivinilpirrolidona. Las cargas incluyen, entre otras, lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio y sorbitol. Los lubricantes incluyen, entre otros, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol y sílice. Los disgregantes incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata y glicolato de almidón sódico. Los agentes humectantes incluyen, pero no se limitan a, laurilsulfato de sodio. Las tabletas pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

- 30 Las composiciones, en particular las composiciones farmacéuticas y las vacunas, para su uso según la presente invención también se pueden administrar en formas de liberación sostenida o desde sistemas de liberación de fármacos de liberación sostenida.

Además, las composiciones, en particular las composiciones farmacéuticas y vacunas, para su uso de acuerdo con la presente invención pueden adaptarse para la administración por administración repetida.

- 35 Otros materiales adicionales, así como técnicas de procesamiento de formulación y similares, que son útiles en el contexto de composiciones, en particular composiciones farmacéuticas y vacunas, para uso de acuerdo con la presente invención o en el contexto de su preparación se describen en la "Parte 5" de Remington's "The Science and Practice of Pharmacy", 22nd Edition, 2012, University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un kit de partes para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, comprendiendo el kit de partes al menos uno de:

- 40 i) un complejo como se describe anteriormente,
 ii) un ácido nucleico como se describe anteriormente,
 iii) un vector como se describe anteriormente,
 iv) una célula huésped como se describe anteriormente, y
 v) una célula cargada con un complejo como se describe anteriormente.
- 45 En particular, el kit de partes de la invención puede comprender más de un componente (i) a (v). Por ejemplo, el kit de partes de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos dos complejos diferentes bajo (i), al menos dos ácidos nucleicos diferentes bajo (ii), al menos dos vectores diferentes bajo (iii), en al menos dos células huésped diferentes bajo (iv) y/o al menos dos células diferentes bajo (v); por ejemplo, el kit de partes de la invención puede comprender al menos dos complejos diferentes (i) y/o al menos dos ácidos nucleicos diferentes (ii).
- 50

- Por ejemplo, los diferentes complejos (i) comprendidos en el kit de partes como se describe anteriormente pueden diferir en cualquiera de los componentes a), es decir en el péptido de penetración celular, en el componente b), es decir en los antígenos o epítopos antigénicos o en los subconjuntos de más de un antígeno o epítopo antigénico, o en el componente c), es decir, en el péptido agonista de TLR o en el subconjunto de más de un péptido agonista de TLR; o los diferentes complejos (i) comprendidos en el kit de partes como se describe anteriormente pueden diferir en dos de los tres componentes a), b) y c); o los diferentes complejos (i) comprendidos en el kit de partes como se describe anteriormente pueden diferir en los tres componentes a), b) y c) del complejo. En consecuencia, los diferentes ácidos nucleicos (ii) comprendidos en el kit de partes como se describe anteriormente pueden diferir en que codifican tales complejos diferentes; los diferentes vectores (iii) comprendidos en el kit de partes como se describe anteriormente pueden diferir en que comprenden tales ácidos nucleicos diferentes; las diferentes células huésped (iv) comprendidas en el kit de partes como se describe anteriormente pueden diferir en que comprenden tales vectores diferentes; y las diferentes células cargadas con un complejo (v) comprendidas en el kit de partes como se describe anteriormente pueden diferir en que están cargadas con tales complejos diferentes.
- Los diversos componentes del kit de partes se pueden empaquetar en uno o más recipientes. Los componentes anteriores se pueden proporcionar en forma liofilizada o seca o disueltos en un tampón adecuado. El kit también puede comprender reactivos adicionales, incluyendo, por ejemplo, conservantes, medios de crecimiento y/o tampones para el almacenamiento y/o la reconstitución de los componentes, soluciones de lavado y similares mencionados anteriormente. Además, el kit de partes de acuerdo con la presente invención puede contener opcionalmente instrucciones de uso.

Además, la presente invención también proporciona un kit de vacunación para tratar, prevenir y/o estabilizar el glioma, en particular el glioblastoma, comprendiendo la composición farmacéutica como se describe aquí o una vacuna como se describe aquí e instrucciones para el uso de dicha composición farmacéutica o de dicha vacuna en la prevención y/o tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma.

- Por tanto, la presente invención también proporciona un kit que comprende el complejo como se describe aquí, la célula como se describe aquí, la composición como se describe aquí, la vacuna como se describe aquí y/o la composición farmacéutica como se describe aquí.

- Preferentemente, dicho kit comprende además un prospecto o folleto de instrucciones con instrucciones para tratar el glioma, en particular el glioblastoma, usando el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención como se describe aquí, la célula como se describe aquí, la composición como se describe aquí, la vacuna como se describe aquí y/o la composición farmacéutica como se describe aquí.

Uso y métodos según la invención

- En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de cualquiera de: (i) un complejo como se describe aquí, y/o (ii) células, tales como células presentadoras de antígeno, cargadas con un complejo como se describe aquí (para la preparación de un medicamento) para la prevención, el tratamiento o la estabilización del glioma, en particular del glioblastoma. En consecuencia, la presente invención proporciona cualquiera de: (i) un complejo como se describe aquí y/o (ii) células, tales como células presentadoras de antígeno, cargadas con un complejo como se describe aquí para su uso en la prevención, tratamiento o estabilización del glioma, en particular del glioblastoma.

- La presente invención también proporciona un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, que permite el transporte y la presentación del al menos un antígeno o epítopo antigénico comprendido en el complejo a la superficie celular de las células presentadoras de antígeno en un contexto MHC de clase I y/o MHC de clase II para su uso en la vacunación y/o la inmunoterapia.

- Según otro aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir, tratar o reprimir el glioma, en particular el glioblastoma, donde dicho método comprende administrar cualquiera de: (i) un complejo de la invención, (ii) células, tales como células presentadoras de antígeno, cargadas con un complejo de la invención o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii) a un sujeto.

- Además, la presente descripción proporciona un método para provocar o mejorar, en un sujeto, una respuesta inmune contra uno o múltiples epítopos que son dependientes de las células T helper CD4⁺ y/o células T citotóxicas CD8⁺, donde dicho método comprende administrar cualquiera de: (i) un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención y/o (ii) células, tales como células presentadoras de antígenos, cargadas con dicho complejo o (iii) un producto farmacéutico con la formulación de (i) a (ii), a un sujeto. Se puede determinar una respuesta inmune que es dependiente de la respuesta CD4⁺ y/o CD8⁺ evaluando una respuesta

inflamatoria, una respuesta citoquímica inflamatoria proinflamatoria, incluyendo un aumento en la expresión de uno o más de ARNm o proteína de IFN- γ , TNF- α e IL-2 ARNm con relación al nivel antes de la administración de los compuestos de la invención. También se puede medir mediante un aumento en la frecuencia o el número absoluto de células T específicas de antígeno después de la administración de los compuestos de la invención, medido por tinción de multímero de péptido-HLA, ensayos ELISPOT y pruebas de hipersensibilidad de tipo retardado. También se puede medir indirectamente por el aumento de anticuerpos séricos específicos de antígeno que dependen de las células T helper específicas de antígeno.

5

La presente descripción también proporciona un método para provocar o mejorar, en un sujeto, una respuesta inmune contra uno o múltiples antígenos o epítomos antigénicos que está restringida por múltiples moléculas MHC de clase I y/o múltiples moléculas MHC de clase II, donde dicho método comprende administrar cualquiera de: (i) un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención y/o (ii) células, tales como células presentadoras de antígeno, cargadas con dicho complejo o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii), a un sujeto.

10

Un método para provocar o mejorar, en un sujeto, una respuesta inmune contra múltiples epítomos como se describe aquí, que está restringido por múltiples moléculas MHC de clase I y/o múltiples moléculas MHC de clase II se puede determinar evaluando una respuesta de citocina, incluyendo un aumento en la expresión de uno o más de ARNm o proteína de IFN- γ , TNF- α e IL-2 en relación con el nivel antes de la administración de los compuestos de la invención, después de la estimulación *in vitro* de células T con péptidos individuales que se unen a moléculas MHC discretas clase I y II en células presentadoras de antígeno. La restricción a diferentes moléculas MHC también se puede validar empleando células presentadoras de antígeno que expresan diferentes moléculas MHC, o mediante el uso de anticuerpos bloqueadores de MHC. También se puede medir por un aumento en la frecuencia o número absoluto de células T específicas de antígeno después de la administración de los compuestos de la invención, medido por tinción de multímero de péptido-HLA, que usa multímeros ensamblados con moléculas MHC discretas.

15

20

Preferentemente, en los métodos para provocar o mejorar una respuesta inmune contra uno o múltiples antígenos o epítomos antigénicos según la presente invención, la respuesta inmune se dirige contra uno o múltiples epítomos de un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor como, por ejemplo, una combinación de epítomos como se describe aquí.

25

Alternativa o adicionalmente, la respuesta inmune puede dirigirse contra múltiples epítomos de una proteína antigénica de un patógeno.

30

Los métodos tal como se describen aquí pueden ser para provocar o mejorar, en un sujeto, una respuesta inmune contra uno o múltiples epítomos que está restringida por moléculas MHC de clase I y/o moléculas MHC de clase II.

En particular, la presente descripción proporciona así un método para prevenir y/o tratar el glioma, en particular el glioblastoma, o iniciar, mejorar o prolongar una respuesta antitumoral en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto un complejo que comprende:

35

un péptido de penetración celular;
al menos un antígeno o epítomo antigénico; y
al menos un péptido agonista de TLR,

donde los componentes a) - c) están unidos covalentemente.

40

En dicho método, es preferente que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención como se describe aquí, la célula como se describe aquí, la composición como se describe aquí, la vacuna como se describe aquí y/o la composición farmacéutica como se describe aquí se administre al sujeto.

Preferiblemente, el sujeto tiene un glioma, en particular un glioblastoma, y/o ha sido diagnosticado de glioma, en particular de glioblastoma.

45

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de cualquiera de: (i) un complejo como se describe aquí y/o (ii) células, tales como células presentadoras de antígeno, cargadas con el complejo como se describe aquí, para la preparación de una composición de imagen para técnicas de visualización en el contexto de (diagnóstico de) glioma, en particular glioblastoma, o para la preparación de una composición diagnóstica ("composiciones de diagnóstico") para diagnosticar el glioma, en particular el glioblastoma. Una composición

50

diagnóstica para diagnosticar glioma, en particular glioblastoma, según la presente invención comprende al menos un componente seleccionado de:

- i) un complejo como se describe anteriormente,
- ii) un ácido nucleico como se describe anteriormente,
- 5 iii) un vector como se describe anteriormente,
- iv) una célula huésped como se describe anteriormente, y
- v) una célula cargada con un complejo como se describe anteriormente

Preferiblemente, la composición diagnóstica según la presente invención comprende el complejo como se describe anteriormente.

- 10 En particular, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva o, con especial preferencia, la composición diagnóstica de la invención pueden utilizarse en la diagnosis como una herramienta de diagnóstico, por ejemplo en ensayos (*in vivo* o *in vitro*), por ejemplo en inmunoensayos, para detectar,
- 15 pronosticar, diagnosticar o controlar el glioma, en particular el glioblastoma.

- Como un ejemplo, los ensayos (*in vitro*) se pueden realizar administrando el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva o, con total preferencia, la composición diagnóstica inventiva a células diana típicamente seleccionadas de, por ejemplo, células animales, células humanas cultivadas o microorganismos, y para controlar la respuesta celular mediante métodos biofísicos típicamente conocidos por el experto. Las células diana típicamente utilizadas pueden ser células cultivadas (*in vitro*), por ejemplo células aisladas del cuerpo humano o animal, como células sanguíneas aisladas del cuerpo humano o animal, o células *in vivo*, es decir, células que componen los órganos o tejidos de animales o humanos vivos, o microorganismos encontrados en animales o humanos vivos. Son particularmente preferentes en este contexto los denominados marcadores o etiquetas, que pueden estar contenidos en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención y, en particular, en la composición diagnóstica de acuerdo con la presente invención.

- Según otro aspecto, la descripción proporciona un método para diagnosticar glioma, en particular glioblastoma en un sujeto, donde dicho método comprende administrar cualquiera de: (i) un complejo de la invención, (ii) células, tales como células presentadoras de antígeno, cargadas con el complejo de la invención, o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii), a dicho sujeto o a la muestra de dicho sujeto *ex vivo*.

Preferiblemente, los usos y métodos según la presente descripción comprenden la administración de un complejo para su uso según la invención.

- Además, los usos y métodos de acuerdo con la presente descripción comprenden la administración de más de un complejo, células o formulación farmacéutica de acuerdo con la invención. Por ejemplo, en los usos y métodos de acuerdo con la presente invención, se usan o administran al menos dos complejos diferentes, donde cada complejo comprende al menos un antígeno o epítipo antigénico y dicho antígeno o epítipo antigénico o (si hay más de un antígeno o epítipo antigénico el epítipo está comprendido en dicho complejo) dicho subconjunto de antígenos o epítipos antigénicos son diferentes en los dos complejos.

- Por ejemplo, los diferentes complejos (i) comprendidos en la composición como se describió anteriormente pueden diferir en cualquiera de los componentes a), es decir, en los péptidos de penetración celular, en el componente b), es decir, en los antígenos o epítipos antigénicos o en los subconjuntos de más de un antígeno o epítipo antigénico, o en el componente c), es decir, en el péptido agonista de TLR o en el subconjunto de más de un péptido agonista de TLR; o los diferentes complejos (i) comprendidos en la composición como se describió anteriormente pueden diferir en dos de los tres componentes a), b) y c); o los diferentes complejos (i) comprendidos en la composición como se describe anteriormente pueden diferir en los tres componentes a), b) y c) del complejo. Por consiguiente, los diferentes ácidos nucleicos (ii) comprendidos en la composición como se describe anteriormente pueden diferir en que codifican tales complejos diferentes; los diferentes vectores (iii) comprendidos en la composición como se describe anteriormente pueden diferir en que comprenden tales ácidos nucleicos diferentes; las diferentes células huésped (iv) comprendidas en la composición como se describe anteriormente pueden diferir en que comprenden tales vectores diferentes y las diferentes células cargadas con un complejo (v) comprendidas en la composición como se describe anteriormente pueden diferir en que están cargadas con tales complejos diferentes.

Además, en los usos y métodos según la presente descripción, las células según la presente invención pueden ser células presentadoras de antígeno, en particular células dendríticas, más preferiblemente células dendríticas del sujeto a tratar.

Modo de administración

- 5 El complejo para uso según la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna de la invención se pueden administrar de cualquier manera como se describió anteriormente, incluyendo la vía enteral, tal como oral o rectal, y parenteral, tal como intravenosa, o combinaciones de las mismas. La administración parenteral incluye, pero no se limita a,
- 10 intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica e intramuscular. Preferiblemente, el complejo para su uso según la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva y/o la vacuna inventiva se administran por una vía de administración enteral, tal como oral, sublingual y rectal. El complejo para su uso según la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva también se pueden administrar preferiblemente vía tópica, intratumoral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intranasal o intranodal. El complejo para su uso según la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención también se pueden administrar en forma de implante, lo que permite la liberación lenta de las composiciones, así como por infusión i.v. Por ejemplo, el complejo para su uso según la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden administrarse vía subcutánea.

- 25 La administración de complejos para su uso de acuerdo con la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden requerir múltiples inyecciones/administraciones sucesivas. Así, la administración puede repetirse al menos dos veces, por ejemplo una vez como inyecciones/administración de inmunización primaria y, más tarde, como inyecciones/administración de refuerzo.

- En particular, el complejo para su uso según la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden administrarse repetida o continuamente. El complejo para su uso según la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden administrarse repetida o continuamente durante un período de al menos 1, 2, 3 o 4 semanas; 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 o 12 meses; o 2, 3, 4 o 5 años.

- 40 Además, el péptido de penetración celular, los componentes a), b) y c), es decir, el al menos un antígeno o epítipo antigénico y el al menos un péptido agonista de TLR, que componen el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden estar contenidos en composiciones separadas que se mezclan justo antes de la administración o que se administran simultáneamente al sujeto que lo necesita.

- Según un enfoque, el complejo para su uso según la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden administrarse directamente a un paciente usando las vías de administración descritas anteriormente, en particular para las composiciones farmacéuticas. Alternativamente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva se pueden administrar a un paciente usando un enfoque *ex vivo*, por ejemplo introduciendo la composición farmacéutica, la vacuna o la molécula conjugada transportadora de carga de la invención como se definió anteriormente en las células, preferiblemente células autólogas, es decir, células derivadas del paciente a tratar, y trasplantando estas células en el sitio del paciente a tratar, opcionalmente tras almacenamiento y/o cultivo de estas células antes del tratamiento.

- 55 La dosis administrada a un individuo, como dosis únicas o múltiples, variará dependiendo de diversos factores, incluyendo propiedades farmacocinéticas, condiciones y características del sujeto (sexo, edad, peso corporal,

salud, tamaño), extensión de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

- 5 Típicamente, para el tratamiento del cáncer, la dosis terapéuticamente efectiva de un complejo para su uso según la presente invención es de aproximadamente 0,01 mg a 5 mg por inyección, en particular de aproximadamente 0,1 mg a 2 mg por inyección, o de aproximadamente 0,01 nmol a 1 mmol por inyección, en particular de 1 nmol a 1 mmol por inyección, preferiblemente de 1 μ mol a 1 mmol por inyección.

Típicamente, para el tratamiento del cáncer, la dosis terapéuticamente efectiva de una célula presentadora de antígeno cargada con un complejo para su uso según la presente invención es de aproximadamente 0,2 millones de células a 2 millones de células por inyección.

10 *Terapia de combinación*

- 15 La administración del complejo para su uso según la presente invención, de la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, de la composición inventiva, de la composición farmacéutica inventiva o de la vacuna inventiva en los métodos y usos según la invención pueden llevarse a cabo sola o en combinación con un coagente útil para tratar y/o estabilizar el glioma, en particular el glioblastoma.

- 20 Por ejemplo, en el caso del tratamiento, la prevención o la estabilización de un glioma, en particular un glioblastoma, la administración de las composiciones farmacéuticas en los métodos y usos de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo en combinación con sustancias utilizadas en la quimioterapia convencional dirigida contra tumores sólidos y para controlar el establecimiento de metástasis o con cualquier otra molécula que actúe desencadenando la muerte celular programada, por ejemplo un coagente seleccionado entre miembros de la familia de necrosis tumoral incluyendo, sin imitarse a, ligando Fas y ligando de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TNF). Según una realización adicional, la administración del complejo para su uso según la presente invención, de la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, de la composición inventiva, de la composición farmacéutica inventiva o de la vacuna inventiva en los métodos y usos según la presente invención se puede llevar a cabo en paralelo a la radioterapia.

- 30 La invención abarca la administración del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, de la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para uso de acuerdo con la presente invención, de la composición inventiva, de la composición farmacéutica inventiva o de la vacuna inventiva, donde se administra a un sujeto antes, simultáneamente o secuencialmente con otros regímenes terapéuticos o coagentes útiles para tratar y/o estabilizar un glioma, en particular un glioblastoma, y/o para prevenir la recurrencia del glioma, en particular del glioblastoma (por ejemplo regímenes farmacológicos múltiples), en una cantidad terapéuticamente efectiva. Dicho complejo, célula, composición, vacuna o composición farmacéutica que se administra simultáneamente con dichos coagentes se puede administrar en la misma o en diferentes composiciones y por la misma o diferentes vías de administración.

Dichos otros regímenes terapéuticos o coagentes pueden seleccionarse del grupo consistente en radioterapia, quimioterapia, cirugía, terapia dirigida (incluyendo moléculas pequeñas, péptidos y anticuerpos monoclonales) y terapia antiangiogénica. La terapia antiangiogénica se define aquí como la administración de un agente que se dirige directa o indirectamente a la vasculatura asociada al tumor.

- 40 Así, la presente invención también proporciona una combinación de
 i) un complejo como se define aquí y
 ii) un agente quimioterapéutico, un fármaco dirigido y/o un agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de punto de control inmune,
 para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma.

- 45 Los agentes quimioterapéuticos tradicionales son citotóxicos, es decir, actúan matando las células que se dividen rápidamente, una de las principales propiedades de la mayoría de las células cancerosas. Los agentes quimioterapéuticos preferentes para la combinación con el complejo como se define aquí son los agentes quimioterapéuticos conocidos por el experto para el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma. Un agente quimioterapéutico preferente para la combinación es, en particular, temozolomida (TMZ).

- 50 Los fármacos dirigidos (también denominados aquí agentes dirigidos) para la combinación con el complejo como se define aquí para el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, incluyen fármacos dirigidos a VEGF, fármacos dirigidos a EGFR, fármacos dirigidos a PDGFR, fármacos dirigidos a m-TOR,

fármacos dirigidos a PKC, fármacos dirigidos a RAF-MEK-ERK y fármacos dirigidos a integrinas. Ejemplos preferentes de medicamentos dirigidos a VEGF incluyen bevacizumab (Avastin®), VEGF trap, Vatalinib, Vandetanib, Cediranib, Sunitinib y Pazopanib, siendo el Bevacizumab (Avastin®) particularmente preferente. Ejemplos preferentes de fármacos dirigidos a EGFR incluyen Cetuximab (Erbix®), Gefitinib, Erlotinib, Lapatinib, Canertinib, Pelitinib y BIBW-2992. Ejemplos preferentes de fármacos dirigidos a PDGFR incluyen Imatinib mesilato y Tivantinib. Ejemplos preferentes de fármacos dirigidos a mTOR incluyen Sirolimus, Temsirolimus, Everolimus y AP23573. Ejemplos preferentes de fármacos dirigidos a PKC incluyen Enzastaurin. Ejemplos preferentes de fármacos dirigidos a RAF-MEK-ERK incluyen Tipifarnib, Lonaferin y Sorafenib. Ejemplos preferentes de fármacos dirigidos a integrinas incluyen en particular Cilengitide. Los ejemplos preferentes de fármacos dirigidos incluyen fármacos dirigidos a VEGF y fármacos dirigidos a EGFR.

Los agentes inmunoterapéuticos para la combinación con el complejo como se define aquí para el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, incluyen vacunas, receptores de antígeno quimérico (CAR), moduladores de puntos de control y terapias virales oncolíticas.

Las vacunas preferentes para la combinación con el complejo como se define aquí para el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, incluyen CDX-110, HSPPC-96, DCVax®-Brain, ICT-107, GMB-Vax, ERC1671, TVI-Brain-1, SL-701, ICT121, NeoVax, ADU-623 e IMA950.

Los receptores de células T artificiales (también conocidos como receptores de células T quiméricas, inmunorreceptores quiméricos, receptores de antígeno quimérico (CAR)) son receptores diseñados por ingeniería genética que injertan una especificidad arbitraria en una célula efectora inmune. Los receptores de células T artificiales (CAR) son preferentes en el contexto de la transferencia de células adoptivas. Para ello, las células T se extraen de un paciente y se modifican para que expresen receptores específicos para el glioma, en particular el glioblastoma. Las células T, que luego pueden reconocer y matar las células cancerosas, se reintroducen en el paciente. CAR preferentes son las dianas de Her-2 o EGFRvIII.

Como se usa aquí, el término "modulador de punto de control inmune" (también denominado "modulador de punto de control") se refiere a una molécula o un compuesto que modula {por ejemplo, reduce total o parcialmente, inhibe, interfiere, activa, estimula, aumenta, refuerza o apoya} la función de una o más moléculas de punto de control. Por tanto, un modulador de punto de control inmunitario puede ser un "inhibidor del punto de control inmunitario" (también denominado "inhibidor del punto de control" o "inhibidor") o un "activador del punto de control inmunitario" (también denominado "activador del punto de control" o "activador"). Un "inhibidor de punto de control inmune" (también denominado "inhibidor de punto de control" o "inhibidor") reduce total o parcialmente, inhibe, interfiere o modula negativamente la función de una o más moléculas de punto de control. Un "activador de punto de control inmune" (también denominado "activador de punto de control" o "activador") activa, estimula, aumenta, refuerza, apoya o modula positivamente la función de una o más moléculas de punto de control total o parcialmente. Los moduladores del punto de control inmunitario son típicamente capaces de modular (i) la auto tolerancia y/o (ii) la amplitud y/o la duración de la respuesta inmune. Preferiblemente, el modulador de punto de control inmune usado según la presente invención modula la función de una o más moléculas de punto de control humano y, por tanto, es un "inhibidor del punto de control humano".

Las moléculas de punto de control son moléculas, tales como proteínas, típicamente involucradas en las vías inmunes y, por ejemplo, regulan la activación de las células T, la proliferación de las células T y/o la función de las células T. En consecuencia, la función de las moléculas del punto de control, que está modulada (por ejemplo, total o parcialmente reducida, inhibida, interferida, activada, estimulada, aumentada, reforzada o apoyada) por los moduladores del punto de control, es típicamente la (regulación de) activación de células T, la proliferación de células T y/o la función de células T. Las moléculas de punto de control inmunitario regulan y mantienen la auto tolerancia y la duración y amplitud de las respuestas inmunes fisiológicas. Muchas de las moléculas de control inmunitario pertenecen a la familia B7:CD28 o a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y, mediante la unión de ligandos específicos, activan las moléculas de señalización que son reclutadas en el ADN citoplasmático (Susumu Suzuki et al., 2016: Current status of immunotherapy. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2016: doi: 10.1093/jcco/hyv201; [Epub delante de print]; en particular tabla 1).

Preferentemente, el modulador de punto de control inmunitario para la combinación con el complejo como se define aquí para el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, es un activador o inhibidor de una o más moléculas de punto de control inmunitario seleccionadas de CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR, ICOS, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, PD-1, TIM-3, VISTA, CEACAM1, GARP, PS, CSF1R, CD94/NKG2A, TDO, GITR, TNFR y/o FasR/DcR3; o un activador o un inhibidor de uno o más ligandos de las mismas.

Más preferiblemente, el modulador del punto de control inmune es un activador de una molécula de punto de control (co-)estimulante o un inhibidor de una molécula inhibitoria de punto de control o una combinación de los mismos. En consecuencia, con mayor preferencia, el modulador del punto de control inmunitario es (i) un activador de CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR y/o ICOS o (ii) un inhibidor de A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, PD-1, PDL-1, PD-L2, TIM-3, VISTA, CEACAM1, GARP, PS, CSF1R, CD94/NKG2A, TDO, TNFR y/o FasR/DcR3.

Incluso más preferiblemente, el modulador de punto de control inmune es un inhibidor de una molécula de punto de control inhibitoria (pero preferiblemente ningún inhibidor de una molécula de punto de control estimulante). En consecuencia, el modulador del punto de control inmunitario es incluso más preferiblemente un inhibidor de A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, PD-1, PDL-1, PD-L2, TIM-3, VISTA, CEACAM1, GARP, PS, CSF1R, CD94/NKG2A, TDO, TNFR y/o DcR3 o de un ligando de los mismos.

También es preferente que el modulador del punto de control inmune sea un activador de una molécula de punto de control estimulante o coestimuladora (pero preferiblemente no un activador de una molécula de punto de control inhibitoria). Por consiguiente, el modulador del punto de control inmunitario es, con mayor preferencia, un activador de CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR y/o ICOS o de un ligando de los mismos.

Es particularmente preferente que el modulador del punto de control inmunitario sea un modulador de la ruta CD40, de la ruta IDO, de la ruta CTLA-4 y/o de la ruta PD-1. En particular, el modulador del punto de control inmunitario es preferiblemente un modulador de CD40, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO, en especial el modulador del punto de control inmunitario es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO o un activador de CD40, incluso más preferiblemente el modulador del punto de control inmunitario es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-1 y/o IDO y con total preferencia el modulador de punto de control inmunitario es un inhibidor de CTLA-4 y/o PD-1.

En consecuencia, el modulador de punto de control para la combinación con el complejo como se define aquí para el tratamiento del del glioma, en particular del glioblastoma, puede seleccionarse de moduladores conocidos de la ruta CD40, la ruta CTLA-4 o la ruta PD-1. Inhibidores preferentes de la ruta CTLA-4 y de la ruta PD-1 incluyen los anticuerpos monoclonales Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y Tremelimumab (Pfizer/MedImmune), así como Opdivo® (Nivolumab; Bristol Myers Squibb), Keytruda® (Pembrolizumab; Merck), Durvalumab (MedImmune/AstraZeneca), MEDI4736 (AstraZeneca; véase WO 2011/066389 A1), MPDL3280A (Roche/ Genentech; véase US 8.217.149 B2), Pidilizumab (CT-011; CureTech), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), MSB-0010718C (Merck), MIH 1 (Affymetrix) y Lambrolizumab (por ejemplo, descrito como hPD109A y sus derivados humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en WO2008/156712; Hamid et al., 2013; N. Engl. J. Med. 369: 134-144). Los inhibidores de punto de control especialmente preferentes incluyen los inhibidores de CTLA-4 Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y Tremelimumab (Pfizer/MedImmune), así como los inhibidores PD-1 Opdivo® (Nivolumab; Bristol Myers Squibb), Keytruda® (Pembrolizumab; Merck), Pidilizumab (CT-011; CureTech), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), AMP-224 y Lambrolizumab (por ejemplo, descrito como hPD109A y sus derivados humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en WO2008/156712; Hamid O. et al., 2013; N. Engl. J. Med. 369: 134-144).

También es preferente que el modulador de punto de control inmunitario para la combinación con el complejo como se define aquí para el tratamiento del del glioma, en particular del glioblastoma, se seleccione del grupo consistente en Pembrolizumab, Ipilimumab, Nivolumab, y MEDI4736.

Los virus oncolíticos se diseñan por ingeniería genética para causar lisis celular al replicarse en tumores, activando así una respuesta inmune antitumoral. Una terapia de virus oncolíticos para la combinación con el complejo como se define aquí para el tratamiento del del glioma, en particular del glioblastoma, se selecciona preferiblemente del grupo consistente en Toca 511 (Toca FC, retrovirus), AdV-tk (adenovirus), ParvOryx (autonomous parvovirus), DNX-2401 (adenovirus), INXN-2001 (adenovirus), M032 (NSC 733972, virus del Herpes simplex), HSV-1716 (virus del Herpes simplex), G207 (virus del Herpes simplex), MV-CEA (virus del sarampión), PVSRIPO (poliovirus) y reovirus de tipo salvaje.

Preferentemente, (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de punto de control inmunitario, se administran aproximadamente al mismo tiempo.

"Aproximadamente al mismo tiempo", tal como se usa aquí, significa en particular la administración simultánea o directamente después de la administración de (i) el agente quimioterapéutico, el fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de punto de control inmunitario, (ii) el complejo es administrado o directamente después de la administración de (i) el complejo (ii) se administra el agente quimioterapéutico, el

fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de punto de control inmunitario. El experto comprende que "inmediatamente después" incluye el tiempo necesario para preparar la segunda administración, en particular el tiempo necesario para exponer y desinfectar la ubicación de la segunda administración, así como la preparación adecuada del "dispositivo de administración" (por ejemplo, jeringa, bomba, etc.). La administración simultánea también abarca el que los períodos de administración de (i) el complejo y de (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, como un modulador del punto de control inmunitario, se superpongan o si, por ejemplo, un componente se administra durante un período de tiempo más largo, como 30 min, 1 h, 2 h o incluso más, por ejemplo por infusión, y el otro componente se administra en algún momento durante este largo período. Con particular preferencia, la administración de (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador del punto de control inmunitario, es al mismo tiempo, en particular si se emplean diferentes vías de administración y/o puntos de administración diferentes.

También es preferente que (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de punto de control inmunitario, se administren consecutivamente. Esto significa que (i) el complejo se administra antes o después que (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de punto de control inmune. En la administración consecutiva, el tiempo entre la administración del primer componente y la administración del segundo componente es preferiblemente no más de una semana, en especial no más de 3 días, incluso más preferiblemente no más de 2 días y en particular no más de 24 h. Es particularmente preferente que (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, como un modulador de punto de control inmunitario, se administren el mismo día dejando un tiempo entre la administración del primer componente (el modulador de punto de control del complejo) y la administración del segundo componente (el otro del modulador de punto de control y el complejo), preferiblemente no más de 6 horas, más preferiblemente no más de 3 horas, incluso más preferiblemente no más de 2 horas y en particular no más de 1 h.

Preferiblemente, (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de punto de control inmunitario, se administran por la misma vía de administración. También se prefiere que (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de punto de control inmune, se administren por diferentes vías de administración.

Además, (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de punto de control inmunitario, se proporcionan preferiblemente en composiciones distintas. Alternativamente, (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco dirigido y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de punto de control inmunitario, se proporcionan preferiblemente en la misma composición.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un complejo para su uso de acuerdo con la invención o una célula para su uso de acuerdo con la invención, en particular una célula presentadora de antígeno para su uso de acuerdo con la invención, combinada con al menos un coagente útil para tratar y/o estabilizar un glioma y/o prevenir la recaída del glioma, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además, el complejo para su uso según la presente invención, la célula, tal como la célula presentadora de antígeno, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica de la invención o la vacuna de la invención se pueden administrar después de una cirugía en la que se han eliminado tumores sólidos como profilaxis contra recaídas y/o metástasis.

Además, la administración de la composición de imagen o diagnóstico en los métodos y usos de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo sola o en combinación con un coagente útil para obtener imágenes y/o diagnosticar el glioma, en particular el glioblastoma.

Sujetos

La presente invención se puede aplicar a cualquier sujeto que padezca de glioma, en particular glioblastoma, o en riesgo de desarrollar glioma, en particular glioblastoma. En particular, el efecto terapéutico de dicho complejo puede ser provocar una respuesta inmune dirigida contra dichos antígenos o epítomos antigénicos, en particular una respuesta que depende de las células T helper CD4⁺ y/o de las células T citotóxicas CD8⁺ y/o que está restringido por moléculas MHC de clase I y/o moléculas MHC de clase II. También es preferente que los sujetos según la invención hayan sido sometidos a una extirpación quirúrgica de un tumor.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas aquí. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las aquí descritas, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas.

- 5 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

A continuación se describen brevemente las figuras adjuntas. Las figuras están destinadas a ilustrar la presente invención con más detalle. Sin embargo, no están destinados a limitar el objeto de la invención de ninguna manera.

- Figura 1: muestra, para el Ejemplo 1, la expresión del marcador de activación CD40 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos de sangre humana de una sola capa leucocitaria o buffy. Las DC se estimularon con 300 nM de EDAZ13Mad5, Z13Mad5, Mad5 o 25ng/ml de LPS durante 48 h. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición (el isotipo no se muestra en la Fig. 1) (un experimento).
- Figura 2: muestra, para el Ejemplo 1, la expresión del marcador de activación CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos de sangre humana a partir de una sola capa leucocitaria o buffy. Las DC se estimularon con 300 nM de EDAZ1 3Mad5, Z13Mad5, Mad5 o 25 ng/ml de LPS durante 48 h. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición (el isotipo no se muestra en la Fig. 2) (un experimento).
- Figura 3: muestra, para el Ejemplo 1, la expresión del marcador de activación HLADR por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos de sangre humana a partir de una sola capa leucocitaria o buffy. Las DC se estimularon con 300 nM de EDAZ1 3Mad5, Z1 3Mad5, Mad5 o 25ng/ml de LPS durante 48 h. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición (el isotipo no se muestra en la Fig. 3) (un experimento).
- Figura 4: muestra, para el Ejemplo 1, la expresión del marcador de activación CD83 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos de sangre humana de una sola capa leucocitaria o buffy. Las DC se estimularon con 300 nM de EDAZ1 3Mad5, Z1 3Mad5, Mad5 o 25 ng/ml de LPS durante 48 h. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición (el isotipo no se muestra en la Fig. 4) (un experimento).
- Figura 5: muestra, para el Ejemplo 2, la presentación cruzada funcional restringida a MHC clase I en un sistema *in vitro* murino usando células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) y esplenocitos de diferentes ratones transgénicos TCR. Para ello fin, las BMDC se cargaron durante la noche con 300 nM de EDAZ13Mad5, EDAMad5 o Mad5. La presentación restringida eficiente de MHC clase I del epítipo OVACD8 y el epítipo gp100 se controló después de 4 días con células OT1 marcadas con CFSE y células P-Mel respectivamente. Se monitorizó la presentación eficiente de MHC clase I con restricción del epítipo OVACD4 después de 4 días con células OT2 marcadas con CFSE. Como control, los BMDC se pulsaron durante 1 h con péptido 5uM (un experimento representativo de 2 experimentos individuales).
- Figura 6: muestra los resultados para los grupos de 2 nmol del Ejemplo 3. Los ratones C57BL/6 se vacunaron dos veces (Wk0 y Wk2) con 2 nmol de EDAMad5 o EDAZ1 3Mad5. El grupo de control positivo fue vacunado con Mad5 y MPLA (equimolar a EDA). Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó la tinción con pentámero (3-4 ratones por grupo, un experimento).
- Figura 7: muestra los resultados para los grupos de 10 nmol del Ejemplo 3. Los ratones C57BL/6 se vacunaron dos veces (Wk0 y Wk2) con 10 nmol de EDAMad5 o EDAZ1 3Mad5. El grupo de control positivo fue vacunado con Mad5 y MPLA (equimolar a EDA). Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó la tinción con pentámero (3-4 ratones por grupo, un experimento).
- Figura 8: muestra, para el Ejemplo 3, el porcentaje de células T CD8⁺ pentaméricas positivas para todos los grupos analizados. Los ratones C57BL/6 se vacunaron dos veces (Wk0 y Wk2) con 2 nmol o 10 nmol de EDAMad5 o EDAZ1 3Mad5. El grupo de control positivo fue vacunado con Mad5 y MPLA (equimolar a EDA). Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó la tinción con pentámero (un experimento con 3-4 ratones por grupo).
- Figura 9: muestra, para el Ejemplo 4, el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); *, p < 0,05 EDAZ13Mad5 versus grupo control (prueba de Anova de 2 vías). Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3x10⁵ células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) por inyección subcutánea de 10 nmol de EDAZ1 3Mad5, EDAMad5, Mad5 o Mad5 y MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.
- Figura 10: muestra, para el Ejemplo 4, las curvas de crecimiento tumoral individuales (7 ratones individuales por grupo). Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3x10⁵ células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) por inyección subcutánea de 10 nmol de EDAZ13Mad5, EDAMad5, Mad5 o Mad5 y MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

Figura 11: muestra, para el Ejemplo 4, (A) la curva de supervivencia de 7 ratones por grupo; *, $p < 0,05$ para EDZ13Mad5 versus grupo control (prueba de rango logarítmico) y (B) la curva de progresión libre de tumor de 7 ratones por grupo; *, $p < 0,05$ para EDZ13Mad5 versus grupo de control (prueba de rango logarítmico).

5 Figura 12: muestra, para el ejemplo 5, el número de metástasis para cada grupo experimental. Se implantaron a ratones C57BL/6 i.v. 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA y se vacunaron dos veces (d0 y d9) por inyección subcutánea de 2 nmol de EDZ13Mad5, EDAMad5 o Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) o MPLA solo s.c. en el flanco derecho. Los ratones se sacrificaron el día 13 y se recuperaron los pulmones. Se contó el número de focos de metástasis en cada pulmón. **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$ (prueba T no pareada).

10 Figura 13: muestra, para el Ejemplo 6, el número de metástasis para cada grupo experimental. Los ratones C57BL/6 se vacunaron dos veces (d-21 y d-7) por inyección subcutánea de 2 nmol de EDZ13Mad5, EDAMad5 o Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho. En el día 0, se implantaron a ratones i.v. 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA. Los ratones se sacrificaron el día 14 y se recuperaron los pulmones. Se contó el número de focos de metástasis en cada pulmón. *, $p < 0,05$. ***, $p < 0,001$ (prueba T no pareada).

15 Figura 14: muestra los resultados para el ejemplo 8. Las líneas celulares HEK-hTLR2 se sembraron en una placa plana de 96 pocillos en medio de cultivo, se estimularon con 0,3 μ M, 1 μ M o 3 μ M de AnaxaZ13Mad5 o Z13Mad5Anaxa y se incubaron a 37°C durante 24 h. El control positivo se realizó con 500 ng/ml de Pam3CSK4. (A) Se añadieron veinte microlitros de sobrenadante al medio de detección QuantiBlue® y se incubó a 37°C durante 1 h antes de la lectura OD (620 nm). (B) Cuantificación de la secreción de IL-8 (por ELISA) en el sobrenadante.

20 Figura 15: muestra los resultados para el ejemplo 9. Los ratones C57BL/6 se vacunaron dos veces (Wk0 y Wk2) con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o AnaxaZ13Mad5. Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó la tinción con pentámero (un experimento).

25 Figura 16: muestra los resultados para el ejemplo 9. Los ratones C57BL/6 se vacunaron dos veces (Wk0 y Wk2) con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o AnaxaZ13Mad5. Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó la tinción con pentámero (un experimento con 4 ratones por grupo). *, $p < 0,05$.

30 Figura 17: muestra, para el Ejemplo 10, el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM). Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) por inyección subcutánea de 10 nmol de AnaxZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa o coinyección de Z13Mad5 + Pam3CSK4 (equimolar a Anaxa) en el Flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, ****, $p < 0,0001$.

35 Figura 18: muestra, para el Ejemplo 10, las curvas de crecimiento tumoral individuales (7 ratones individuales por grupo). Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) por inyección subcutánea de 10 nmol de AnaxZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa o coinyección de Z13Mad5 + Pam3CSK4 (equimolar a Anaxa) en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

40 Figura 19: muestra, para el ejemplo 10, la curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) por inyección subcutánea de 10 nmol de AnaxZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa o coinyección de Z13Mad5 + Pam3CSK4 (equimolar a Anaxa) en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ****, $p < 0,0001$ (prueba de rango logarítmico).

45 Figura 20: muestra, para el Ejemplo 11, el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM). Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) por inyección subcutánea de 2 nmol de Hp91Z13Mad5, EDZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa, Z13Mad5EDA o Z13Mad5 y MPLA (equimolar a EDA) en el flanco derecho. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (prueba de Anova de 2 vías el día 23).

50 Figura 21: muestra, para el Ejemplo 11, las curvas de crecimiento tumoral individuales (7 ratones individuales por grupo). Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) por inyección subcutánea de 2 nmol de Hp91Z13Mad5, EDZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa, Z13Mad5EDA o Z13Mad5 y MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho.

Figura 22: muestra, para el Ejemplo 11, las curvas de supervivencia de los 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (prueba log-rank).

55 Figura 23: muestra, para el Ejemplo 12, el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); ****, $p < 0,0001$ (prueba log-rank). Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EC7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (una vez d5 y otra d13) por inyección subcutánea de 0,5 nmol, 2 nmol o 10 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

60 Figura 24: muestra, para el Ejemplo 13, las respuestas de células T CD8 específicas de SIINFEKL detectadas en la sangre de ratones C57BL/6 vacunados tres veces (una vez Wk0, una vez Wk2 y una vez Wk4) s.c. i.d. o i.m. con 0,5 nmol (A) o 2nmol (B) de Z13Mad5Anaxa. Se obtuvo sangre de los ratones 7 días después de la segunda y la tercera vacunación y se realizó la tinción multimérica (un experimento con 4 ratones por grupo). *, $p < 0,05$.

- Figura 25: muestra, para el Ejemplo 13, la expresión de KLRG1 (A) y la expresión de PD-1 (B), que se analizaron en células T CD8 positivas para multímero (un experimento con 4 ratones por grupo). Brevemente, los ratones C57BL/6 fueron vacunados tres veces (una vez en Wk0, una vez en Wk2 y una vez en Wk4) s.c, i.d. o i.m. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Se obtuvo sangre de los ratones 7 días después de la segunda y la
- 5 tercera vacunación y se realizó la tinción con FACS.
- Figura 26: muestra, para el Ejemplo 14, la respuesta de las células T CD8 específicas de SIINFEKL en ratones C57BL/6 vacunados dos veces (una Wk0 y otra Wk2) vía intranodal con 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa. Se obtuvo sangre de los ratones 7 días después de la segunda vacunación y se realizó una tinción con multímero (3 ratones por grupo).
- 10 Figura 27: muestra, para el Ejemplo 15, el porcentaje de células pentaméricas positivas entre las células T CD8 (A y B; *, $p < 0,05$) y la media geométrica de KLRG1 de las células T CD8 pentaméricas positivas (C y D). Brevemente, los ratones C57BL/6 se vacunaron 3 veces (A y C: Wk0, Wk2 y Wk4; B y D: Wk0, Wk2 y Wk8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó la tinción con pentámero (un experimento con 4 ratones por grupo).
- 15 Figura 28: muestra, para el Ejemplo 15, el porcentaje de células multiméricas positivas entre las células T CD8 (A y D); la media geométrica de KLRG1 de células T CD8 multímeras positivas (B y E) la media geométrica de PD1 de células T CD8 multímeras positivas (C y F). Los ratones A-C C57BL/6 se vacunaron 3 veces el día 0, 3 y 7 y se desangraron el día 7 y 14. Los ratones D-F, C57BL/6 se vacunaron 3 veces el día 0, 7 y 14 y se desangraron el día 14 y 21. La vacunación se realizó s.c. con 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa. La
- 20 tinción multimérica se realizó en muestras de sangre (un experimento con 4 ratones por grupo).
- Figura 29: muestra, para el Ejemplo 16, la secreción de IL-6 que indica la activación de APC después de la incubación de BMDC con diversos constructos tal como se indica en la Figura. Brevemente, los BMDC se sembraron en una placa plana de 96 pocillos en un medio de cultivo, se estimularon con 1 μ M de Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa, Z13Mad5, EDAZ13Mad5 o EDAMad5 y se incubaron durante 24 horas a 37°C.
- 25 La secreción de IL-6 se cuantificó por ELISA en el sobrenadante. Media + SEM de 2 a 3 experimentos individuales.
- Figura 30: muestra, para el Ejemplo 16, la secreción de TNF- α , que indica la activación de APC después de la incubación de células Raw 264.7 con diversos constructos tal como se indica en la Figura. En resumen, se sembraron células Raw 264.7 en una placa plana de 96 pocillos en un medio de cultivo, se estimularon con
- 30 1 μ M de Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa o Z13Mad5 y se incubaron durante 24 h a 37°C. La secreción de TNF- α se cuantificó por ELISA en el sobrenadante. Media \pm SEM de 2 a 3 experimentos individuales.
- Figura 31: muestra, para el Ejemplo 17, la secreción de IL-8 que indica la unión de TLR4 después de la incubación de células HEK-hTLR4 con diversos constructos tal como se indica en la Figura. Brevemente, se sembraron HEK-hTLR4 en una placa plana de 96 pocillos en un medio de cultivo, se estimularon con 1 μ M de
- 35 Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa, Z13Mad5, EDAZ13Mad5 o EDAMad5 y se incubaron 24 h a 37°C. La secreción de IL-8 se cuantificó por ELISA en el sobrenadante. Media \pm SEM de 2 experimentos individuales.
- Figura 32: muestra, para el Ejemplo 18, el número de metástasis en un modelo de metástasis pulmonar con ajustes semiterapéuticos. Brevemente, se implantaron a ratones C57BL/6 i.v. 1 $\times 10^5$ células tumorales de melanoma B16-OVA y se vacunaron dos veces (d0 y d9) por inyección subcutánea de 2 nmol de EDAZ13Mad5,
- 40 Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) o MPLA solo s.c. en el flanco derecho. Los ratones se sacrificaron el día 13 y se recuperaron los pulmones. Se contó el número de focos de metástasis en cada pulmón. **, $p < 0,01$ (Anova de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey).
- Figura 33: muestra, para el Ejemplo 19, el número de metástasis en un modelo de metástasis pulmonar con ajustes semiterapéuticos. Brevemente, se implantaron a ratones C57BL/6 i.v. 1 $\times 10^5$ células tumorales de melanoma B16-OVA y se vacunaron dos veces (d0 y d9) por inyección subcutánea de 0,5 nmol de
- 45 Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa o Z13Mad5 + Pam3CSK4 (equimolar a Anaxa) s.c. en el flanco derecho. Los ratones se sacrificaron el día 21 y se recuperaron los pulmones. Se contó el número de focos de metástasis en cada pulmón. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (prueba t no pareada).
- Figura 34: muestra, para el Ejemplo 20, la cuantificación de células T CD8 específicas de SIINFEKL en un modelo de glioblastoma Quad-GI261. En resumen, se implantaron a ratones C57BL/6 i.c. 5 $\times 10^5$ células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y d21) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o
- 50 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. Las células T CDS específicas de SIINFEKL se cuantificaron en sangre y en BIL el d28 mediante tinción con multímeros (5-8 ratones por grupo).
- Figura 35: muestra, para el Ejemplo 20, la secreción de citoquinas. Brevemente, se implantaron a ratones C57BL/6, i.c. 5 $\times 10^5$ células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y 21) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. Las BIL se aislaron y se cultivaron durante 6 h con BMDC maduras cargadas o no con péptido SIINFEKL en presencia de BrefeldinA antes de la tinción intracelular para citocinas. % de células T CD8 que secretan citocinas (5-8 ratones por
- 55 grupo).
- Figura 36: muestra, para el Ejemplo 21, el efecto de Z13Mad5Anaxa sobre la supervivencia en el modelo de glioblastoma Quad-GI261. Brevemente, se implantaron a ratones C57BL/6, i.c. 5 $\times 10^5$ células tumorales GI261-Quad y se vacunaron tres veces (d7, d21 y d35) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Los
- 60 ratones se pesaron diariamente y se sacrificaron cuando la pérdida de peso alcanzó más del 15%.

Figura 37: muestra, para el Ejemplo 22, el efecto de Z13Mad5Anaxa sobre el crecimiento tumoral y la supervivencia en el modelo tumoral subcutáneo EG7-OVA en un entorno profiláctico. Brevemente, los ratones C57BL/6 fueron vacunados dos veces (d-21 y d-7) s.c. por inyección de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho y luego implantados el día 0 s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo. El tamaño del tumor se midió con un calibrador. (A) Crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media + SEM); ****, $p < 0,0001$ (prueba Anova de 2 vías en el día 30). (B) Curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.). ***, $p < 0,001$ (prueba log-rank).

Figura 38: muestra, para el Ejemplo 23, el efecto de Z13Mad5Anaxa sobre el crecimiento tumoral y la supervivencia en un modelo tumoral subcutáneo de B1 6-OVA en un contexto terapéutico en un tumor establecido. Brevemente, se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 1×10^5 16-OVA células tumorales en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d14 y d21) s.c. por inyección de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. (A) Crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); *, $p < 0,05$ (prueba Anova de 2 vías en el día 32). (B) Curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.).

Figura 39: muestra, para el Ejemplo 24, el efecto de la CPP en Z13Mad5Anaxa sobre el crecimiento tumoral y la supervivencia en el modelo tumoral subcutáneo EG7-OVA. Brevemente, se implantaron a ratones C57BL/6 el día 0 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y luego se vacunaron dos veces (d5 y d13) s.c. por inyección de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa o Mad5Anaxa en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador. (A) Crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media + SEM); ****, $p < 0,0001$. (B) Curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.). **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Figura 40: muestra, para el Ejemplo 25, el efecto de los complejos con diferentes CPP en la respuesta inmune. Los ratones C57BL/6 se vacunaron cinco veces (Wk0, Wk2, Wk4, Wk6 y Wk8) s.c. con 2 nmol (A) o 0,5 nmol (B) de Z13Mad5Anaxa, Z14Mad5Anaxa o Z18Mad5Anaxa. Los ratones se desangraron 7 días después de la 2ª, 3ª, 4ª y 5ª vacunación y se realizó la tinción multimérica (un experimento con 4 ratones por grupo). *, $p < 0,05$ entre ratones vacunados versus naive en cada punto de tiempo, excepto después de Vac2 para ratones vacunados con Z18Mad5Anaxa.

Figura 41: muestra, para el Ejemplo 26, el efecto de los complejos con diferentes CPP en las células T CD8 del bazo (A), el drenaje de los ganglios linfáticos (B) y la médula ósea (C). Los ratones C57BL/6 fueron vacunados cinco veces (Wk0, Wk2, Wk4, Wk6 y Wk8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa. Nueve días después de la vacunación 5ª, se sacrificaron los ratones, se recuperaron los órganos y se realizó la tinción multimérica.

Figura 42: Muestra, para el Ejemplo 26, el efecto de los complejos con diferentes CPP en las células T del bazo (respuesta de células T CD8 (A) y respuesta de células R CD4 (B)). Los ratones C57BL/6 fueron vacunados cinco veces (Wk0, Wk2, Wk4, Wk6 y Wk8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa. (A) nueve días después de la 5ª vacunación, se realizó el ensayo Elispot en células de bazo estimuladas con el péptido SIINFEKL OVACD8. (B) nueve días después de la 5ª vacunación, se realizó el ensayo Elispot en células de bazo estimuladas con péptido OVACD4.

Figura 43: muestra, para el Ejemplo 26, el efecto de los complejos con diferentes CPP en la función efectora de las células T CD8. Los ratones C57BL/6 fueron vacunados cinco veces (Wk0, Wk2, Wk4, Wk6 y Wk8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa. Nueve días después de la 5ª vacuna, se realizó la tinción intracelular en células de bazo estimuladas con péptido SIINFEKL OVACD8.

Figura 44: muestra, para el Ejemplo 27, el efecto de los complejos con diferentes CPP sobre el crecimiento tumoral (A) y las tasas de supervivencia (B). Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) s.c. por inyección de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa en el flanco derecho. (A) Crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,0001$ (prueba de Anova de 2 vías el día 28). (B) Curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (prueba de rango logarítmico).

Figura 45: muestra, para el Ejemplo 28, el efecto de los complejos con diferentes CPP en la respuesta inmune. Los ratones C57BL/6 fueron vacunados tres veces (Wk0, Wk2 y Wk4) s.c. con 2 nmol (A) o 0,5 nmol (B) de EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5 o EDAZ18Mad5. Los ratones se desangraron 7 días después de la 3ª vacunación y se realizó la tinción multimérica (un experimento con 4 ratones por grupo). *, $p < 0,05$.

Figura 46: muestra, para el Ejemplo 29, el efecto de EDAZ14Mad5 sobre el crecimiento tumoral (A) y las tasas de supervivencia (B). Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) s.c. por inyección de 2 nmol de EDAZ14Mad5 en el flanco derecho. Panel izquierdo: crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); **, $p < 0,01$ (prueba Anova de 2 vías el día 27). Panel derecho: curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.).

Figura 47: muestra, para el Ejemplo 30, la cuantificación de células T CD8 específicas de SIINFEKL en un modelo de glioblastoma Quad-Gl261. En resumen, se implantaron a ratones C57BL/6 i.c. 5×10^5 células tumorales Gl26 -Quad y se vacunaron dos veces (d7 y 21) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. Las células T CD8 específicas de SIINFEKL se cuantificaron en sangre y en BIL en d28 mediante tinción multimérica (7-16 ratones por grupo).

Figura 48: muestra, para el Ejemplo 30, la secreción de citoquinas. Brevemente, se implantaron a ratones C57BL/6 i.c. 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y 21) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. Las BIL se aislaron y se cultivaron durante 6 h con BMDC maduras cargadas o no con péptido SIINFEKL en presencia de BrefeldinA antes de la tinción intracelular para citocinas. % de células T CD8 que secretan citocinas (7-16 ratones por grupo).

Figura 49: muestra, para el Ejemplo 31, el efecto de Z13Mad8Anaxa sobre las células T en el bazo (respuesta de células T CD8 (A) y respuesta de células T CD4 (B)). Los ratones C57BL/6 fueron vacunados cuatro veces (Wk0, Wk2, Wk4 y Wk6) s.c. con 2 nmol de Z13Mad8Anaxa. (A) una semana después de la 4ª vacunación, se realizó el ensayo Elispot con células del bazo estimuladas con péptido gp70CD8. (B) una semana después de la 4ª vacunación, se realizó el ensayo Elispot en células de bazo estimuladas con péptido gp70CD4.

Figura 50: muestra, para el Ejemplo 32, el efecto de Z13Mad11Anaxa sobre el número de metástasis en el modelo de metástasis pulmonar B16 (A) y sobre la respuesta de las células T en el bazo (B). Los ratones C57BL/6 se vacunaron dos veces (día 0, día 10) s.c. con 1 nmol de Z13Mad11Anaxa.

Figura 51: muestra, para el Ejemplo 33, el efecto de Z13Mad9Anaxa sobre las células T en el bazo (respuesta de células T CD8). Los ratones C57BL/6 fueron vacunados cuatro veces (Wk0, Wk2, Wk4 y Wk6) s.c. con 2 nmol de Z13Mad9Anaxa. Una semana después de la 4ª vacunación, se realizó el ensayo Elispot en células de bazo estimuladas con péptido adpgk.

Figura 52: muestra, para el Ejemplo 34, el efecto de complejos con diferentes CPP sobre la respuesta inmune. Los ratones C57BL/6 se vacunaron dos veces (Wk0 y Wk2) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o TatFMad5Anaxa. Los ratones fueron desangrados 7 días después de la 2ª vacunación y se realizó la tinción multimérica (un experimento con 8 ratones por grupo).

Figura 53: muestra, para el Ejemplo 35, la cuantificación de células T CD8 específicas de SIINFEKL en ratones naive. Brevemente, los ratones C57BL/6 fueron vacunados una vez (día 0) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (grupo "Z13Mad5Anaxa") o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa (grupo "Z13Mad5 + Anaxa"). Las células T CD8 específicas de SIINFEKL se cuantificaron en sangre el d7 mediante tinción multimérica (4-8 ratones por grupo).

Figura 54: muestra, para el Ejemplo 36, el efecto de Z13Mad12Anaxa sobre las células T en sangre (respuesta de células T CD8). Los ratones C57BL/6 se vacunaron dos veces (Wk0 y Wk2) s.c. con 2 nmol de Z13Mad12Anaxa. Una semana después de la segunda vacunación, se realizó una tinción multimérica para el neoantígeno reps1 en las células sanguíneas.

Figura 55: muestra, para el Ejemplo 37, la expresión del marcador de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 (de izquierda a derecha) por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos de sangre humana a partir de un solo buffy. Las CD se estimularon con 300 nM de Z13Mad5Anaxa (paneles inferiores) o Z13Mad5 (paneles superiores) durante 48 h. La tinción del isotipo para cada condición también se realizó como se muestra.

Ejemplos

A continuación, se muestran ejemplos particulares que ilustran diversas realizaciones y aspectos de la invención. Sin embargo, la presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas aquí. Las siguientes preparaciones y ejemplos se ofrecen para permitir al experto en la materia comprender más claramente y llevar a la práctica la presente invención. La presente invención, sin embargo, no está limitada en su alcance por las realizaciones ilustradas, que pretenden ser solo ejemplos de aspectos únicos de la invención y los de métodos funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las aquí descritas, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior, las figuras que se acompañan y los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1: maduración *in vitro* de células dendríticas humanas

El objetivo de este estudio era investigar la capacidad de un complejo para su uso según la presente invención para inducir la maduración de células dendríticas. En el presente estudio, el complejo para su uso según la presente invención es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", una proteína "MAD5", consistente en diferentes epítopos CD8* y CD4* de varios antígenos, y el péptido agonista de TLR4 "EDA". Así, se diseñó una proteína fusionada con el péptido EDA en posición N-terminal y diferentes proteínas conjugadas de control sin Z13 o EDA o sin ambas.

A saber, se diseñaron los siguientes constructos, donde en la secuencia de aminoácidos el péptido de penetración celular "Z13" se muestra subrayado y el péptido agonista de TLR "EDA" se muestra en cursiva:

EDAZ13Mad5

Secuencia:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI
RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKSR
AKFKQLLQHY REVAAKSSE NDRLRLLLKE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV
PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFELTE WTGS

[SEQ ID NO: 26]

Peso molecular 25.057 Da

Características:

- 5 – La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalphaCD4 y OVACD8
- Contiene el agonista TLR de EDA (Lasarte, J.J., et al., The extra domain A from fibronectin targets antigens to TLR4expressing cells and induces cytotoxic T cell responses in vivo. J Immunol, 2007. 178(2): p. 748-56)
- 10 – Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, DTT 2 mM, L-Arginina 1 M, pH 8

Z13Mad5

Secuencia:

MHHHHHHKRY KNRVASRKSR AKFKQLLQHY REVAAKSSE NDRLRLLLKE SLKISQAVHA.
AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE
SIINFELTE WTGS

[SEQ ID NO: 29]

Peso molecular: 15.196 Da

15 Características:

- La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalphaCD4 y OVACD8
- Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, DTT 2 mM, L-Arginina 1 M, pH 9
- 20 – Nivel de endotoxina:
 - Lote 1: 0,32 EU/mg
 - Lote 2: 0,44 EU/mg Mad5

Mad 5

Secuencia:

MHHHHHHE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA
QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFELTE WTGS

[SEQ ID NO: 30]

25 Peso molecular: 10.154,6 Da

Características:

- La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalphaCD4 y OVACD8
- Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, DTT 2 mM, L-Arginina 0,5 M, pH 8
- 30 – Nivel de endotoxina: 0,069EU/mg

Las proteínas EDAZ13Mad5, Z13Mad5 y Mad5 fueron investigadas por su capacidad para inducir la maduración de células dendríticas (DC) humanas. Después de la incubación durante 48 h con 300 nM de proteína, se evaluó la expresión de los marcadores de activación (CD86, CD40, CD83 y HLA-DR) en las DC humanas mediante FACS (Figuras 1-4). Se usaron tampones específicos de cada proteína como controles negativos.

35

Los resultados se muestran para CD40 en la Fig. 1, para CD86 en la Fig. 2, para HLADR en la Fig. 3 y para CD83 en la Fig. 4. Mientras que EDAZ13Mad5 indujo la maduración de las DC humanas, como lo demuestra la regulación al alza de las proteínas CD86, HLADR y CD83, Z13Mad5 y Mad5 no pudieron activar las DC

humanas. Estos resultados indican que la porción EDA de la proteína es responsable de la regulación positiva de los marcadores de activación en las CD humanas.

Ejemplo 2: presentación del epítipo *in vitro* (MHC I)

- 5 El objetivo de este estudio era evaluar la presentación cruzada funcional restringida a MHC clase I en un sistema *in vitro* murino utilizando células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) y esplenocitos de diferentes ratones transgénicos TCR. Para ello, se usaron los constructos EDAZ13Mad5 y Mad5 (descritos anteriormente en el Ejemplo 1) y el constructo EDAMad5:

EDAMad5

Secuencia

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI
RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTE SLKISQAVHA
AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE
SIINFEKLTE WTGS

- 10 [SEQ ID NO: 31]

Peso molecular: 20.017 Da

Características:

- La carga Mad5 contiene epítomos OVACD4, gp1 00CD8, EalphaCD4 y OVACD8
- Contiene agonista de EDA TLR
- 15 - Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, DTT 2 mM, L-Arginina 0,5 M, pH 8
- Nivel de endotoxina: 1,8 EU/mg

- 20 Los BMDC se cargaron durante la noche con 300 nm de las proteínas EDAMad5, EDAZ13Mad5 y Mad5 que contienen epítomos OVACD8, OVACD4 y gp100. El procesamiento y la presentación de estos epítomos OVACD8 y gp100 restringidos a MHC se monitorizaron midiendo la proliferación *in vitro* de células T CD8⁺ naive específicas de OVA₂₅₇₋₂₆₄ de ratones transgénicos que expresan el receptor de células T (TCR) OT-1 y células T CD8⁺ específicas de gp100 de ratones transgénicos TCR P-mel, respectivamente. Así, se monitorizó la presentación eficiente restringida a MHC de clase I del epítipo OVACD8 y el epítipo gp100 después de 4 días con células OT1 marcadas con CFSE y células P-Mel respectivamente. El procesamiento y la presentación
- 25 del epítipo OVACD4 restringido a MHC II se monitorizó midiendo la proliferación *in vitro* de células T CD4⁺ naive específicas de OVA₃₂₃₋₃₃₉ de ratones transgénicos que expresan el receptor de células T (TCR) OT-2. Así, se monitorizó la presentación eficiente de MHC clase II restringida del epítipo OVACD4 después de 4 días con células OT2 marcadas con CFSE. Como control, los BMDC se pulsaron durante 1 h con 5 µM de péptido (un experimento representativo de 2 experimentos individuales).

- 30 Los resultados se muestran en la Fig. 5. Se observó una capacidad de procesamiento y presentación cruzada similar de todas las proteínas basadas en Mad5 evaluadas.

Ejemplo 3: respuesta inmune de células T CD8

- 35 Para investigar la eficacia de las proteínas conjugadas con EDA en la inducción de la respuesta policlonal de células T CD8⁺, se vacunaron dos veces los ratones C57BL/6 (Wk0 y Wk2) mediante inyección subcutánea de 2 nmol o 10 nmol de los constructos EDAZ13Mad5 o EDAMad5 (descrito en los ejemplos 1 y 2). El grupo de control positivo se vacunó con Mad5 y el agonista TLR4 MPLA (equimolar a EDA). Se evaluaron dos dosis de 2 nmol del constructo (Fig. 6) y 10 nmol del constructo (Fig. 7). Se utilizaron 3 - 4 ratones por grupo.

- 40 Siete días después de la última vacunación, se sangraron los ratones y se realizó una tinción con pentámero para controlar la respuesta inmune específica de OVA en la sangre. En la Fig. 8, se muestra el porcentaje de células T CD8⁺ pentaméricas positivas para todos los grupos y se prueban ambas dosis.

Estos datos demuestran que, curiosamente, la respuesta inmune es menor a 10 nmol que con 2 nmol. En ambas dosis, 2 nmol y 10 nmol, la respuesta inmune mediada por la vacuna se observó de manera más consistente en el grupo EDAZ13Mad5, en contraste con el grupo EDAMad5. Además, hay una respuesta inmune aumentada cuando el agonista TLR4 se conjuga con la vacuna.

Ejemplo 4: eficacia de la vacuna sobre el crecimiento tumoral en un modelo tumoral de referencia EG.7-OVA

Para evaluar el efecto de los constructos de proteínas EDA en el control del crecimiento tumoral, se eligió el modelo s.c. de células de timoma EG.7-OVA. Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo. Después de la implantación del tumor, los ratones fueron vacunados los días 5 y 13 con 10 nmol de uno de los siguientes constructos (ver los ejemplos 1 y 2 para la descripción del constructo): EDAZ13Mad5, EDAMad5, Mad5 o Mad5 y MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

La Fig. 9 muestra el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 versus grupo control (prueba Anova de 2 vías). La figura 10 muestra curvas de crecimiento tumoral individuales (7 ratones individuales por grupo). Fig. 11A muestra la curva de supervivencia de 7 ratones por grupo; *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 versus grupo de control (prueba de rango logarítmico). Fig. 11B muestra la curva de progresión libre de tumor de 7 ratones por grupo; *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 versus grupo de control (prueba de rango logarítmico).

Los resultados demuestran que, en un entorno terapéutico, EDAZ13Mad5 fue la única vacuna proteica que controlaba significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control, con una curva de progresión y supervivencia sin tumor significativamente mejor.

Por tanto, los resultados sugieren que el constructo proteico EDAZ13Mad5 es una vacuna altamente potente para controlar el crecimiento tumoral en un entorno terapéutico.

Ejemplo 5: eficacia de la vacuna sobre el crecimiento tumoral en un modelo de metástasis de melanoma

Para evaluar la eficacia en un modelo de metástasis pulmonar utilizando células tumorales B16-OVA en un entorno semi-terapéutico, se utilizaron diferentes constructos proteicos: EDAMad5, EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA (ver los ejemplos 1 y 2 para el diseño de los constructos) y MPLA solo. Se implantaron a ratones C57BL/6 i.v. 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA y al mismo tiempo (d0) se administraron 2 nmol de la vacuna (EDAMad5, EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA, MPLA solo) mediante inyección subcutánea en el flanco derecho. Nueve días después, los ratones fueron vacunados por segunda vez con la misma dosis. Otros grupos de control fueron vacunados con 2 nmol de Z13Mad5 y el agonista TLR4 MPLA (equimolar a EDA) o MPLA solo. Los ratones se sacrificaron el día 13 y se recuperaron los pulmones. Se contó el número de focos de metástasis en cada pulmón. Los resultados se muestran en la Fig. 12.

Los resultados demuestran que el conjugado EDAZ13Mad5 es tan potente como Z13Mad5 + MPLA para inhibir la metástasis tumoral en el pulmón. Además, EDA-Mad5 es menos potente que EDAZ13Mad5, lo que indica un papel crucial de Z13 en la eficacia de la vacuna.

Ejemplo 6: eficacia de la vacuna en el crecimiento tumoral en un modelo de metástasis de melanoma - entorno profiláctico

Además, se evaluó la eficacia de los constructos proteicos EDAMad5, EDAZ13Mad5 y Z13Mad5 + MPLA (ver los ejemplos 1 y 2 para el diseño de los constructos) en un modelo de metástasis pulmonar en un entorno profiláctico. Se vacunaron ratones C57BL/6 21 y 7 días antes de la implantación de células tumorales (d-21 y d-7) mediante inyección subcutánea de 2 nmol de EDAZ13Mad5, EDAMad5 o Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho. El día 0, se implantaron a ratones i.v. 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA. Los ratones se sacrificaron el día 14 y se recuperaron los pulmones. Los resultados se muestran en la Fig. 13.

Ejemplo 7: Diseño de constructos adicionales que comprenden un péptido agonista de TLR

Aquí, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es nuevamente una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", la proteína "MAD5", consistente en diferentes epítomos CD8⁺ y CD4⁺ de diversos antígenos y el péptido agonista de TLR2 "Anaxa". Así, se diseñaron proteínas fusionadas con el péptido Anaxa en posición C-terminal o N-terminal.

A saber, se diseñaron los siguientes constructos, donde en la secuencia de aminoácidos el péptido de penetración celular "Z13" se muestra subrayado y el péptido agonista de TLR "Anaxa" se muestra en cursiva:

AnaxaZ13Mad5

Secuencia:

MHHHHHHSTV HEILCKLSLE GDHSTPPSAY GSVKPYTNFD AEKRYKNRVA SRKSRKFKQ
LLQHYREVAA AKSENDRLR LLLKESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD
WLGVPRAKF ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGS
[SEQ ID NO: 27]

Peso molecular: 18.973 Da

Características:

- 5 – La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalphaCD4 y OVACD8
- Contiene el péptido de 35 meros de anexina
- Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, DTT 2 mM, 0,5 M L-arginina, pH 8
- 10 – Nivel de endotoxina: 5,17 EU/mg

Z13Mad5Anaxa

Secuencia:

MHHHHHHKRYKNRVA SRKSRKFKQ LLQHYREVAA AKSENDRLR LLLKESLKIS
QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPRAKF ASFEAQGALA
NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGSS TVHEILCKLS LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE
[SEQ ID NO: 28]

Peso molecular: 18.973 Da

Características:

- 15 – La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalphaCD4 y OVACD8
- Contiene el péptido de 35 meros de anexina
- 20 – Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, DTT 2 mM, L-Arginina 0,5 M, pH 8
- Nivel de endotoxina: 3,1 UE/mg

Ejemplo 8: unión de TLR2 (líneas celulares HEK-hTLR2)

El objetivo de este estudio era evaluar si los constructos creados Z13Mad5Anaxa y AnaxaZ13Mad5 (ver el ejemplo 7 para el diseño de estos constructos proteicos) podían unirse a TLR2 como un agonista. Se sembraron HEK-Blue™ hTLR2 en una placa plana de 96 pocillos en medio de cultivo, se estimularon con 0,3 µM, 1 µM o 3 µM de AnaxaZ13Mad5 o Z13Mad5Anaxa y se incubaron a 37°C durante 24 h. El control positivo se realizó con 500 ng/ml de Pam3CSK4, un agonista de TLR2.

Para controlar la activación de NF- κB/AP1, se añadieron veinte microlitros del sobrenadante al medio de detección QuantiBlue® y se incubó a 37°C durante 1 h antes de la lectura OD (620 nm). Los resultados se muestran en la Figura 14 A.

La secreción de IL-8 en el sobrenadante se cuantificó por ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 14 B.

Los resultados (Fig. 14 A, B) demuestran que Z13Mad5Anaxa y AnaxaZ13Mad5 son igualmente capaces de unirse a TLR2 de manera dependiente de la dosis.

35 Ejemplo 9: inducción *in vivo* de células T CD8⁺ específicas

Para investigar la eficacia de las proteínas conjugadas con Anaxa del Ejemplo 7 en la inducción de respuestas de las células T CD8⁺, se vacunaron dos veces ratones C57BL/6 (Wk0 y Wk2) por inyección subcutánea de 2 nmol de AnaxaZ13Mad5 o 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Siete días después de la última vacunación, se sangraron los ratones y, para controlar la respuesta inmune específica de OVA en la sangre, se realizó la tinción con pentámero (un experimento con 4 ratones por grupo). Los resultados se muestran en las Figuras 15 y 16.

Estos datos indican que tanto la vacuna Z13Mad5Anaxa como el constructo AnaxaZ13Mad5 provocan una fuerte respuesta inmune.

Ejemplo 10: efecto terapéutico sobre el crecimiento tumoral

5 Para evaluar el efecto de los constructos proteicos conjugados con Anaxa diseñados en el Ejemplo 7 sobre el control del crecimiento tumoral, se usó un modelo tumoral de referencia, a saber, implantación de células de timoma EG.7-OVA s.c.

10 Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo. Después de la implantación del tumor, los tres grupos de 7 ratones fueron vacunados s.c. en el flanco derecho el día 5 y 13 por inyección subcutánea de 10 nmol de AnaxZ13Mad5 (grupo 1), Z13Mad5Anaxa (grupo 2) o Z13Mad5 y Pam3CSK4 (equimolar a Anaxa; grupo 3). Para comparar el efecto de una proteína mezclada con un adyuvante externo, se vacunó un grupo de control con Z13Mad5 y Pam3CSK4 (equimolar a Anaxa). El tamaño del tumor se midió con un calibrador. Los resultados se muestran en las Fig. 17 - 19.

15 En un programa terapéutico, Z13Mad5Anaxa y AnaxaZ13Mad5 son mejores vacunas proteicas para controlar el crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control, es decir, la coinyección de Z13Mad5 y Pam3CSK muestran una curva de supervivencia significativamente mejor. En particular, Z13Mad5Anaxa y AnaxaZ13Mad5 demuestran una eficacia significativamente mayor que Z13Mad5 administrado por separado con Pam3CSK4. Por tanto, los resultados sugieren que los constructos proteicos Z13Mad5Anaxa y AnaxaZ13Mad5 son vacunas conjugadas prometedoras para controlar el crecimiento tumoral en un entorno terapéutico.

20 Ejemplo 11: efecto terapéutico sobre el crecimiento tumoral - comparación de constructos con diferentes agonistas de TL

25 El objetivo de este estudio era comparar la eficacia de las diferentes vacunas de constructos proteicos conjugados con diferentes agonistas de TLR, a saber, EDAZ13Mad5 y Z13Mad5Anaxa de los ejemplos 1 y 7, en el control del crecimiento tumoral. Para ello, se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células de timoma EC.7-OVA en el flanco izquierdo como se describió previamente en el Ejemplo 10. Los ratones (7 ratones individuales por grupo) se vacunaron s.c. en el flanco derecho el día 5 y 13 con 2 nmol de EDAZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa o coinyección de Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA).

30 Los resultados se muestran en las Figuras 20, 21 y 22. En este entorno experimental, Z13Mad5Anaxa, EDAZ13Mad5 y Z13Mad5 + MPLA fueron igualmente capaces de controlar significativamente el crecimiento tumoral. Además, estos datos indican que Z13Mad5Anaxa es el mejor constructo para controlar significativamente el crecimiento tumoral y que EDAZ13Mad5 fue ligeramente mejor que Z13Mad5 + MPLA en este entorno experimental.

Ejemplo 12: efecto de la dosis de Z13Mad5Anaxa sobre el control del crecimiento tumoral

35 Para identificar la dosis óptima de la vacuna conjugada, se evaluó la capacidad de tres dosis diferentes (0,5 nmol, 2 nmol y 10 nmol) de Z13Mad5Anaxa (ver el ejemplo 7) para controlar el crecimiento tumoral. El efecto de la dosis del constructo Z13Mad5Anaxa se evaluó en el modelo s.c. de células de timoma EG.7-OVA como se describió previamente en el Ejemplo 10. Después de la implantación del tumor, los ratones se vacunaron dos veces (el día 5 y el día 13 después de la implantación del tumor) en un entorno terapéutico con 0,5, 2 o 10 nmol de Z13Mad5Anaxa.

40 Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EC7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) por inyección subcutánea de 0,5 nmol, 2 nmol o 10 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibre.

El crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo se muestra en la Figura 23. Esos datos demuestran que las dosis de 0,5 y 2 nmol son al menos tan eficaces como 10 nmol para controlar el crecimiento tumoral.

45 Ejemplo 13: efecto de diferentes vías de administración de Z13Mad5Anaxa

Este estudio se basó en los ejemplos anteriores que demuestran la eficacia de la vacuna conjugada Z13Mad5Anaxa (ver el ejemplo 7), que puede provocar respuestas inmunes específicas y es eficaz para controlar el crecimiento tumoral en el modelo tumoral subcutáneo EG7 como se demuestra anteriormente.

Para investigar el efecto de las vías de administración subcutánea, intramuscular e intradérmica, se compararon las respuestas inmunitarias provocadas por inyección subcutánea, intramuscular e intradérmica. Las inyecciones intradérmicas se realizaron utilizando el dispositivo PLEASE® de Pantec Biosolutions.

- 5 Los ratones fueron vacunados tres veces cada dos semanas (Wk0, Wk2 y Wk4) con 0,5 o 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (ver ejemplo 7). Para apuntar a varios ganglios linfáticos, la 1ª y la 3ª vacunación se realizaron en el flanco derecho, mientras que la segunda se realizó en el flanco izquierdo. La respuesta de células T CD8⁺ específicas de SIINFEKL se analizó 1 semana después de la segunda y tercera vacunación en sangre. La Figura 24 muestra las respuestas de las células T CD8 específicas de SIINFEKL después de cada vacunación detectada en la sangre de ratones C57BL/6 vacunados tres veces (Wk0, Wk2 y Wk4) s.c, i.d. o i.m. con 0,5 nmol (Figura 24 A) o 2 nmol (Figura 24 B) de Z13Mad5Anaxa. Se obtuvo sangre de ratones 7 días después de la segunda y la tercera vacunación y se realizó la tinción multimérica (un experimento con 4 ratones por grupo).

- 15 Los resultados indican que a las dos dosis evaluadas (0,5 y 2 nmol), (i) todas las vías de administración probadas provocaron una respuesta inmune CD8 específica de SIINFEKL y (ii) la vacunación subcutánea provocó la respuesta inmune CD8 específica de SIINFEKL más fuerte. Para la administración subcutánea, la respuesta máxima se alcanzó después de la tercera vacunación y aún se mantuvo después de la tercera vacunación. La respuesta inmune CD8 específica de SIINFEKL después de la segunda vacunación provocada por las vacunas intradérmicas e intramusculares es menor en comparación con la vacunación subcutánea y no mejora después de la tercera vacunación.

- 20 A continuación, se evaluó la función efectora y el estado de agotamiento de las células T CD8 específicas de SIINFEKL analizando KLRG 1 (miembro 1 de la subfamilia G del receptor tipo lectina de células asesinas) y PD-1, respectivamente.

- 25 Para ello, se vacunaron ratones C57BL/6 tres veces (Wk0, Wk2 y Wk4) s.c, i.d. o i.m. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (ver el ejemplo 7). Se obtuvo sangre de ratones 7 días después de la segunda y la tercera vacunación y se realizó la tinción con FACS. La expresión de KLRG1 y PD-1 se analizó en células T CD8 multímeras positivas (un experimento con 4 ratones por grupo). Los resultados se muestran en la Figura 25.

Estos datos indican que la expresión de KLRG 1 está fuertemente aumentada en las células T CD8 específicas de SIINFEKL después de la vacunación subcutánea. Después de la vacunación i.d. o i.m., los efectos observados fueron menores. El porcentaje de células positivas para KLRG 1 entre las células T CD8 específicas de SIINFEKL también aumenta después de la vacunación s.c. (datos no mostrados).

- 30 A diferencia de KLRG 1, la expresión de PD-1 disminuye con el tiempo y las vacunas para las vías de vacunación subcutánea e intramuscular. Esto sugiere que las células T CD8 específicas de SIINFEKL no están agotadas. El porcentaje de células positivas para PD1 entre las células T CD8 específicas de SIINFEKL también se reduce después de la vacunación s.c. e i.m. (datos no mostrados). Es importante tener en cuenta que la expresión de PD-1 es mayor después de la segunda vacunación cuando los ratones fueron vacunados vía subcutánea, lo que refleja el estado de activación temprana de las células T específicas (Keir, ME, et al., PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26: p. 677-704).

También se analizó la expresión del marcador de agotamiento tardío Tim-3. Se observó una expresión muy baja para todos los grupos.

- 40 Tomados en conjunto, los resultados indican que la vacunación subcutánea provoca la mejor respuesta inmune específica de CD8 en comparación con las inyecciones intramusculares o intradérmicas.

Ejemplo 14: vía de administración intranodal

En base a los experimentos anteriores (Ejemplo 13), se investigó además la vía de administración intranodal. Para ello, se investigó la respuesta inmune provocada por la inyección intranodal de Z13Mad5Anaxa (ver el ejemplo 7).

- 45 Para este propósito, primero se inyectó a los ratones Evans Blue por vía subcutánea para permitir visualizar fácilmente los ganglios linfáticos para la inyección y la inyección intranodal sin cirugía invasiva, por ejemplo como se describe en Jewell, CM., S.C. Lopez y D.J. Irvine, In situ engineering of the lymph node microenvironment via intranodal injection of adjuvant-releasing polymer particles. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2011. 108(38): p. 15745-50. .

Los ratones C57BL/6 se vacunaron dos veces cada dos semanas (Wk0 y Wk2) vía intranodal con 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa (ver el ejemplo 7). La primera vacunación se realizó en el ganglio linfático inguinal derecho, mientras que la segunda vacunación se realizó en el ganglio linfático inguinal izquierdo. Se obtuvo sangre de los ratones 7 días después de la segunda vacunación y se realizó una tinción multimérica (3 ratones por grupo).

5 En otras palabras, la respuesta de las células T CD8⁺ específicas de SIINFEBL se analizó una semana después de la segunda vacunación en la sangre. La Figura 26 muestra las respuestas de células T CD8 específicas de SIINFEBL. Esos datos indican que también la inyección intranodal era capaz de provocar células T CD8 específicas de SIINFEBL.

Ejemplo 15: calendario de vacunación

- 10 El trabajo de evaluación del calendario de vacunación se inició con el objetivo de identificar el impacto de la tercera vacunación utilizando el mismo constructo Z13Mad5Anaxa descrito anteriormente (ver el ejemplo 7). Se eligió la vía subcutánea dados los resultados anteriores.

- En el experimento, se realizaron las dos primeras vacunas la wk0 y wk2 con una tercera vacunación en la wk4 (Figura 27 A) o wk8 (Figura 27B). Así, los ratones C57BL/6 fueron vacunados tres veces (Figura 27 A y C: Wk0, Wk2 y Wk4 y Figura 27 B y D: Wk0, Wk2 y Wk8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Se obtuvo sangre de los ratones 7 días después de la última vacunación y se realizó la tinción con pentámero (un experimento con 4 ratones por grupo). Así, la respuesta de las células T CD8⁺ específicas de SIINFEBL se analizó 1 semana después de la segunda y tercera vacunación (Figura 27 A y B). Además, se evaluó la función efectora de las células T específicas de SIINFEBL analizando la expresión de KLRG 1 en células T CD8 específicas (Figura 27C y D).
- 15
20

Los datos indican que, en comparación con el control, el porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEBL aumentó significativamente en todos los puntos de tiempo probados (Vac2 y Vac3), así como en ambos esquemas de vacunación (Figura 27 A y B).

- Curiosamente, la tercera vacunación en la Wk4 permitió aumentar de manera más prominente el porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEBL (Figura 27 A). Las mismas células también demuestran una función efectora mejorada a través de una mayor expresión de KLRG 1 (Figura 27 C). En contraste, con una tercera vacunación realizada la Wk8 no se pudo observar mejoría de la segunda a la tercera vacunación en la respuesta inmune específica de SIINFEBL y en la expresión de KLRG 1.
- 25

- Tomados en conjunto, estos resultados indican que la respuesta inmune de CD8 podría incrementarse acortando el retraso entre la segunda y la tercera vacunación.
- 30

Dado que una tercera vacunación anterior parece aumentar la respuesta inmune, en el siguiente estudio se investigaron dos programas cortos de vacunación:

- i) tres vacunas el día 0, día 3 y día 7 y
- ii) tres vacunas el día 0, día 7 y día 14.

- 35 Nuevamente, se usaron ratones C57BL/6 y se realizó la vacunación s.c. con 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa (ver el ejemplo 7). La tinción multimérica se realizó en muestras de sangre obtenidas una semana después de la segunda y tercera vacunación (un experimento con 4 ratones por grupo).

- Por tanto, se analizó la respuesta de las células T CD8⁺ específicas de SIINFEBL una semana después de la segunda y tercera vacunación (Figura 28A y D). Además, se evaluó la función efectora de las células T específicas de SIINFEBL analizando la expresión de KLRG 1 en células T CD8 específicas (Figura 28B y 28E) y el estado de agotamiento analizando la expresión PD-1 de células T específicas (Figura 28C y 28F).
- 40

- Los datos indican que, de manera similar al primer estudio sobre el programa de vacunación descrito anteriormente, en comparación con el control, el porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEBL aumentó en todos los puntos de tiempo probados (Vac2 y Vac3), así como en ambos programas de vacunación (Figura 28 A y B).
- 45

- Sin embargo, en comparación con el programa wk0-wk2-wk4, un programa con vacunas en el día 0, día 3 y día 7 no provocó una respuesta inmune de las células T CD8 específica de SIINFEBL tan alta. Con respecto al programa con las vacunas en el día 0, el día 7 y el día 14, la respuesta inmune de las células T CD8 específicas de SIINFEBL obtenida es mejor en comparación con el programa anterior (d0-d3-d7), pero no se mantiene después de la tercera vacunación.
- 50

En conjunto, el conjunto de datos del programa de vacunación indica que el programa de vacunación Wk0-Wk2-Wk4 es el mejor programa de vacunación para inducir una potente respuesta inmune CD8 específica de OVA con una función efectora alta.

5 **Ejemplo 16: Capacidad de los constructos conjugados de agonista de TLR-CPP para activar las células presentadoras de antígeno murino (APC)**

Para investigar el efecto de ambos, el componente CPP y el componente agonista TLR en un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, nuevamente se usaron las proteínas de fusión descritas anteriormente (ver los ejemplos 1, 2 y 7).

- 10 Además, se diseñó un "péptido de control" adicional, que también es una proteína de fusión y que comprende la proteína "MAD5", consistente en diferentes epítomos CD8⁺ y CD4⁺ de varios antígenos y el agonista del péptido TLR2 "Anaxa" (es decir, sin péptido de penetración celular). Así, se diseñó además el siguiente constructo de control:

Mad5Anaxa

Secuencia:

MHHHHHHESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPRF
AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTEWT GSSTVHEILC KLSLEGDHST
PPSAYGSVKP YTNFDAE

- 15 [SEQ ID NO: 32]

Peso molecular: 13933 Da

Características:

- La carga Mad5 contiene epítomos OVACD4, gp100CD8, EalphaCD4 y OVACD8
- Contiene el péptido de 35 meros de anexina en posición C-terminal
- 20 – Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, DTT 2 mM, L-Arginina 0,5 M, pH 8
- Nivel de endotoxina: Lote 1 – 12,15 UE/mg

- 25 El objetivo de este estudio era evaluar la capacidad de dos complejos ilustrativos de acuerdo con la presente invención, a saber, EDAZ13Mad5 (ver el ejemplo 1) y Z13Mad5Anaxa (ver el ejemplo 7), para promover la activación de las células presentadoras de antígeno en comparación con los complejos de referencia que carecen del componente peptídico penetrante celular Z13 (Mad5Anaxa, ver arriba; EDAMad5, ver ejemplo 2) o el agonista de TLR (Z13Mad5, ver ejemplo 1).

- 30 Para ello, se evaluó la capacidad de los constructos mencionados anteriormente para promover la activación de las células presentadoras de antígeno (APC) en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC), que expresan todos los TLR excepto TLR7.

- 35 Las BMDC se sembraron en una placa plana de 96 pocillos en un medio de cultivo, se estimularon con 1 µM de Z13Mad5Anaxa (ver ejemplo 7), Mad5Anaxa (ver arriba), Z13Mad5 (ver ejemplo 1), EDAZ13Mad5 (ver ejemplo 1) o EDAMad5 (ver ejemplo 2) y se incubaron durante 24 h a 37°C. La activación de APC se investigó monitorizando la secreción de IL-6 en el sobrenadante de cultivo de BMDC. La secreción de IL-6 se cuantificó por ELISA en el sobrenadante.

- 40 Los resultados se muestran en la Figura 29. Estos datos muestran claramente que Z13Mad5Anaxa podía activar BMDC, mientras que no se observó dicha activación cuando las células se cultivaron en presencia de Z13Mad5 o Mad5Anaxa. Esto sugiere que no solo el agonista TLR (Anaxa o EDA) es crítico para la activación de macrófagos y células dendríticas, sino que también se necesita el CPP. Además, la presencia de CPP sin el agonista de TLR no es suficiente, sino que de hecho ambos, el agonista de CPP y TLR, son críticos para la activación de macrófagos y células dendríticas.

- 45 Esos resultados se confirmaron mediante el uso de otra línea celular, concretamente la línea celular de macrófagos de ratón Raw 264.7, que expresa todos los TLR excepto TLR5 Applequist, S.E., R.P. Wallin, and H.G. Ljunggren, Variable expression of Tolllike receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. Int Immunol, 2002. 14(9): p. 1065-74).

Se sembraron 264,7 células crudas en una placa plana de 96 pocillos en medio de cultivo, se estimularon con 1 μ M de Z13Mad5Anaxa (ver ejemplo 7), Mad5Anaxa (ver arriba) o Z13Mad5 (ver ejemplo 1) y se incubaron durante 24 h a 37°C.

- 5 En las células Raw 264.7, la activación de APC se investigó monitorizando la secreción de TNF- α en el sobrenadante de cultivo de Raw 264.7. La secreción de TNF- α se cuantificó por ELISA en el sobrenadante. Los resultados se muestran en la Figura 30.

Se cree que el CPP puede facilitar la entrada de la molécula en las células, lo que permite una mejor orientación del TLR intracelular.

- 10 Tomados en conjunto, los datos revelan el papel crítico de ambos, agonista de CPP y TLR, dentro de los constructos conjugados para activar APC. Este efecto puede deberse a que se facilita la entrada del constructo a las células, resultando en un objetivo óptimo de la TLR intracelular.

Ejemplo 17: Capacidad de los constructos conjugados para unirse a TLR4 humano

- 15 Recientemente se ha demostrado que el péptido Anaxa posee una actividad adyuvante mediante la señalización a través de TLR2 (WO 2012/048190 A1), mientras que el péptido EDA es un ligante natural para TLR4 (Okamura, Y., et al., The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. J Biol Chem, 2001. 276(13): p. 10229-33).

- 20 Además, como se demuestra anteriormente en el Ejemplo 8 y la Figura 1 4, un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención que comprende el péptido Anaxa como agonista de TLR, por ejemplo Z13Mad5Anaxa, puede unirse al TLR2 humano y promover la secreción de IL-8 por células HEK-hTLR2 (ver el ejemplo 8, Fig. 1 4).

- 25 En el presente estudio, se evaluó la capacidad de los complejos según la presente invención que comprenden el péptido Anaxa como agonista de TLR o el péptido EDA como agonista de TLR para unirse al TLR4 humano. Para ello, se sembraron células HEK transfectadas con TLR4 humano (HEK-hTLR4) en una placa plana de 96 pocillos en un medio de cultivo, se estimularon con 1 μ M de Z13Mad5Anaxa (ver ejemplo 7), Mad5Anaxa (ver arriba), Z13Mad5 (ver ejemplo 1), EDAZ13Mad5 (ver ejemplo 1) o EDAMad5 (ver ejemplo 2) y se incubó durante 24 h a 37°C. La secreción de IL-8 se cuantificó por ELISA en el sobrenadante.

- 30 Los resultados se muestran en la Figura 31. Como se esperaba, la incubación de HEK-hTLR4 con EDAZ13Mad5 resultó en una notable secreción de IL-8, lo que indica la unión de EDAZ13Mad5 a TLR4. En línea con los resultados obtenidos en el Ejemplo 16, la secreción de IL-8 de EDAMad5 (sin CPP) era notablemente menor en comparación con EDAZ13Mad5, demostrando el efecto de la presencia de un CPP. El constructo Z13Mad5, que no comprende un agonista de TLR, no mostró secreción de IL-8, lo que indica, como era de esperar, una falta de unión a TLR4.

- 35 Curiosamente, la incubación de HEK-hTLR4 con el constructo Z13Mad5Anaxa dio como resultado una secreción de IL-8 más pronunciada, lo que indica la unión de Z13Mad5Anaxa a TLR4. Esto es sorprendente, ya que anteriormente se suponía que Anaxa era un agonista de TLR2. Nuevamente, el mismo constructo pero sin el CPP (Mad5Anaxa) resultó en una secreción notablemente menor de IL-8, confirmando los resultados obtenidos en el Ejemplo 16.

- 40 Tomados en conjunto, estos datos (i) confirman los resultados obtenidos en el Ejemplo 16, (ii) confirman que EDA es de hecho un agonista de TLR4 y (iii) demuestran que, sorprendentemente, el péptido Anaxa también es un agonista de TLR4 (además de ser un agonista de TLR2, ver el ejemplo 8 y Fig. 14).

Ejemplo 18: Eficacia de la vacuna en el crecimiento tumoral en un modelo de metástasis pulmonar - entorno semi-terapéutico: agonista de TLR EDA

- 45 Este estudio se basa en el Ejemplo 6, que demuestra la eficacia de un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, a saber, EDAZ13Mad5, en un modelo de melanoma de metástasis pulmonar en un entorno profiláctico (ver Figura 1 3).

En el presente estudio se utilizó el mismo modelo de metástasis pulmonar, así como los constructos proteicos construcción EDAZ13Mad5 y Z13Mad5 + MPLA (ver los ejemplos 1 y 2 para el diseño de los constructos). Sin embargo, en el entorno semi-terapéutico, se vacunaron los ratones C57BL/6 al mismo tiempo que se implantaron las células tumorales (d0) y, por segunda vez, a los nueve días después de la implantación (d9).

La vacunación se realizó por inyección subcutánea de 2 nmol de EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) o MPLA s.c. en el flanco derecho. El día 0, se implantaron a ratones i.v. 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA y se vacunaron dos veces (d0 y d9) por inyección subcutánea de 2 nmol de EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) o MPLA solo s.c. en el flanco derecho. Los ratones se sacrificaron el día 13 y se recuperaron los pulmones. Los resultados se muestran en la Fig. 32.

Los resultados demuestran que EDAZ13Mad5 es ligeramente más potente que Z13Mad5 + MPLA para inhibir el crecimiento de metástasis de melanoma. Además, no se observó ningún efecto adyuvante en ratones inyectados solo con MPLA.

Ambos, EDAZ13Mad5 y Z13Mad5 + MPLA, inhiben significativamente el crecimiento de metástasis de melanoma en el pulmón en entornos profilácticos y semiterapéuticos.

Ejemplo 19: Eficacia de la vacuna sobre el crecimiento tumoral en un modelo de metástasis pulmonar - entorno semi-terapéutico: agonista de TLR Anaxa

Este estudio se basa en el Ejemplo 18 con el mismo modelo (configuración semiterapéutica) y cronograma experimental. Sin embargo, se investigó el efecto de los complejos de acuerdo con la presente invención que comprenden el péptido "Anaxa" como agonista de TLR, en lugar del agonista de TLR de EDA como en el Ejemplo 18.

Para ello, se implantaron a ratones C57BL/6 i.v. 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA y se vacunaron dos veces (d0 y d9) por inyección subcutánea de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa o Z13Mad5 + Pam3CSK4 (equimolar a Anaxa) s.c. en el flanco derecho. Los ratones fueron sacrificados el día 21 y se recuperó el pulmón. Se contó el número de focos de metástasis en cada pulmón. Los resultados se muestran en la Figura 33.

Los resultados demuestran que Z13Mad5Anaxa es sensiblemente más potente que Z13Mad5 + Pam3CSK4 para inhibir el crecimiento de metástasis de melanoma. Por el contrario, Mad5Anaxa no pudo controlar el crecimiento de metástasis en el pulmón, lo que subraya nuevamente la importancia de la CPP.

En conjunto, el experimento de metástasis pulmonar B16-OVA demostró que Z13Mad5Anaxa era altamente eficaz para inhibir el crecimiento de metástasis de melanoma en el pulmón.

Ejemplo 20: eficacia de la vacuna en un modelo de glioblastoma

En este estudio se utilizó otro modelo de cáncer, a saber, un modelo de glioblastoma. El glioma es la forma más frecuente de tumores cerebrales primarios en adultos, siendo el glioblastoma multiforme (GBM) el más letal. Este tumor es conocido por su comportamiento altamente invasivo y agresivo.

Actualmente, el mejor tratamiento contra el GBM es un régimen que incluye una combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia, con una mediana de supervivencia de solo 14,6 meses. Existe una necesidad médica urgente e insatisfecha de nuevas modalidades de tratamiento que mejoren el pronóstico de los pacientes con glioma. La inmunoterapia mediada por células T es una opción de tratamiento conceptualmente atractiva para su uso junto con las modalidades existentes para el glioma, en particular el GBM altamente invasivo.

El glioma GL261 es un modelo de glioma de ratón inducido por carcinógeno. Este modelo representa uno de los pocos modelos de tumores cerebrales desarrollados en animales inmunocompetentes, que tiene características de crecimiento similares al GBM humano (Newcomb, E. and D. Zagzag, The murine GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments, en CNS Cancer Models, Markers, Prognostic, Factors, Targets, y Therapeutic Approaches, E.G. Van Meir, Editor. 2009, Humana Press: Atlanta. p. 227-241; Jacobs, V.L., et al., Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. ASN Neuro, 2011. 3(3): p. e00063). Un bajo número de células GL261 trasplantadas intracranialmente formaron tumores intracraneales en ratones C57BL/6 (Zhu, X., et al., Poly-/CLC promotes the infiltration of effector T cells into intracranial gliomas via induction of CXCL10 in IFN-alpha and IFN-gamma dependent manners. Cancer Immunol Immunother, 2010. 59(9): p. 1401-9; Zhu, X., et al., Toll like receptor-3 ligand poly-/CLC promotes the efficacy of peripheral vaccinations with tumor antigen-derived peptide epitopes in murine CNS tumor models. J Transl Med, 2007. 5: p. 10). Las células son moderadamente inmunogénicas: son capaces de provocar una respuesta inmune específica de tumor en el sitio del tumor. Sin embargo, las células inmunes específicas de tumor no son capaces de eliminar completamente el tumor.

Recientemente, M. Ollin generó un nuevo modelo GI261 (Ohlfest, J.R., et al., Vaccine injection site matters: qualitative and quantitative defects in CDB T cells primed as a function of proximity to the tumor in a murine glioma model. J Immunol, 2013. 190(2): p. 613-20) mediante la transfección de la línea celular GI261 con el "Quad Cassette" que expresa cuatro péptidos presentados por las moléculas H-2b de clase I o II: gp100₂₅₋₃₃ humano, OVA₂₅₇₋₂₆₁ de pollo, OVA₃₂₃₋₃₃₉ de pollo y I-Ed₅₂₋₆₈. La línea celular Quad-GI261 también expresa de manera estable la luciferasa, lo que permite el seguimiento del crecimiento tumoral por bioluminiscencia.

El objetivo de este estudio era evaluar la eficacia de un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención en el modelo de glioblastoma Quad-GI261.

El efecto de un complejo para su uso según la presente invención, a saber, Z13Mad5Anaxa (ver ejemplo 7) se evaluó en el modelo de glioblastoma descrito anteriormente. Así, el análisis de células T en el sitio del tumor se analizó en ratones portadores del tumor GI261-Quad vacunados dos veces (Wk1 y Wk3) con la vacuna Z13Mad5Anaxa. Se utilizó como control un grupo vacunado con Z13Mad5 y Anaxa (equimolar a Z13Mad5Anaxa) administrado por separado. Brevemente, se implantaron a ratones C57BL/6 i.c. (intracranealmente) 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (el d7 y d21 después de la implantación) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (grupo 1) o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa (grupo 2). La Wk4, se analizaron los leucocitos que se infiltran en la sangre y el cerebro (BIL), cuantificándose las células T CD8 específicas de SIINFEKL en sangre y en BIL el d28 mediante tinción multimérica (5-8 ratones por grupo). Los resultados se muestran en la Figura 34.

En general, se cuantificó la baja frecuencia de células T CD8 específicas de SIINFEKL en la sangre. Sin embargo, se observó un mayor porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEKL en la sangre de ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa. En todos los grupos había una acumulación sensiblemente más fuerte de células T CD8 específicas de SIINFEKL en las BIL.

Después de dos vacunas con Z13Mad5Anaxa, la frecuencia de las células T CD8⁺ específicas de SIINFEKL en las BIL era 2 veces mayor (24%) que con Z13Mad5 + Anaxa (12%).

A continuación, se evaluó la secreción de citoquinas. Para ello, se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y 21) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. Las BIL se aislaron y se cultivaron durante 6 h con BMDC maduros cargados o no con péptido SIINFEKL en presencia de BrefeldinA antes de la tinción intracelular para citocinas. Los resultados se muestran en la Figura 35.

A pesar de la heterogeneidad, se observó un alto nivel de secreción de citocinas para las células T CD8 que infiltran el cerebro de ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa. Estos resultados demuestran que la vacuna Z13Mad5Anaxa era capaz de provocar una respuesta inmune de células T CD8 específica de SIINFEKL más fuerte en el cerebro de ratones portadores de tumores con una potente función efectora.

Los resultados obtenidos indican que Z13Mad5Anaxa es eficaz para provocar una respuesta inmune CD8 específica de SIINFEKL con alta infiltración cerebral. Z13Mad5Anaxa puede promover la secreción de citocina por las células T CD8 específicas de antígeno en el cerebro.

Ejemplo 21: eficacia de la vacuna sobre la supervivencia en el modelo de glioblastoma de GI261-Quad

En un experimento independiente, se monitorizó la supervivencia del control y de los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa. Las medias terapéuticas fueron tres vacunas consecutivas con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa los días 7, 21 y 35, después de la implantación del tumor.

Se implantaron a ratones C57BL/6 i.c. 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron tres veces (d7, d21 y d35) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Los ratones se pesaron diariamente y se sacrificaron cuando la pérdida de peso alcanzó más del 15%. Los resultados se muestran en la Figura 36.

Los resultados demuestran que la vacunación terapéutica con Z13Mad5Anaxa es más eficaz que el grupo control, con una mediana de supervivencia prolongada de 10 días.

Ejemplo 22: eficacia de la vacuna en un modelo de tumor subcutáneo - entorno profiláctico

Este estudio se basa en los resultados obtenidos en el Ejemplo 10 como se muestra en las Figuras 17 - 19.

Para evaluar el efecto de los constructos proteicos conjugados con Anaxa diseñados en el Ejemplo 7 sobre el control del crecimiento tumoral, se usó un modelo tumoral de referencia, a saber, s.c. de implantación de células de timoma EG.7-OVA. A diferencia del Ejemplo 10, donde la vacunación se realizó los días 5 y 13, en el presente estudio se evaluó un entorno profiláctico, donde los ratones se vacunaron 21 y 7 días antes de la implantación del tumor.

Se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (d-21 y 6-7) s.c. por inyección de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho y luego se les implantaron el día 0 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo. Se midió el tamaño del tumor con un calibrador.

Los resultados se muestran en la Figura 37 con el volumen del tumor (Fig. 37 A) y la tasa de supervivencia (Fig. 37 B). Los datos demuestran que la vacunación profiláctica con Z13Mad5Anaxa es altamente eficaz para controlar el crecimiento del tumor y la tasa de supervivencia. El volumen del tumor disminuye significativamente en ratones tratados con Z13Mad5Anaxa en comparación con los ratones control. La tasa de supervivencia aumenta significativamente en los ratones tratados con Z13Mad5Anaxa en comparación con los ratones control.

Ejemplo 23: eficacia de la vacuna en un modelo de tumor subcutáneo - entorno terapéutico con tumor establecido

Este estudio se basa en los resultados obtenidos en el Ejemplo 10 como se muestra en las Figuras 17 - 19 y en los resultados obtenidos en el Ejemplo 22 mostrado en la Figura 37. El objetivo de este estudio era evaluar el efecto de Z13Mad5Anaxa (ver el ejemplo 7) en un tumor establecido.

Para ello, se utilizó el modelo s.c. de células de melanoma B16-OVA. En este modelo, las células tumorales se propagan lentamente, permitiendo así una mayor ventana de vacunación.

La primera vacunación a la dosis baja de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa se realizó una vez que el tumor se estableció y era visible, es decir, el día 14 después de la implantación de la célula tumoral. Se realizó una segunda vacunación el día 21.

Así, se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 1×10^5 células tumorales B16-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d14 y d21) s.c. por inyección de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se monitorizaron las curvas de crecimiento tumoral y supervivencia. Los resultados se muestran en la Fig. 38.

Los resultados indican que Z13Mad5Anaxa controla eficazmente el crecimiento de un tumor establecido y visible. Además, las tasas de supervivencia tumoral establecidas y visibles aumentaron en los ratones tratados con Z13Mad5Anaxa en comparación con los controles.

Ejemplo 24: eficacia de la vacuna en un modelo de tumor subcutáneo - entorno terapéutico: efecto del CPP

El protocolo de este estudio corresponde al estudio descrito en el Ejemplo 10, con la diferencia de que se evaluó un grupo adicional "Mad5Anaxa" (ver el ejemplo 16).

Brevemente, se utilizó un modelo de tumor de referencia, a saber, s.c. de implantación de células de timoma EG.7-OVA. Se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo. Después de la implantación del tumor, se vacunaron grupos de 7 ratones cada uno s.c. en el flanco derecho los días 5 y 13 por inyección subcutánea de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa (grupo 1) o Mad5Anaxa (grupo 2) y se compararon con un grupo control. El tamaño del tumor se midió con un calibrador. Los resultados se muestran en la Figura 39.

Los resultados demuestran que los ratones tratados con Z13Mad5Anaxa muestran un volumen tumoral significativamente menor y una tasa de supervivencia significativamente mayor en comparación con los ratones control y los ratones tratados con Mad5Anaxa, es decir, un constructo sin CPP. Estos resultados indican que la presencia de un CPP produce una disminución significativa del volumen del tumor y una tasa de supervivencia significativamente mayor, es decir, una mayor eficacia de la vacunación. Por tanto, los resultados indican, junto con los resultados obtenidos en el Ejemplo 10, que la presencia de un CPP y el agonista de TLR ejercen un efecto sinérgico sobre el crecimiento tumoral y la tasa de supervivencia.

Ejemplo 25: comparación de la cinética de las respuestas inmunes con complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular

Para investigar el efecto de diferentes CPP en el complejo para su uso según la presente invención, se empleó la proteína de fusión Z13Mad5Anaxa descrita anteriormente (ver el ejemplo 7). Además, se diseñaron más proteínas de fusión que comprendían CPP distintos de Z13, a saber, Z14 (SEQ ID NO: 7) o Z18 (SEQ ID NO: 11). Esas proteínas de fusión también comprenden la proteína "MAD5", que consiste en diferentes epítomos CD8⁺ y CD4⁺ de varios antígenos, y el péptido agonista de TLR2 "Anaxa". Así, se diseñaron además los siguientes constructos:

Z14Mad5Anaxa

Secuencia:

MHHHHHHKRY KNRVASRKS AKFKQLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV
VGVGALKVPR NQDWLGVPRF AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTWET
GSSTVHEILC KLSLEGDHST PPSAYGSVKP YTNFDAE
(SEQ ID NO: 33)

10 Z18Mad5Anaxa

Secuencia:

MHHHHHHREV AAASSENDL RLLKESLK ISQAVHAAHA EINEAGREVV GVGALKVPRN
QDWLGVPRFA KFASFEAQGA LANIAVDKAN LDVEQLESII NFEKLTWETG SSTVHEILCK
LSLEGDHSTP PSAYGSVKPY TNFDAE
(SEQ ID NO: 34)

Se asignaron ratones C57BL/6 a ocho grupos diferentes (4 ratones por grupo): tres grupos que recibieron 2 nmol de Z13Mad5Anaxa, Z14Mad5Anaxa o Z18Mad5Anaxa y un control respectivo y tres grupos que recibieron 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa, Z14Mad5Anaxa o Z18Mad5Anaxa y un control respectivo. Los ratones fueron vacunados cinco veces (semana0, semana2, semana4, semana6 y semana8) s.c. Los ratones se desangraron 7 días después de la 2^a, 3^a, 4^a y 5^a vacunación y se realizó la tinción multimérica (un experimento con 4 ratones por grupo).

Los resultados se muestran en la Figura 40. Todos los grupos vacunados con Z13Mad5Anaxa, Z14Mad5Anaxa o Z18Mad5Anaxa mostraron un mayor porcentaje de células multiméricas positivas en comparación con el grupo control (excepto la segunda vacunación de Z18Mad5Anaxa). Estos resultados indican que los complejos de acuerdo con la presente invención con diferentes péptidos de penetración celular pueden provocar una respuesta inmune a diferentes dosis.

25 **Ejemplo 26: comparación de las respuestas inmunes de células T con complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular**

Para investigar las respuestas inmunitarias de las células T CD8 con más detalle, se asignaron ratones C57BL/6 a tres grupos diferentes (3 - 4 ratones por grupo): naive, Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa.

Los ratones C57BL/6 del grupo Z13Mad5Anaxa y del grupo Z14Mad5Anaxa fueron vacunados cinco veces (semana0, semana2, semana4, semana6 y semana8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (ver ejemplo 7) o Z14Mad5Anaxa (ver ejemplo 25). Nueve días después de la 5^a vacunación, se sacrificaron los ratones, se recuperaron los órganos y se realizó una tinción multimérica para identificar el porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEKL en el bazo, la médula ósea y el drenaje de los ganglios linfáticos (inguinal y axilar).

Los resultados se muestran en la Figura 41. Los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa o con Z14Mad5Anaxa mostraron un aumento similar en las células multiméricas positivas, en particular en el bazo y la médula ósea, así como un ligero aumento en el drenaje de los ganglios linfáticos.

Para investigar más a fondo la función efectora de las células T CD8 después de la vacunación con complejos con diferentes CPP, en los mismos grupos de ratones descritos anteriormente se realizó el ensayo Elispot en células de bazo estimuladas con el péptido SIINFEKL OVACD8 (SEC ID NO: 35) nueve días después de la 5^a vacunación para cuantificar las células productoras de IFN- γ .

- Los resultados se muestran en la Figura 42A. Los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa mostraron un aumento significativo en las células productoras de IFN- γ en comparación con los ratones naive. Los ratones vacunados con Z14Mad5Anaxa también mostraron un aumento en las células productoras de IFN- γ en comparación con los ratones naive, sin embargo, el aumento no era significativo, lo que puede deberse al bajo número de ratones (3 ratones en el grupo Z14Mad5Anaxa).

Para investigar las respuestas de las células T CD4 después de la vacunación con complejos con diferentes CPP, en los mismos grupos de ratones descritos anteriormente se realizó el ensayo Elispot en células del bazo estimuladas con péptido OVACD4 (SEQ ID NO: 36) nueve días después de la 5ª vacunación para cuantificar las células productoras de IFN- γ .

- Los resultados se muestran en la Figura 42B. Los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa mostraron un aumento muy significativo en las células productoras de IFN- γ en comparación con los ratones sin tratamiento previo. Los ratones vacunados con Z14Mad5Anaxa también mostraron un aumento en las células productoras de IFN- γ en comparación con los ratones sin tratamiento previo, sin embargo, el aumento no era significativo, lo que puede deberse al bajo número de ratones (3 ratones en el grupo Z14Mad5Anaxa).
- Además, en los grupos de ratones descritos anteriormente, se realizó una tinción intracelular en células de bazo estimuladas con péptido SIINFEKL OVACD8 (SEQ ID NO: 35) para identificar células CD107a⁺IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺. Los resultados se muestran en la Figura 43. Los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa o con Z14Mad5Anaxa mostraron un aumento similar en las células CD107a⁺IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺.

Ejemplo 27: comparación del efecto de complejos con diferentes péptidos de penetración de células sobre el crecimiento tumoral y la supervivencia en el modelo s.c. EG.7-OVA

- Para investigar los efectos de los complejos con diferentes péptidos de penetración celular sobre el crecimiento tumoral y la supervivencia, se utilizó el modelo s.c. EG.7-OVA. El d0 se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 3x10⁵ células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se asignaron a tres grupos diferentes (naive, Z13Mad5Anaxa y Z14Mad5Anaxa). Los ratones fueron vacunados dos veces el d5 y el d13 después de la implantación tumoral s.c. por inyección de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa en el flanco derecho.

- Los resultados se muestran en la Figura 44. La vacunación con Z13Mad5Anaxa o con Z14Mad5Anaxa produjo una disminución significativa de los volúmenes tumorales en comparación con los ratones de control (Figura 44 A), así como un aumento significativo de las tasas de supervivencia en comparación con los ratones de control (Figura 44 B). Esos resultados indican que ambos complejos, Z13Mad5Anaxa y Z14Mad5Anaxa, pueden disminuir significativamente el crecimiento tumoral y prolongar significativamente la supervivencia.

Ejemplo 28: comparación de las respuestas inmunes después de la vacunación con complejos con diferentes péptidos de penetración celular

- En este experimento, se investigó el efecto de diferentes CPP en el complejo para su uso según la presente invención usando un complejo con el agonista de TLR "EDA". Por tanto, se empleó la protección de fusión EDAZ13Mad5 descrita anteriormente (ver el ejemplo 1).

Además, se diseñaron más proteínas de fusión que comprendían CPP distintos de Z13, a saber, Z14 (SEQ ID NO: 7) o Z18 (SEQ ID NO: 11). Estas proteínas de fusión también comprenden la proteína "MAD5", que consiste en diferentes epítomos CD8⁺ y CD4⁺ de diversos antígenos, y el péptido agonista de TLR4 "EDA". Así se diseñaron además los siguientes constructos:

40 EDAZ14Mad5

Secuencia:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKS R AKFKQLLQHY
REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVP RF AKFASFEAQG
ALANIAVDKA NLDVEQLES I INFEKLTEWT GS
(SEQ ID NO: 37)

EDAZ18Mad5

Secuencia:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYP VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTREV AAKSSENDER LRLLLKESLK

ISQAVHAAHA EINEAGREVV GVGALKVPRN QDWLGVPRFA KFASFEAQGA LANIAVDKAN

LDVEQLESII NFEKLTEWTG S

(SEQ ID NO: 38)

- Se asignaron ratones C57BL/6 a ocho grupos diferentes (4 ratones por grupo): tres grupos que recibieron 2 nmol de EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5 o EDAZ18Mad5 y un control respectivo y tres grupos que recibieron 0,5 nmol de EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5 o EDAZ18Mad5 y un grupo de control respectivo. Los ratones fueron vacunados tres veces (semana0, semana2 y semana) s.c. Los ratones se desangraron 7 días después de la 2ª y 3ª vacunación y se realizó la tinción multimérica (un experimento con 4 ratones por grupo).

- Los resultados se muestran en la Figura 45. Todos los grupos vacunados con EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5 o EDAZ18Mad5 mostraron un mayor porcentaje de células multiméricas positivas en comparación con el grupo control. Estos resultados indican que los complejos de acuerdo con la presente invención con diferentes péptidos de penetración celular pueden provocar una respuesta inmune a diferentes dosis.

Ejemplo 29: efecto de EDAZ14Mad5 sobre el crecimiento tumoral y la supervivencia en el modelo s.c. EG.7-OVA

- Para investigar el efecto de EDAZ14Mad5 sobre el crecimiento tumoral y la supervivencia, se utilizó el modelo s.c. EG.7-OVA (ver ejemplo 4 y Figuras 9 - 11 para el efecto de EDAZ13Mad5 en el mismo modelo).

El d0 se implantó a ratones C57BL/6 s.c. 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se asignaron éstos a dos grupos diferentes (naive y EDAZ14Mad5). Los ratones fueron vacunados dos veces el d5 y d13 después de la implantación s.c. del tumor por inyección de 0,5 nmol de EDAZ14Mad5 en el flanco derecho.

- Los resultados se muestran en la Figura 46. De manera similar a EDAZ13Mad5 (ver el ejemplo 4, Figuras 9 - 11), la vacunación con EDAZ14Mad5 resultó en una disminución significativa de los volúmenes tumorales en comparación con los ratones de control (Figura 46 A), así como en un aumento significativo de las tasas de supervivencia en comparación con los ratones de control (Figura 46 B). Esos resultados indican que EDAZ14Mad5 puede disminuir significativamente el crecimiento tumoral y prolongar significativamente la supervivencia, de manera similar a EDAZ13Mad5 (ver el ejemplo 4, Figuras 9 - 11).

Ejemplo 30: eficacia superior del constructo de fusión Z13Mad5Anaxa en comparación con Z13Mad5 y Anaxa en un modelo de glioblastoma

- Para investigar la eficacia de un complejo de acuerdo con la presente invención, se eligió el modelo de glioblastoma (ver el ejemplo 20). A saber, se administró Z13Mad5Anaxa (ver ejemplo 7; SEQ ID NO: 28) a un grupo de ratones, mientras que Z13Mad5 (SEQ ID NO: 29) y Anaxa (SEQ ID NO: 15) se administraron (ambos juntos) a otro grupo de ratones.

- Se realizó el análisis de las células en el sitio del tumor en ratones GL261-Quad con tumor (7 - 16 ratones por grupo) vacunados dos veces, concretamente el día 7 y el día 21 después de la implantación del tumor (día 0), con 2 nmol de la vacuna Z13Mad5Anaxa. Se usó como control un grupo vacunado con ambos, Z13Mad5 y Anaxa (equimolar a Z13Mad5Anaxa). Brevemente, se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. (intracranalmente) 5×10^5 células tumorales GL261-Quad y se vacunaron dos veces (el d7 y d21 después de la implantación) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (grupo 1) o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa (grupo 2). El día 28, se analizaron los leucocitos infiltrantes de sangre y cerebro (BIL), por lo que las células T CD8 específicas de SIINFEKL se cuantificaron en sangre y en BIL el d28 mediante tinción multimérica (7 - 16 ratones por grupo).

Los resultados se muestran en la Figura 47. Se observó un porcentaje significativamente mayor de células T CD8 específicas de SIINFEKL en la sangre de ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa en comparación con los ratones vacunados con Z13Mad5 y Anaxa (Fig. 47A). De manera similar, se observó una acumulación más

fuerte de células T CD8 específicas de SIINFEKL en las BIL de los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa en comparación con los ratones vacunados con Z13Mad5 y Anaxa por separado (Fig. 47B, $p = 0,0539$).

A continuación, se evaluó la secreción de citoquinas. Para ello fin, se implantaron a ratones C57BL/6 s.c. 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y 21) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. Las BIL se aislaron y se cultivaron durante 6 h con BMDC maduras cargadas o no con péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 35) en presencia de BrefeldinA antes de la tinción intracelular para citoquinas.

Los resultados se muestran en la Figura 48. En general, se observó un alto nivel de secreción de citoquinas para las células T CD8 infiltrantes del cerebro de ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa. En particular, se observó una secreción significativamente mayor de IFN- γ total y de IFN- γ y TNF- α juntos para las células T CD8 infiltrantes del cerebro de los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa en comparación con los ratones vacunados con Z13Mad5 y Anaxa por separado.

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que la vacuna Z13Mad5Anaxa (en comparación con Z13Mad5 y Anaxa administrados por separado) era capaz de provocar una respuesta inmune de células T CD8 específicas de SIINFEKL más fuerte en el cerebro de ratones portadores de tumores con potente función efectora.

Los resultados obtenidos indican que Z13Mad5Anaxa es eficaz para provocar una respuesta inmune CD8 específica de SIINFEKL con alta infiltración cerebral. Z13Mad5Anaxa puede promover la secreción de citocina por las células T CD8 específicas de antígeno en el cerebro.

20 **Ejemplo 31: efecto de otra carga antigénica en el complejo de acuerdo con la presente invención**

Para investigar el efecto de una carga antigénica diferente ("Mad8"), se diseñó otro complejo que comprendía un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un péptido agonista de TLR ("Z13Mad8Anaxa"). Z13Mad8Anaxa difiere de Z13Mad5Anaxa (descrito en el Ejemplo 7) en las cargas antigénicas. En particular, "Z13Mad8Anaxa" es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", la carga antigénica "MAD8" que comprende los epítomos CD8 y CD4 de la glucoproteína 70 y el péptido agonista de TLR "Anaxa". En la siguiente, la secuencia de aminoácidos de Z13Mad8Anaxa se muestra el péptido de penetración celular "Z13" subrayado y el agonista del péptido TLR "Anaxa" en cursiva:

KRYKNRVASR KSRAKFKQLL QHYREVAAAK SSENDRLRLLLK VTYHSPSYAY HQFERRAILN

RLVQFIKDRI SVVQALVLT TVHEILCKLS LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE

(SEQ ID NO: 39)

Se vacunaron ratones Balb/c (4 ratones por grupo) cuatro veces s.c. (semana0, semana2, semana4 y semana6) con 2 nmol de Z13Mad8Anaxa.

Para investigar la respuesta de las células T CD4 después de la vacunación, una semana después de la 4ª vacuna, se sacrificaron los ratones; se recuperaron los órganos recuperados y se realizó *ex vivo* el ensayo Elispot en células de bazo estimuladas con el péptido gp70CD4 (SEQ ID NO: 64) o el péptido gp70CD8 (SEQ ID NO: 65) para cuantificar las células T CD4 y CD8 específicas de epítipo que producen IFN- γ .

Los resultados se muestran en la Figura 49. Los ratones vacunados con Z13Mad8Anaxa mostraron un aumento significativo en las células productoras de IFN- γ en comparación con los ratones naive. Estos datos demuestran que la vacuna Z13Mad8Anaxa podía provocar una potente respuesta inmune de células T CD8 y CD4 específicas de epítipo y, por tanto, el complejo según la presente invención podía provocar una respuesta inmune autoantigénica.

40 **Ejemplo 32: efecto de otra carga antigénica en el complejo de acuerdo con la presente invención**

Para investigar el efecto de una carga antigénica diferente adicional ("Mad11"), se diseñó otro complejo que comprendía un péptido de penetración celular de diferentes antígenos y un péptido agonista de TLR ("Z13Mad11Anaxa"). Z13Mad11Anaxa difiere de Z13Mad5Anaxa (descrito en el Ejemplo 7) en las cargas antigénicas. En particular, "Z13Mad11Anaxa" es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", la carga antigénica "MAD11" que comprende dos epítomos CD8 de supervivencia como se describe en Derouazi M, Wang Y, Marlu R, et al. Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector: Application to TRP-2. Bioengineered Bugs. 2010;1(1):51-60.

doi:10.4161/bbug.1.1.9482, y el péptido agonista de TLR "Anaxa". A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de Z13Mad11Anaxa:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLKKNYRIATFKNWPFLDCAMEELT
VSEFLKLDQRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE
(SEQ ID NO: 40)

5 Se implantó a ratones naive C57BL/6 (5 ratones por grupo) i.v. 1×10^5 células tumorales de melanoma B16 y se vacunaron dos veces (d0 y d10) por inyección subcutánea de 1 nmol de Z13Mad11Anaxa. El día 8 se sacrificaron los ratones, se recuperaron los órganos y se realizó un ensayo de Elispot *ex vivo* en células de bazo estimuladas con los péptidos de survivina survivin20-28 (SEQ ID NO: 67) y survivin97-104 (SEQ ID NO: 68) para cuantificar el IFN- γ que produce células T específicas de survivina.

10 Los resultados se muestran en la Figura 50. Los ratones vacunados con Z13Mad11Anaxa mostraron menos metástasis en comparación con los ratones naive (Fig. 50A). Además, en el bazo de los ratones vacunados con Z13Mad11Anaxa se observaron números significativamente más altos de células T específicas de survivina productoras de IFN- γ (Fig. 49B).

15 Los resultados obtenidos demuestran que Z13Mad11Anaxa es eficaz para reducir el número de metástasis y que Z13Mad11Anaxa puede promover la secreción de citocinas por las células T CD8 específicas de antígeno en el bazo.

Ejemplo 33: efecto de otra carga antigénica en el complejo de acuerdo con la presente invención

20 Para investigar el efecto de una carga antigénica diferente ("Mad9"), se diseñó otro complejo que comprendía un péptido de penetración celular, un antígeno diferente y un péptido agonista de TLR ("Z13Mad9Anaxa"). Z13Mad9Anaxa difiere de Z13Mad5Anaxa (descrito en el Ejemplo 7) en la carga antigénica. En particular, "Z13Mad9Anaxa" es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", la carga antigénica "Mad9" que comprende el neoantígeno identificado por Yadav et al. Nature. 2014 Nov 27;515(7528):572-6 de la línea celular tumoral MC-38, y el péptido agonista de TLR "Anaxa". A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos de Z13Mad9Anaxa con el péptido de penetración celular "Z13" subrayado y el péptido agonista de TLR "Anaxa" en cursiva:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLKHLELASMTNMELMSSIVSTVHEI
LCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE
(SEQ ID NO: 41)

25 Se vacunaron ratones naive C57BL/6 (4 ratones por grupo) cuatro veces s.c. (semana0, semana2, semana4 y semana6) con 2 nmol de Z13Mad9Anaxa. Para investigar la respuesta de las células T CD8 después de la vacunación, una semana después de la 4ª vacunación se sacrificaron los ratones, se recuperaron los órganos y se realizó el ensayo de Elispot en las células del bazo después de una reestimulación *in vitro* de 7 días con el péptido estimulador adpgk (SEC ID NO: 66) para cuantificar las células T CD8 específicas de epítipo que producen IFN- γ .

30 Los resultados se muestran en la Figura 51. Los ratones vacunados con Z13Mad9Anaxa mostraron un aumento significativo en las células T CD8 efectoras específicas de neoantígeno en comparación con los ratones naive.

Ejemplo 34: comparación de las respuestas inmunitarias después de la vacunación con complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular

35 En este experimento, se investigó el efecto de otros CPP diferentes en el complejo de acuerdo con la presente invención usando un complejo con el agonista de TLR "Anaxa". Así se empleó la proteína de fusión Z13Mad5Anaxa descrita anteriormente (ver el ejemplo 7, SEQ ID NO: 28).

40 Además, se diseñó una proteína de fusión adicional que comprendía el CPP TAT combinado con enlazadores de furina como se describe en Lu et al., Multiepitope trojan antigen peptide vaccines for the induction of antitumor CTL and Th immune responses J. Immunol., 172 (2004), pp. 4575-4582. Esa proteína de fusión también comprende la proteína "MAD5", que consiste en diferentes epítopos CD8⁺ y CD4⁺ de diversos antígenos, y el péptido agonista de TLR4 "Anaxa". En consecuencia, se diseñó además el siguiente constructo:

TatFMad5Anaxa

Secuencia:

RKKRRQRRRRVKRISQAVHAAHAEINEAGRRVKRKVPRNQDWLRVKRASFEAQGALANIAVD
KARVKRSIINFELRVKRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

(SEQ ID NO: 46)

5 Se asignaron ratones C57BL/6 a tres grupos diferentes (8 ratones por grupo): un grupo que recibió 2 nmol de Z13Mad5Anaxa, un grupo que recibió 2 nmol de TatFMad5Anaxa y un control respectivo. Los ratones fueron vacunados dos veces (semana0 y semana2) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de TatFMad5Anaxa. Los ratones se desangraron 7 días después de la 2ª vacunación y se realizó la tinción multimérica (8 ratones por grupo).

10 Los resultados se muestran en la Figura 52. Los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa o TatFMad5Anaxa mostraron un mayor porcentaje de células multiméricas positivas en comparación con el grupo de control. Estos resultados indican que los complejos de acuerdo con la presente invención con diferentes péptidos de penetración celular pueden provocar una respuesta inmune a diferentes dosis. Sin embargo, el CPP derivado de ZEBRA (Z13) fue mejor que el CPP TAT.

15 **Ejemplo 35: eficacia superior del constructo de fusión Z13Mad5Anaxa en comparación con Z13Mad5 y Anaxa en ratones naive**

20 A continuación, se investigó la eficacia de un complejo de acuerdo con la presente invención en ratones naive. A saber, se administró Z13Mad5Anaxa (véase el ejemplo 7; SEQ ID NO: 28) a un grupo de ratones, mientras que Z13Mad5 (SEQ ID NO: 29) y Anaxa (SEQ ID NO: 15) se administraron (ambos juntos) a otro grupo de ratones. Los ratones C57BL/6 del grupo Z13Mad5Anaxa y del grupo Z13Mad5 + Anaxa fueron vacunados una vez (semana0) s.c. por inyección de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (grupo 1) o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa (grupo 2). El día 14, se analizó la sangre, cuantificándose las células T CD8 específicas de SIINFELK en sangre mediante tinción multimérica (4 - 8 ratones por grupo).

25 Los resultados se muestran en la Figura 53. Se observó un porcentaje significativamente mayor de células T CD8 específicas de SIINFELK en la sangre de los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa en comparación con los ratones vacunados con Z13Mad5 y Anaxa por separado (Fig. 53).

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que la vacuna Z13Mad5Anaxa (en comparación con Z13Mad5 y Anaxa administrados por separado) era capaz de provocar una respuesta inmune de células T CD8 específica de SIINFELK más fuerte en la periferia.

Ejemplo 36: efecto de otra carga antigénica en el complejo de acuerdo con la presente invención

30 Para investigar el efecto de otra carga antigénica diferente ("Mad12"), se diseñó otro complejo que comprendía un péptido de penetración celular, un antígeno diferente y un péptido agonista de TLR ("Z13Mad12Anaxa"). Z13Mad12 Anaxa difiere de Z13Mad5Anaxa (descrito en el Ejemplo 7) en la carga antigénica. En particular, "Z13Mad12Anaxa" es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", la carga antigénica "MAD12" que comprende tres neoantígenos identificados por Yadav et al. Nature. 2014 Nov 27;515(7528):572-6 de la línea celular tumoral MC-38, y el péptido agonista de TLR "Anaxa". A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de Z13Mad12Anaxa:

KRYKNRVASRKSRAKFKQLQHRYEVAAAKSSENDRLRLLLKLFRAAQLANDVVLQIMEHLELA
SMTNMELMSSIVVISASIVFNLLLEGSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE
(SEQ ID NO: 69)

40 Ratones naive C57BL/6 (4 ratones por grupo) fueron vacunados dos veces s.c. (semana0, semana2) con 2 nmol de Z13Mad12Anaxa. Para investigar la respuesta de las células T CD8 después de la vacunación, una semana después de la 2ª vacunación se analizó la sangre, cuantificándose las células T CD8 específicas de repeticiones de neoantígeno 1 en sangre mediante tinción multimérica (4 ratones por grupo).

Los resultados se muestran en la Figura 54. Los ratones vacunados con Z13Mad12Anaxa mostraron un aumento significativo en las células T CD8 efectoras específicas de neoantígeno en comparación con los ratones naive.

Ejemplo 37: maduración *in vitro* de células dendríticas humanas

- 5 El objetivo de este estudio era investigar la capacidad de un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención ("Z13Mad5Anaxa", SEQ ID NO: 28, ver el ejemplo 7) para inducir la maduración de células dendríticas en comparación con un complejo que carece de un péptido agonista de TLR ("Z13Mad5", SEQ ID NO: 29, ver ejemplo 1).
- 10 El polipéptido Z13Mad5Anaxa y el polipéptido Z13Mad5 se investigaron por su capacidad para inducir la maduración de células dendríticas (DC) humanas. Después de incubación durante una noche con 300 nM de proteína, se evaluó la expresión de los marcadores de activación (CD86, CD80, CD83 y HLA-DR) en las DC humanas mediante FACS (Figura 55). Se usaron los mismos volúmenes de tampón de cada proteína como controles negativos.
- 15 Los resultados se muestran en la Fig. 55. Mientras que Z13Mad5Anaxa indujo la maduración de las DC humanas, que se muestra por la regulación positiva de CD86, HLADR y CD83, Z13Mad5 no pudo activar las DC humanas. Estos resultados indican que la porción Anaxa de la proteína es responsable de la regulación al alza de los marcadores de activación en las CD humanas.

TABLA DE SECUENCIAS Y NÚMEROS DE SEQ ID (LISTA DE SECUENCIAS)

SEQ ID NO	Secuencia	Observaciones
SEQ ID NO: 1	RQIKYFQNRMRMKWKK	CPP: Penetratina
SEQ ID NO: 2	YGRKKRRQRRR	CPP: TAT minima
SEQ ID NO: 3	MMDPNSTSEVDKFTDPYQVPFVQAFDQATRV YQDLGGPSQAPLPCVLWPVLPEPLPQGQLTAY HVSTAPTGSWFSAQPAPENAYQAYAAPQLFP VSDITQNNQTNQAGGEAPQPGDNSTVQTAA AVVFACPGANQGQQLADIGVPQPAPVAAPAR RTRKPQQPESLEECDSELEIKRYKNRVASRKCRK FKQLLQHYREVAANKSENDRLLRLKQMCPSL DVDSIIPRTPDVLHEDLLNF	secuencia aminoacídica de ZEBRA (secuencia natural del virus Epstein-Barr (EBV)) (YP_401673)
SEQ ID NO: 4	KRYKNRVASRKCRKFKQLLQHYREVAANKSSE NDRLLRLKQMC	CPP1 (Z11)
SEQ ID NO: 5	KRYKNRVASRKCRKFKQLLQHYREVAANKSSE NDRLLRLK	CPP2 (Z12)
SEQ ID NO: 6	KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAANKSSE NDRLLRLK	CPP3 (Z13)
SEQ ID NO: 7	KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAANK	CPP4 (Z14)
SEQ ID NO: 8	KRYKNRVASRKSRKFK	CPP5 (Z15)
SEQ ID NO: 9	QHYREVAANKSENDR	CPP6 (Z16)
SEQ ID NO: 10	QLLQHYREVAANK	CPP7 (Z17)
SEQ ID NO: 11	REVAANKSENDRLLRLK	CPP8 (Z18)
SEQ ID NO: 12	KRYKNRVA	CPP9 (Z19)
SEQ ID NO: 13	VASRKSRKFK	CPP10 (Z20)
SEQ ID NO: 14	ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGVGAL KVPRNQDWLGVPFAKFAFQAQALANIAVDK ANLDVEQLSEINFEKLTWTGS	cargo MAD5
SEQ ID NO: 15	STVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Anaxa péptido Agonista de TLR2
SEQ ID NO: 16	DDDK	Sitio diana de enteroquinasa
SEQ ID NO: 17	IEDGR	Sitio diana de factor Xa
SEQ ID NO: 18	LVPRGS	Sitio diana de trombina
SEQ ID NO: 19	ENLYFQG	Sitio diana de proteasa TEV
SEQ ID NO: 20	LEVLFQGP	Diana proteasa PreScission
SEQ ID NO: 21	RX(R/K)R	Sitio diana de furina
SEQ ID NO: 22	GGGGG	Enlazador peptídico
SEQ ID NO: 23	GGGG	Enlazador peptídico
SEQ ID NO: 24	EQLE	Enlazador peptídico
SEQ ID NO: 25	TEWT	Enlazador peptídico
SEQ ID NO: 26	MHHHHHHNIDRPKGLAFTDQVDSIKIA WESPQGQVSRYRVTYSSPEDGIRELPAP DGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDD MESQPLIGIQSTKRYKNRVASRKSRKFKQ LLQHYREVAANKSENDRLLRLKESLKISQ AVHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRN QDWLGVPFAKFAFQAQALANIAVDK ANLDVEQLSEINFEKLTWTGS	EDAZ13Mad5

SEQ ID NO: 27	MHHHHHHSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSA YGSVKPYTNFDAEKRYKNRVASRKSRAKF KQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKESLKI SQAVHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPR NQDWLGVPFAKFAFASFEAQGALANIAVD KANLDVEQLESIINFEKLTWGTGS	AnaxaZ13Mad5
SEQ ID NO: 28	MHHHHHHKRYKNRVASRKSRAKFKQLL QHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKESLKISQA VHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRNQD WLGVPFAKFAFASFEAQGALANIAVDKANL DVEQLESIINFEKLTWGTGSSTVHEILCKLSL EGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z13Mad5Anaxa
SEQ ID NO: 29	MHHHHHHKRYKNRVASRKSRAKFKQLL QHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKESLKISQAV HAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRNQD WLGVPFAKFAFASFEAQGALANIAVDKANL DVEQLESIINFEKLTWGTGS	Z13Mad5
SEQ ID NO: 30	MHHHHHHESLKISQAVHAAHAEINEAGREV VGVGALKVPRNQDWLGVPFAKFAFASFEAQ GALANIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTWGTG S	Mad5
SEQ ID NO: 31	MHHHHHHNIDRPKGLAFTDQDVDSIKIA WESPQGGVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAP DGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDD MESQPLIGIQSTESLKISQAVHAAHAEINE AGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPFAK FASFEAQGALANIAVDKANLDVEQLESIIN FEKLTWGTGS	EdaMad5
SEQ ID NO: 32	MHHHHHHESLKISQAVHAAHAEINEAG REVVGVGALKVPRNQDWLGVPFAKFAFAS FEAQGALANIAVDKANLDVEQLESIINFEK LTWGTGSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAY GSVKPYTNFDAE	Mad5Anaxa
SEQ ID NO: 33	MHHHHHHKRYKNRVASRKSRAKFKQLL QHYREVAAAKESLKISQAVHAAHAEINE AGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPFA KFASFEAQGALANIAVDKANLDVEQLESI INFEKLTWGTGSSTVHEILCKLSLEGDHST PPSAYGSVKPYTNFDAE	Z14 Mad5Anaxa
SEQ ID NO: 34	MHHHHHHREVAAAKSSSENDRLRLLLKES LKISQAVHAAHAEINEAGREVVGVGALKV PRNQDWLGVPFAKFAFASFEAQGALANIA VDKANLDVEQLESIINFEKLTWGTGSSTVH EILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDA E	Z18 Mad5Anaxa
SEQ ID NO: 35	SIINFEKL	SIINFEKL OVACD8
SEQ ID NO: 36	ISQAVHAAHAEINEAGR	péptido QVACD4
SEQ ID NO: 37	MHHHHHHNIDRPKGLAFTDQDVDSIKIA WESPQGGVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAP DGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDD MESQPLIGIQSTKRYKNRVASRKSRAKFKQ LLQHYREVAAAKESLKISQAVHAAHAEIN EAGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPFA KFASFEAQGALANIAVDKANLDVEQLESI INFEKLTWGTGS	EDAZ14Mad5

SEQ ID NO: 38	MHHHHHHNIDRPKGLAFTDQVDSIKIA WESPQGQVSRYRVITYSSPEDGIRELPAP DGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDD MESQPLIGIQSTREVAAAKSSENDRLRLLL KESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGVA LKVPRNQDWLGVPRAFASFQAQGALA NIAVDKANLDVEQLESIINFELTEWTGS	EDAZ18Mad5
SEQ ID NO: 39	KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAA KSSENDRLRLLLKVYHSPSYAYHQFERRA ILNRLVQFIKDRISVVQALVLTSTVHEILCK LSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z13Mad8Anaxa
SEQ ID NO: 40	KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKNYRIATFKNWPFLEDCAMEELTVSEFL KLDRQRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPY TNFDAE	Z13Mad11Anaxa
SEQ ID NO: 41	KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKHLEASMTNMELMSSIVSTVHEILCKLS LEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z13Mad9Anaxa
SEQ ID NO: 42	HLEASMTNMELMSSIV	Mad9
SEQ ID NO: 43	VTYHSPSYAYHQFERRAILN	Mad8
SEQ ID NO: 44	NYRIATFKNWPFLEDCAMEELTVSEFLKLD	Mad11
SEQ ID NO: 45	NIDRPKGLAFTDQVDSIKIAWESPQGQVSRYR VTYSSPEDGIRELPAPDGEDDTAELQGLRPGSEY TVSVVALHDDMESQPLIGIQST	EDA
SEQ ID NO: 46	RKKRRQRRRRVKRISQAVHAAHAEINEAGRVRK RKVPRNQDWLRVKRASFEAQGALANIAVDKAR VKRSIINFELRVKRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSA YGSVKPYTNFDAE	TatFMad5Anaxa
SEQ ID NO: 47	LEEKKGNYVTDHC	EGFRvIII epitope
SEQ ID NO: 48	MELQAARACFALLWGCALAAAAAQQGKEVLL DFAAAGGELGWLTHPYGKGWDLMQNIMND MPIYMYSVCNVMMSGDQDNWLRTNWVYRGEA ERIFIELKFTVRDCNSFPGGASSCKETFNLYAESD LDYGTNFQKRLFTKIDTIAPDEITVSSDFEARHVK LNVEERSVGPLTRKGFYLAQDIGACVALLSVRV YYKKCEPLLQGLAHFETIAGSDAPSLATVAGTC VDHAVVPPGGEPRMHCAVDGEWLVPICQCL CQAGYEKVEDACQACSPGFFKFEASESPCLECPE HTLPSPEGATSCECEEGFFRAPQDPASMPCTRPPS APHYLTAVGMGAKVELRWTPPQDSGGREDIVY SVTCEQCWPESGECGPCEASVRYSEPPHGLTRTS VTVSDLEPHMNYTFTVEARNGVSGLVTSRSFRTA SVSINQTEPPKVRLEGRSTTSLSVWSIPPPQQR VWKYEVTYRKKGDSNSYNVRRTEGFSVTLDDLA PDTTYLVQVQALTQEGQGAGSKVHEFQTLSP GSGNLAVIGGVAVGVVLLVLAGVGFFIHRRRK NQRARQSPEDVYFSKSEQLKPLKTYVDPHTYEDP NQAVLKFTTEIHPSCVTRQKVIGAGEFGEVYKG MLKTSSGKKEVPVIAIKTLKAGYTEKQRVDFLGEA GIMGQFSHHNIIRLEGVISKYKPMIITEYMENG ALDKFLREKDGESVLQVLGMLRGIAAGMKYLA NMNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRVL EDDPEATYTTS GGKIPRWTAPEAISYRKFTSASD VWSFGIVMWVMTYGERPYWELSNHEVMKAIN DGFRLPTPMDCPSAIYQLMMQCWQQRARRP KFADIVSILDKLIRAPDSLKTADFDPVRSIRLPSTS GSEGVPFRTVSEWLESIMQQYTEHFMAAGYTAI EKVVQMTNDDIKRIGVRLPGHQKRIAYSLGLK DQVNTVGIPI	EphA2

SEQ ID NO: 49	MDLVLRKRLHLAVIGALLAVGATKVP RNQDW LGVSRLRTKAWNRLQYPEWTEAQR LDCWRG GQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFGSQKVL PDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQPVYPQETDD ACIFPDGGPCPSGSWSQKRSEVYVWKTWGQY WQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGHTMEVTYVHR RGSRSYVPLAHSSSAFTITDQVPFSVSVQLRALD GGNKHFLRNQPLTFALQLHDPSCYLAEADLSYT WDFGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGPVTAQVVL QAAIPLTSCGSSPVP GTTDGHRPTAEAPNTTAG QVPTTEVVGTPGQAPTAEPSTGTSVQVPTTEVI STAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEM STPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVET TARELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGTAT LRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQGIESAEIL QAVPSGEGDAFELTVSCQGGPKAEACMEISSPG CQPPAQRLCQPVLPSPACQLVLHQILKGGSGTY CLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPL IVGILLVLMVVLASLIYRRRLMKQDFSVPLPHS SSHWLRLPRIFCSCPIGENSPLLSGQQV	Gp100
SEQ ID NO: 50	MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGDMKL RLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYP TNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNRVQVPLQRL RIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGA SPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTI LWKDIFHKNNQLALTIDTNRSRACHPCSPMCK GSRCWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPT DCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNHSGICE LHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTYFGASCVTA CPYNYLSTDVGSCTLVCPHNLQEVTAEDGTQRC EKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFA GCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQV FETLEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRI LHNGAYSLTLQGLGISWLGRLSRELGSGLALIH HNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPE DECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCS QFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHP ECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFPCV ARCPGSGVKPDLSPYMPIWKFPDEEGACQPCPINC THSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLV VLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPL TPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGT VYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEIL DEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLM PYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCMIQAKG MSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFG LARLLDIDETEHADGGKVPIKWMASILRRRFT HQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIP DLLEKGERLPQPICTIDVYMIMVKCWMIDSECR PRFRELVSFESRMARDPQRFVVIQNE DLGPASPL DSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVQQGFFCP DPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGDLTLGLEP SEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGKL QSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLT CSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGA TLERPCTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLT QGGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPER GAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV	Her2/neu

SEQ ID NO: 51	MPRAPRCRAVRSLRSHYREVLPLATFVRRLGQ GWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCPWDARPP PAAPSFQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLA GFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRG SGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSC AYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRLG CERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRS LPLPKRPRRGAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRG PSDRGFCVVSAPARPAEATSLEGALSGTRHSHPS VGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHF LYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGS RPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFELLGNH AQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQ GSVAAPEEEDTPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFV RACLRLVPPGLWGSRHNERRFLRNTKKFISLGK HAKLSLQELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPA AEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLSFFYVTETT FQKNRLFFYRKSWSKLQSIGIRQLKRVQLREL SEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVNLNERAR RPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPP ELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIAIIPQNTY CVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQP YMRQFVAHLQETSPLRDVAVIEQSSSLNEASSGL FDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIQGSILST LLCSLCYGD MENKLFAGIRRDGLLRVDDFLV TPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLKTVVNF PVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLDTRL EVQSDYSSYARTSIRASLTENRGFKAGRNMRRL FGVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQA YRFHACVLQLPFHQVWKNPTFLRVISDTASL CYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLC HQAFLKLTRHRTYVPLLGSLRTAQTLRSRKL GTTLTAAEAAANPALPSDFKTILD	hTert
SEQ ID NO: 52	MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLGAC TPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFCKELEGW EPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTGEFL KLDREKAKNIAKETNNKKKEFEETAKKVRAIEQ LAAMD	survivina
SEQ ID NO: 53	RISTFKNWPF	epitopo survivina
SEQ ID NO: 54	MSPLWWGFLSCLGCKILPGAQQGFPRVCMTV DSL VNKECCPRLGAESANVCGSQQGRGQCTEV RADTRPWSCPYILRNQDDRELWPRKFFHRTCKC TGNFAGYNCGDCKFGWTGPNCERKKPPVIRQ NIHSLSPQEREQFLGALDLAKKRVPDYVITTQH WVGLLGPNGTQPQFANCSVYDFFVWLHYYSV RDTLLGGFFPWLVVYVYRFVIGLRVWQWEVISC KLIKRAATTRQP	TRP-2
SEQ ID NO: 55	MGVKASQTGFVVLVLLQCCSAYKLVCYYTSWS QYREGDGSCFPDALDRFLCTHIIYSFANISNDHI DTWEWNDVTLYGMLNTLKNRNP NLKTLLSVG GWNFGSQRFKSIASNTQSRRTFIKSVPPFLRTHG FDGLDLAWLYPGRRDKQHFTTLIKEMKAEFIKEA QPGKKQLLSAALSAGKVTIDSSYDIKISQHLDF ISIMTYDFHGAWRGTGHHSPFLRGQEDASPDR FSNTDYAVGYMLRLGAPASKLVMGIPTFGRSFTL ASSETGVGAPISGPGIPGRFTKEAGTLAYYEICDFL RGATVHRILGQQVPYATKGNQWVGYYDDQESV KSKVQYLKDRQLAGAMVWALDLDLDFQGSFCG QDLRFPLTNAIKDALAAT	YKL-40

SEQ ID NO: 56	MAQLFLPLLAALVLAQAPAAADVLEGDSSDR AFRVRIAGDAPLQGVLGALTIPCHVHYLRPPPS RRAVLGSPRVKWTFLSRGAEVLVARGVRVKV NEAYRFRVALPAYPASLTDVSLALSELRPNDSGIY RCEVQHIGIDSSDAVEVKVKGVVFLYREGSARY AFSFGAQEACARIGAHIAATPEQLYAAYLGGYEQ CDAGWLSAQTVRYPIQTPREACYGDMGDFPG VRNYGVVDPDDLVDVYCYAEDLNGELFLGDPP EKLTLLEARAYCQERGAEIATTGQLYAAWDGGL DHCSPGWLADGSVRYPIVTPSQRCCGGGLPGVK TLFLFPNQTGFPNKHSRNFVYCFRDSAQPSAIE ASNPASNPASDGLAIVTVTETLEELQLPQEATESE SRGAIYSIPIMEDGGGGSSTPEDPAEAPRTLLEFET QSMVPPTGFSEEEGKALEEEEEKYEDEEEKEEEEEEE VEDEALWAWPSELSSPGPEASLPTEAAQEESLSQ APARAVLQPGASPLPDGESEASRPVRVHGPPTET LPTPRERNLASPSPSTLVEAREVGEATGGPELSGV PRGESEETGSSEGAPSLPATRAPEGTRELEAPSED NSGRTPAGTSVQAQPVLPDTSASRGGVAVVP ASGDCVPSPCHNGGTCLLEEEGVRLCLPGYGG DLCDVGLRFCNPGWDAFQGACYKHFSTRRSW EEAETQCRMVGAHLASISTPEEQDFINNRYREYQ WIGLNDRTIEGDFLWSDGVPLLYENWNPGQPD SYFLSGENCVMVMWHDQGWSDVPCNYHLS YTCKMGLVSCGPPPELPLAQVFGRPLRYEVDTV LRYRCREGLAQRNPLIRCQENGRWEAPQISCV RRPARALHPEEDPEGRQGRLLGRWKALLIPPSSP MPGP	brevican
SEQ ID NO: 57	MSRPQGLLWLPPLFTPVCVMLNSNVLLWLTALAI KFTLIDSQAQYPVNTNYGKIRGLRTPNEILGP VEQYLGVPYASPTGERRFQPEPPSSWTGIRNT TQFAAVCPQHLDERSLLHDMPLIWFTANLDTLM TYVQDQNEDECLYLNIVPTEDDIHDQNSKKPV MVYIHHGGSYMEGTGNMIDGSILASYGNVIVITIN YRLGILGFLSTGDQAAKGNYGLLDQIQALRWIE ENVGAFGGDPKRVTFGSGAGASCVSLTLSHYS EGLFQKAIQSGTALSSWAVNYQPAKYTRILADK VGCNMLDTTDMVECLRNKNYKELIQQTITPATY HIAFGPVIDGDVIPDDPQILMEQGEFLNYDIML GVNQGEGLKFVDGIVDNEDCVTPNDFDFSVSN FVDNLYGYPEGKDTLRETIKFMYTDWADKENPE TRRKTLLVALFTDHQWVAPAVATADLHAQYCGSP TYFYAFYHHCQSEMKPWSADSAHGDEVYVFG IPMIGPTLFCNFSKNDVMLSAAVMTYWTNFA KTGDPNQVPVQDTKFIHTKPNRFEEVAWSKYNP KDQLYLHIGLKPRVRDHYRATKVAFWLELVPHL HNLNEIFQYVSTTTKVPPPDMSFPYGTTRSPAKI WPTTKRPAITPANNPKHSDPHKTGPEDTTVLIE TKRDYSTELSVTIAGASLLFLNILAFAALYYKKDK RRHETHRRPSPQRNTTNDIAHIQNEEIMSLQMK QLEHDHECESLQAHDTLRLTCPPDYTLTLRRSPD DIPLMTPNTITMIPNTLTGMQPLHTFNTFSGGQ NSTNLPHGHSTTRV	Neuroigin 4

SEQ ID NO: 58	<p>MRILKRFLACIQLLCVCRLDWANGYYRQQRKLV EEIGWSYTGALNQKNWGKKYPTCNSPKQSPINI DEDLTQVNVNLKKLFQGWDKTSLENTFIHNT GKTVEINLTNDYRVSGGVSEMFVFKASKITFHWG KCNMSSDGSEHSLEGQKFPLEMQIYCFDADRF SFEEAVKGGKGLRALSILFEVGTENLDFKAIIDGV ESVSRFGKQAALDPFILLNLLPNSTDKYIYNGSL TSPPCTDTVDWIVFKDTSISESQLAVFCEVLT QQSGYVMLMDYLQNNFREQQYKFSRQVFSSYT GKEEIHEAVCSSEPENVQADPENYTSLLVTWERP RVVYDTMIEKFAVLQQLDGEDQTKHEFLTDGY QDLGAILNNLLPNMSYVLQIVAICTNGLYGKYS DQLIVDMPTDNPELDLPELIGTEEIIKEEEEGKDIE EGAIVNPGRDSATNQIRKKEPQISTTTTHYNRIGT KYNEAKTNRSPTRGSEFSGKGDVPNTSLNSTSQP VTKLATEKDISLTSQTVTELPHTVEGTSASLNDG SKTVLRSPHMNLSGTAESLNTVSITEYEEESLLTSFK LDTGAEDSSGSPATSAIPFISENISQGYIFSSENPE TITYDVLIPESARNASEDSTSSGSEESLKDP SMEGNVWFPSSTDITAQPDVGSGRESFLQTNYTEIRVDE SEKTTKSFSAGPVMSQGPSVTDLEMPHYSTFAYF PTEVTPHAFTPSSRQQLVSTVNVVYSQTTQPV YNGETPLQPSYSSEVFPLVTPLLDNQILNTTPAA SSSDSALHATPVFSPVDVSFESILSSYDGAPLLPFSS ASFSELFRHLHTVSQILPQVTSATESDKVPLHASL PVAGGDLLLEPSLAQYSDVLSTTHAASETLEFGSE SGVLYKTLMFQVEPPSSDAMMHARSSGPEPSY ALSDNEGSQHIFTVSYS SAIPVHDSVGVTYQGS LFSGPSHIPKSSLITPTASLLQPTHALSGDGEWSG ASSDSEFLLPD TDLTALNISSPVSAEFTYTSVF GDDNKALSKSEIYGN ETELQIPSFNEMVYPSEST VMPNMYDNVNKLNASLQETS VSISSTKGMFPGS LAHTTTKVFDHEISQVPENNFSVQPTHVTSQAS GDTSLKPVLSANSEPASSDPASSEMLSPSTQLLFYE TSASFSTEVL LQPSFQASD VDTLTKTVLPAVPSDPI LVETPKVDKISSTMLHLIVSNSASSENMLHSTSV PVFDVSP TSHMHSASLQGLTISYASEKYEPVLLKSES SHQVVPSLYSND ELFQTANLEINQAHPPKGRHV FATPVLSIDEPLNTLINKLIHSDEILTSTKSSVTGKV FAGIPTVASDTFVST DHSVPIGNGHVAITAVSPH RDGSVTSTKLLFPSKATSELSHSAKSDAGLVGGG EDGDTDDDGDDDDDDRGSDGLSIHKCMSCSS YRESQEKVMNDS DTHENSLMDQNNPISYSLSEN SEEDNRVTSVSSDSQTGM DRSPGKSPSANGLSQ KHNDGKEENDIQTGSALLPLSPESKAWAVLTSDE ESGSGQGTSDSLNENETSTDFSFADTNEKDADGI LAAGDSEITPGFPQSPSTSSVTS ENSEVFHVSEAEAS NSSHESRIGLAEGLESEKKAVIPLVIVSALT FICLVV LVGILYWRKCFQTAHFYLEDSTSPRVISTPPTPIFP</p>	PTPRz1
---------------	--	--------

	ISDDVGAIPKHFPHVADLHASSGFTEEFETLKEF YQEVQSCTVDLGITADSSNHPDNKHKNRYINIV AYDHSRVKLAQLAEKDGKLTIDYINANYVDGYN RPKAYIAAQGPLKSTAEDFWRMIWEHNVEVIVM ITNLVEKGRRKCDQYWPADGSEYGNFLVTQKS VQVLAYYTVRNFTLRNTKIKKGSQKGRPSGRVV TQYHYTQWPDMDGVPEYSLPVLTFVRKAAYAKR HAVGPVVVHCSAGVGRGTGYIVLDSMLQQIQH EGTVNIFGFLKHRSQRNYLVQTEEQYVFIHDTL VEAILSKETEVLDSHIIHAYVNALLIPGPAGKTKLEK QFQLLSQSNIQSDYSAAALKQCNREKNRTSSIIIP VERSRVGISSLSGEGTDYINASYMGYYQSNFIIIT QHPLLHTIKDFWRMIWDHNAQLVVMIPDGQN MAEDFVYWPKNDEPINCESFKVTLMAEEHKCLS NEEKLIQDFILEATQDDYVLEVRHFQCPKWPNP DSPISKTFELISVIKEEAANRDGPMIVHDEHGGVT AGTFCALTTLMHQLEKENSVDVYQVAKMINLM RPGVFADIEQYQFLYKVILSLVSTRQEENPSTSLDS NGAALPDGNIAESLES LV	
SEQ ID NO: 59	MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPAT EEQEAASSSTLVEVTLGEVPAESPDPQSPQGA SSLPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEEGPSTFPDLES EFQAALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGS VVGWNWQYFFPVIFSKAFSSLQLVFGIELMEVDPIG HLYIFATCLGLSYDGLLDGNQIMPKAGLLIIVLAIJ AREGDCAPEEKIWEELSVLEVFEGREDSILGDPKK LLTQHFEVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRA LVETSYYKVLHHMVKISGGPHISYPPLHEWVLR GEE	MAGE-A3
SEQ ID NO: 60	KVAELVHFL	epítopo MAGE-A3
SEQ ID NO: 61	MAFVCLAIGCLYTFLLSTTFGCTSSSDTEIKVNPPQ DFEIVDPGYLGYLYLQWQPPLSLDHFKECTVEYE LKYRNIGSETWKTITKNLHYKDGFDLNKGIEAKI HTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWISPGGIPET KVQDMDCVYYNWQYLLCSWKPGIGVLLDTNY NLFYWYEGLDHALQCVDYIKADGQNGICRFPY LEASDYKDFYICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNI KPLPPVYLTFTRESSCEIKKWSIPLGPIPARCFDYEI EIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNETRQLCFVVR SKVNIYCSDDGIWSEWSDKQCWEGEDLSKKTLL RFWLPFGFILVIFVTGLLLRKPNTYPKMIPEFFCD T	IL13Ralpha2
SEQ ID NO: 62	LPFGFIL	epítopo IL13Ralpha2
SEQ ID NO: 63	LFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTNMELMSSI VVISASIIVFNLELEG	Mad12
SEQ ID NO: 64	LVQFIKDRISVVQA	péptido gp70CD4
SEQ ID NO: 65	SPSYVYHQF	péptido gp70CD8
SEQ ID NO: 66	ASMTNMELM	péptido adpgk
SEQ ID NO: 67	ATKNWPFL	survivina20-28
SEQ ID NO: 68	TVSEFLKL	survivina97-104
SEQ ID NO: 69	KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKLFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTN MELMSSIVVISASIIVFNLELEGSTVHEILCKLSLEG DHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE	Z13Mad12Anaxa

REIVINDICACIONES

1. Complejo que comprende:
 - a) un péptido de penetración celular;
 - b) al menos un antígeno o epítipo antigénico; y
 - c) al menos un péptido agonista de TLR,

donde los componentes a) – c) están unidos de forma covalente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma.
2. Complejo para su uso según la reivindicación 1, donde el complejo es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante.
3. Complejo para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde el péptido de penetración celular
 - i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferiblemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferiblemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y/o
 - ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el residuo 170 hasta el residuo 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos, eliminados y/o añadidos sin abrogar dicha capacidad de penetración celular del péptido, o una variante de la misma.
4. Complejo para su uso según la reivindicación 3, donde el péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según las SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13), SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14), SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15), o SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18), o variantes de secuencia de las mismas sin que vea abrogada dicha capacidad de penetración celular, en particular variantes de secuencia de las mismas que tienen al menos un 70% de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 80% de identidad de secuencia y más preferentemente al menos un 90% de identidad de secuencia sin abrogar dicha capacidad de penetración celular del péptido.
5. Complejo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el al menos un antígeno o epítipo antigénico comprende o consiste en al menos un epítipo tumoral, preferentemente al menos un epítipo de glioma.
6. Complejo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el complejo comprende más de un antígeno o epítipo antigénico, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más antígenos o epítopos antigénicos, preferiblemente donde los más de un antígeno o epítipo antigénico, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más antígenos o epítopos antigénicos, están dispuestos consecutivamente en el complejo.
7. Complejo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, donde el al menos un epítipo tumoral es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo consistente en EGFRvIII, EphA2, gp100, Her2/neu, IL-13R α 2, survivina, hTert, TRP2, MAGE-A1, MAGE-A3, YKL-40, brevicin, neuroligina 4 y PTPRz1.
8. Complejo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, donde el complejo comprende
 - a) uno o más epítopos de EGFRvIII o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - b) uno o más epítopos de EphA2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - c) uno o más epítopos de Her2/neu o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - d) uno o más epítopos de IL-13R α 2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - e) uno o más epítopos de survivina o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - f) uno o más epítopos de TRP-2 o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - g) uno o más epítopos de brevicin o variantes de secuencia funcionales de los mismos;
 - h) uno o más epítopos de neuroligina 4 o variantes de secuencia funcionales de los mismos y/o
 - i) uno o más epítopos de PTPRz1 o variantes de secuencia funcionales de los mismos.
9. Complejo para su uso según la reivindicación 8, donde el complejo comprende

- a) un fragmento de EGFRvIII que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
 - b) un fragmento de EphA2 que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
 - 5 c) un fragmento de Her2/neu que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
 - d) un fragmento de IL-13Rα2 que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
 - 10 e) un fragmento de survivina que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
 - f) un fragmento de TRP-2 que comprenda uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
 - 15 g) un fragmento de neurologina 4 que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
 - h) un fragmento de brevicin que comprenda uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos; y/o
 - i) un fragmento de PTPRz1 que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos.
- 20 10. Complejo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, donde al menos un epítopo tumoral es un epítopo de un neoantígeno, preferentemente un epítopo de un neoantígeno específico de glioma.
- 25 11. Complejo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el al menos un péptido agonista de TLR es un péptido agonista de TLR2, TLR4 y/o TLR5, preferentemente un péptido agonista de TLR2 y/o un péptido agonista de TLR4, con mayor preferencia el al menos un péptido agonista de TLR comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 15 o una variante de secuencia de la misma, en particular una variante de secuencia de la misma que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 80% de identidad de secuencia y en particular al menos un 90% identidad de secuencia sin abrogar dicha capacidad agonista de TLR.
- 30 12. Ácido nucleico que codifica el complejo tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en la prevención y/o tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, donde el complejo es un polipéptido o una proteína.
13. Vector que comprende el ácido nucleico como se define en la reivindicación 12 para su uso en la prevención y/o tratamiento del del glioma, en particular del glioblastoma.
14. Célula huésped que comprende el vector como se define en la reivindicación 13 para su uso en la prevención y/o tratamiento del del glioma, en particular del glioblastoma.
- 35 15. Célula cargada con un complejo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en la prevención y/o tratamiento del glioma, en particular del glioblastoma, donde dicha célula preferentemente es una célula presentadora de antígeno, más preferiblemente una célula dendrítica.
- 40 16. Composición que comprende al menos una de:
- i) un complejo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;
 - ii) un ácido nucleico como se define en la reivindicación 12;
 - iii) un vector como se define en la reivindicación 13;
 - iv) una célula huésped como se define en la reivindicación 14; o
 - v) una célula cargada con un complejo como se define en la reivindicación 15
- 45 para su uso en la prevención y/o tratamiento del del glioma, en particular del glioblastoma, donde la composición preferentemente es una vacuna.
17. Composición farmacéutica que comprende al menos un complejo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o al menos una célula como se define en la reivindicación 15, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención y/o el tratamiento del del glioma, en particular del glioblastoma.
- 50 18. Combinación de
- i) un complejo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y
 - ii) un agente quimioterapéutico, un medicamento dirigido y/o un agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de punto de control inmune

para su uso en la prevención y/o el tratamiento del del glioma, en particular del glioblastoma.

- 5 **19.** Kit que comprende el complejo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, la célula como se define en la reivindicación 15, la composición como se define en la reivindicación 16 y/o la composición farmacéutica como se define en la reivindicación 17 para su uso en la prevención y/o el tratamiento del del glioma, en particular del glioblastoma.

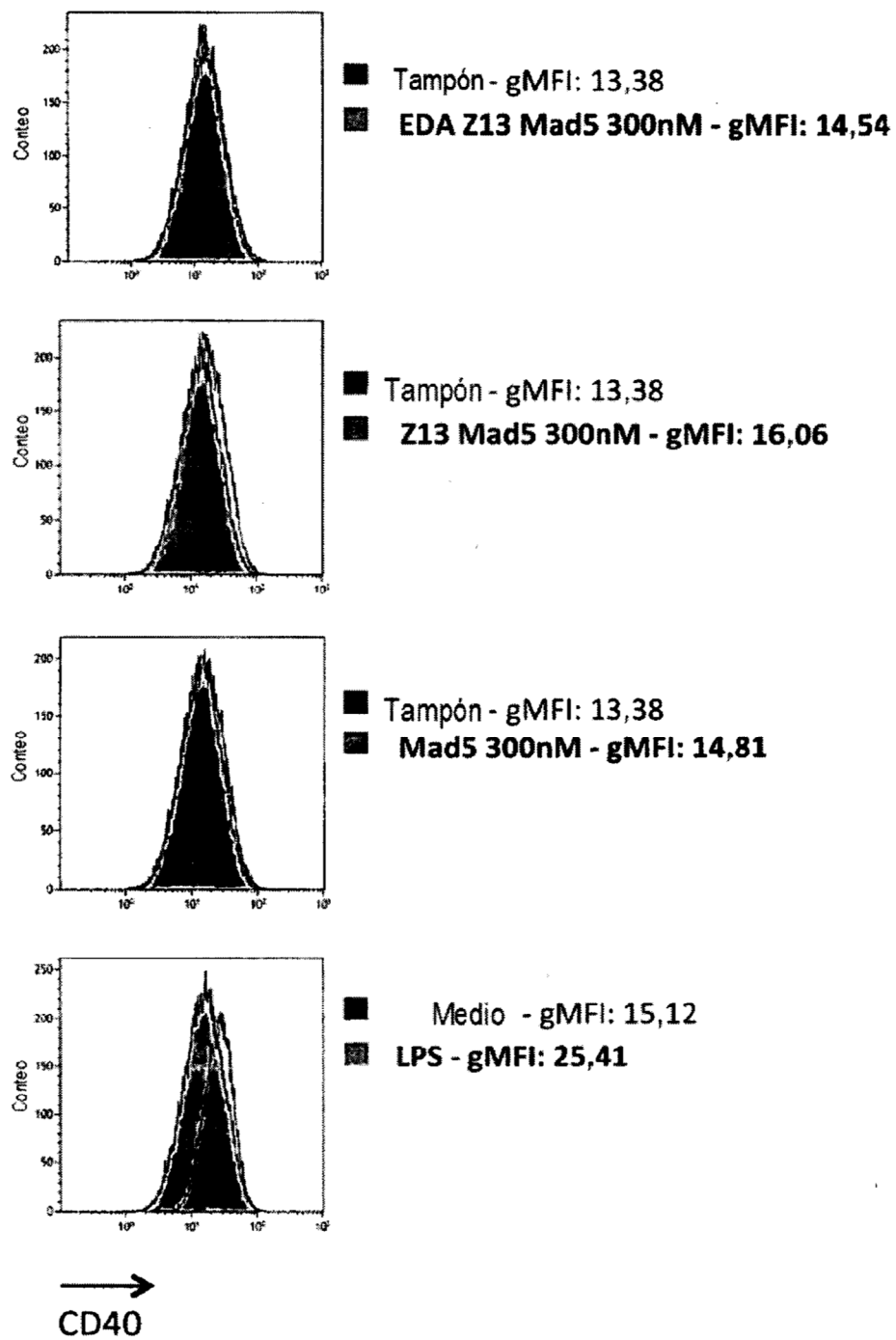


Fig. 1

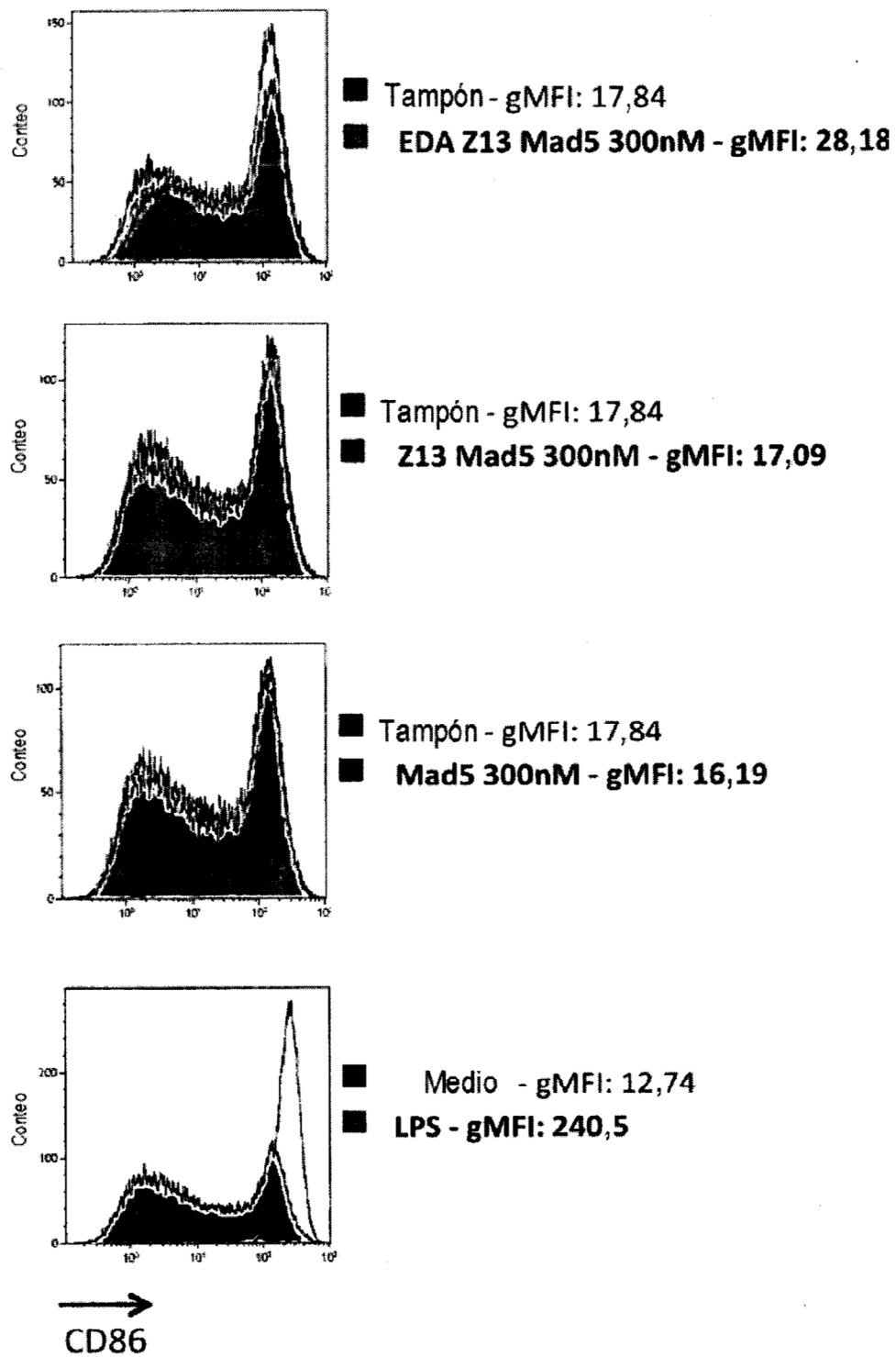


Fig. 2

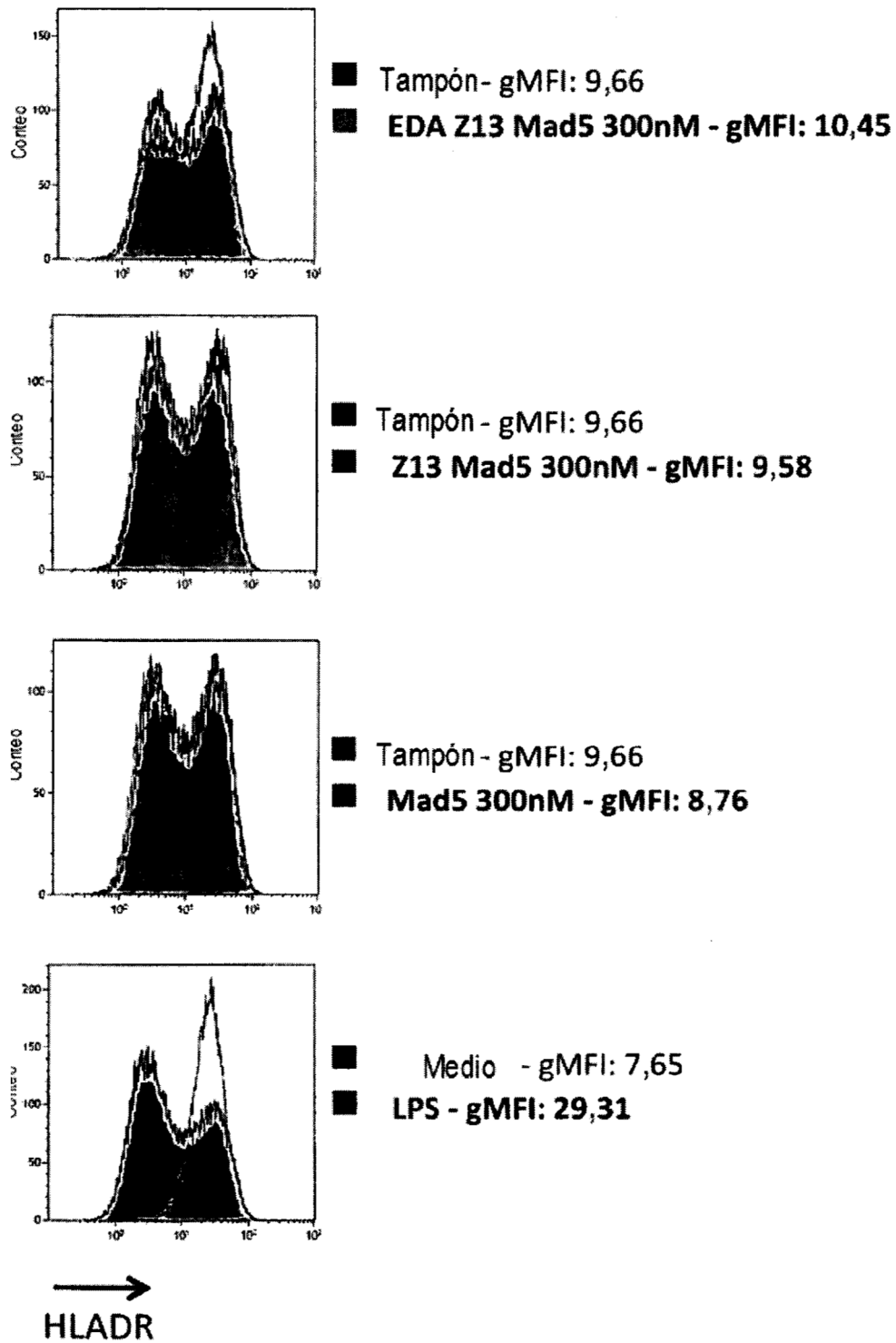


Fig. 3

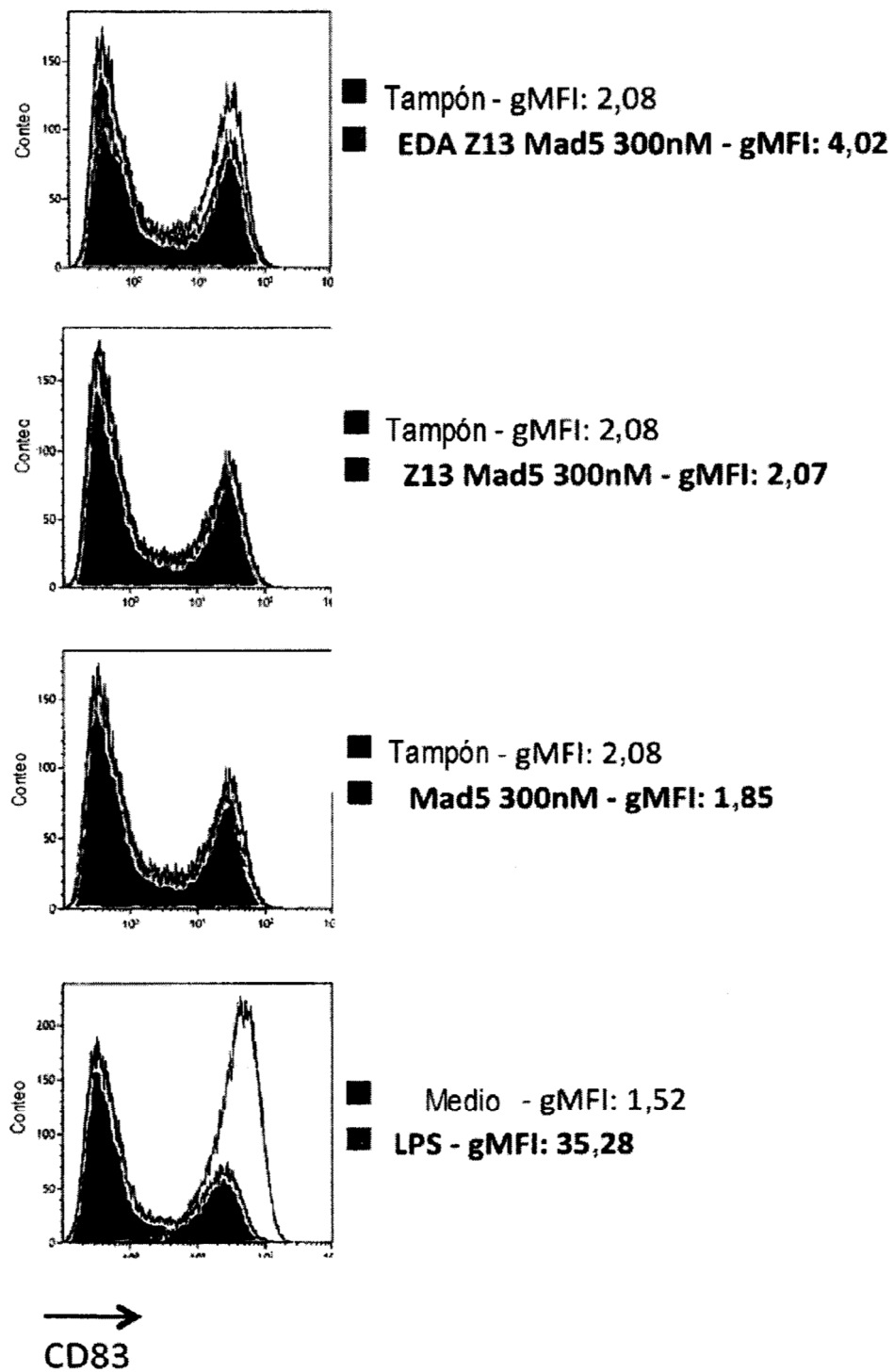


Fig. 4

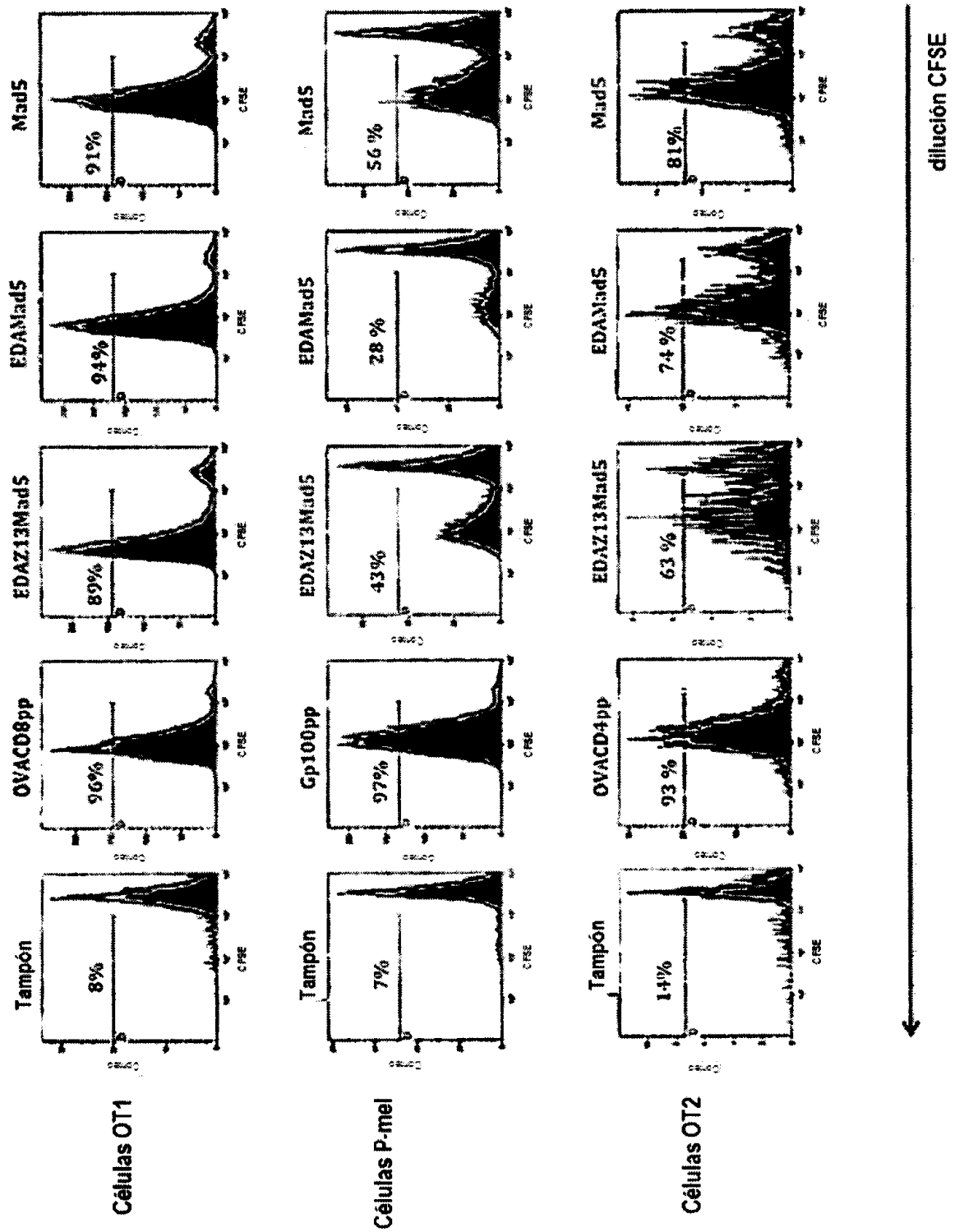
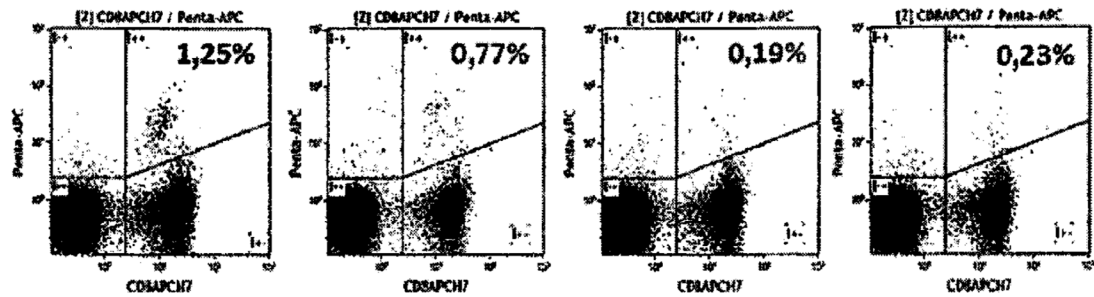
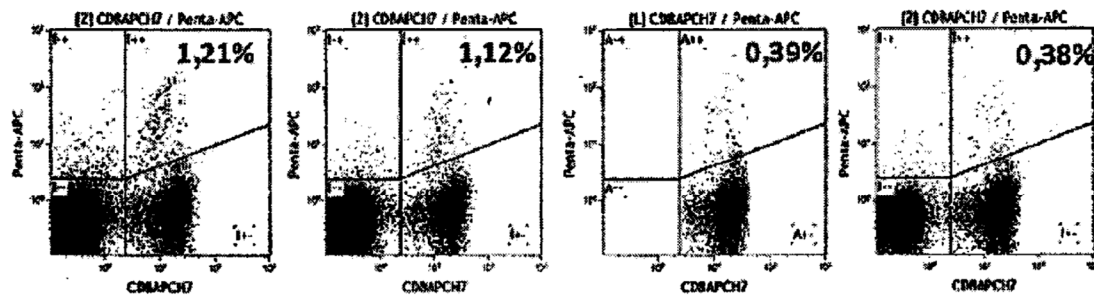


Fig. 5

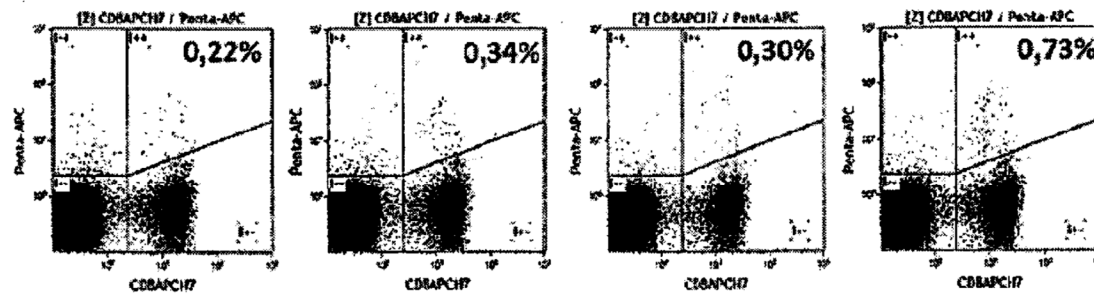
2 nmol de proteína inyectada
EDA-MAD5



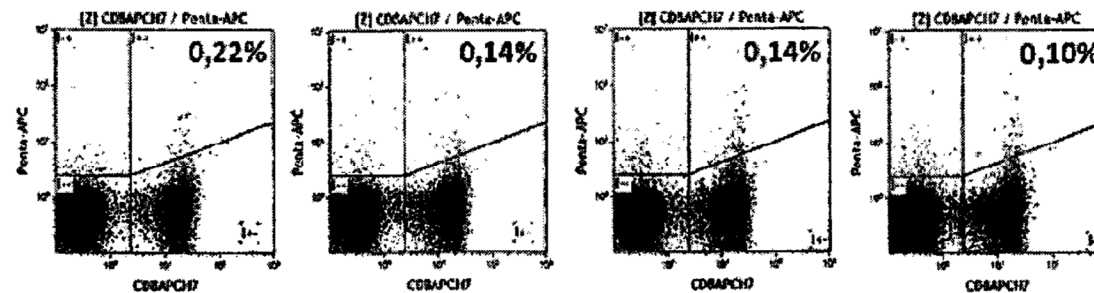
EDA-Z13-MAD5



MAD5+MPLA



Sin tratamiento

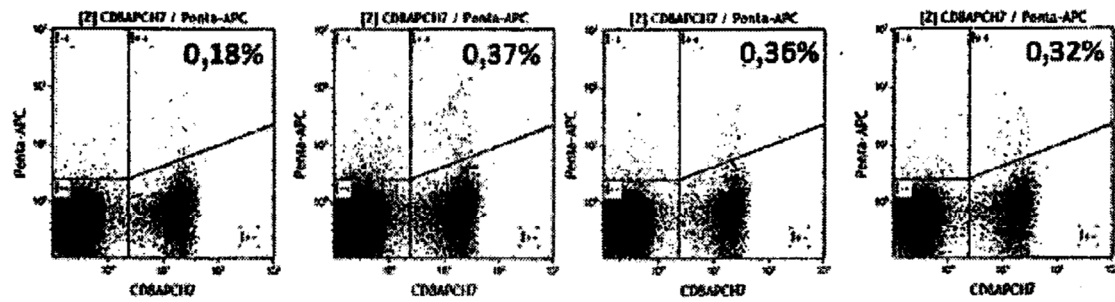


Pentámero
CD8

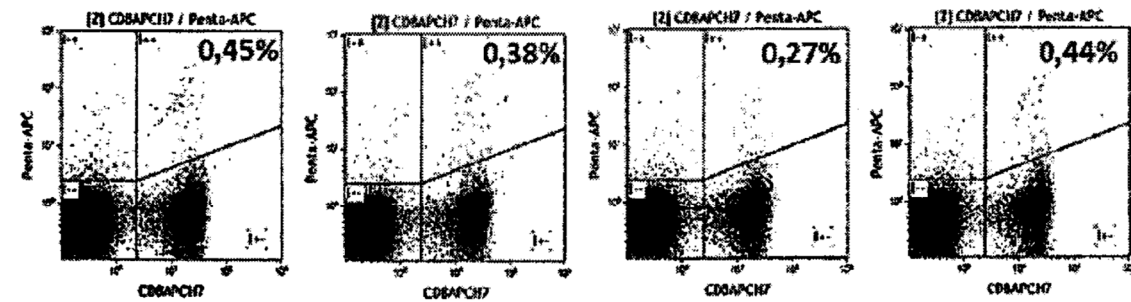
Fig. 6

10 nmol de proteína inyectada

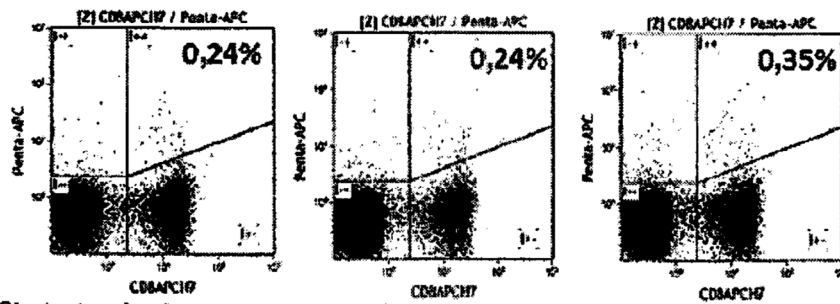
EDA-MAD5



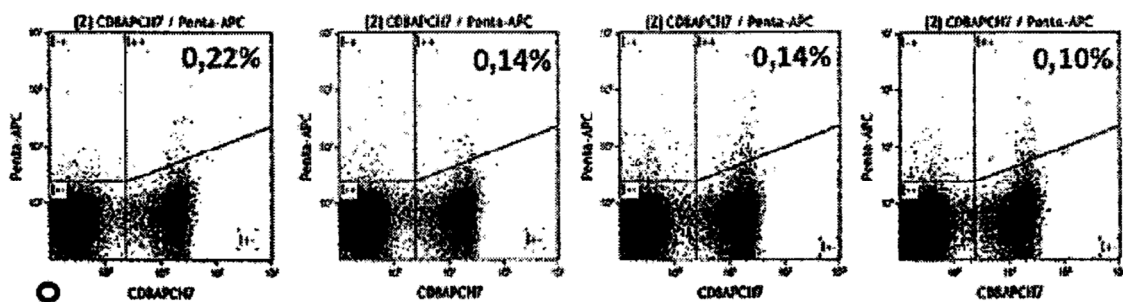
EDA-Z13-MAD5



MAD5+MPLA



Sin tratamiento



Pentámero
CD8

Fig. 7

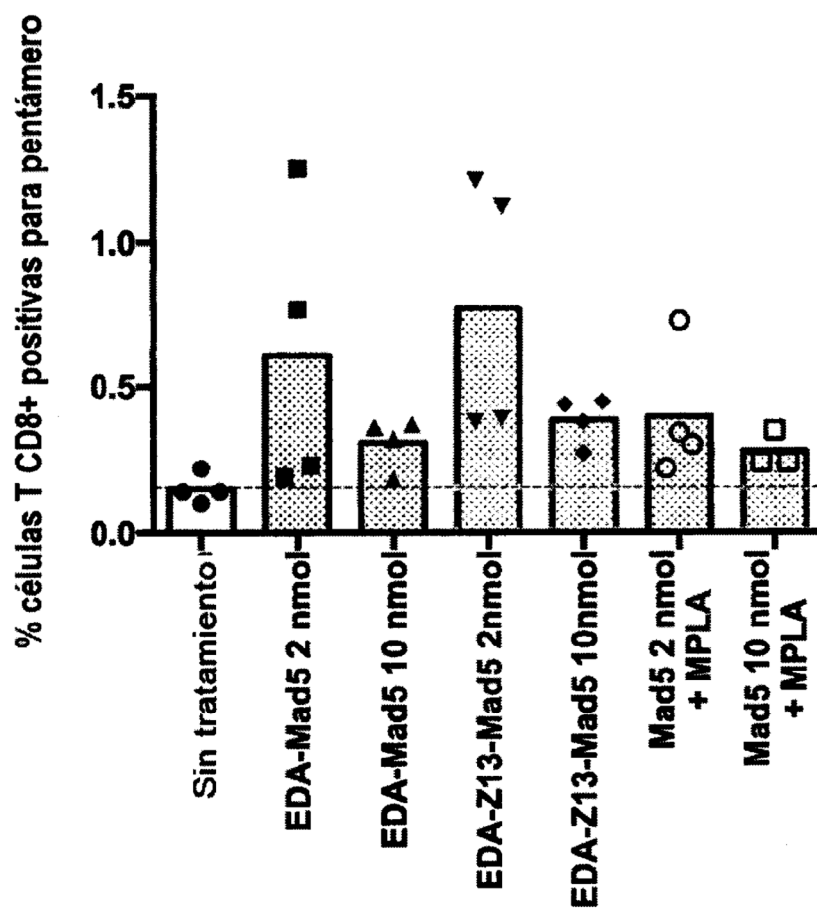


Fig. 8

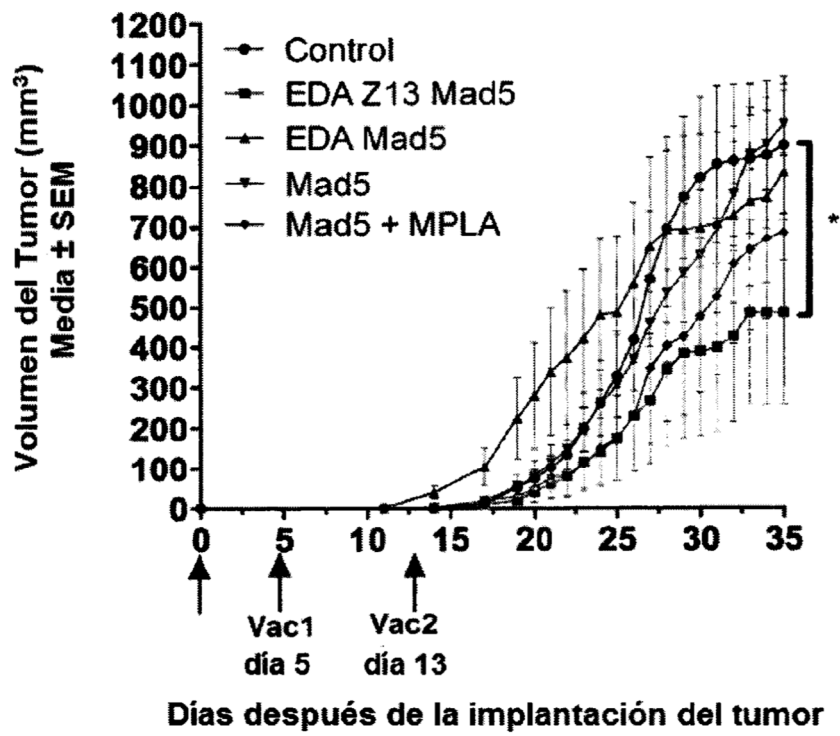


Fig. 9

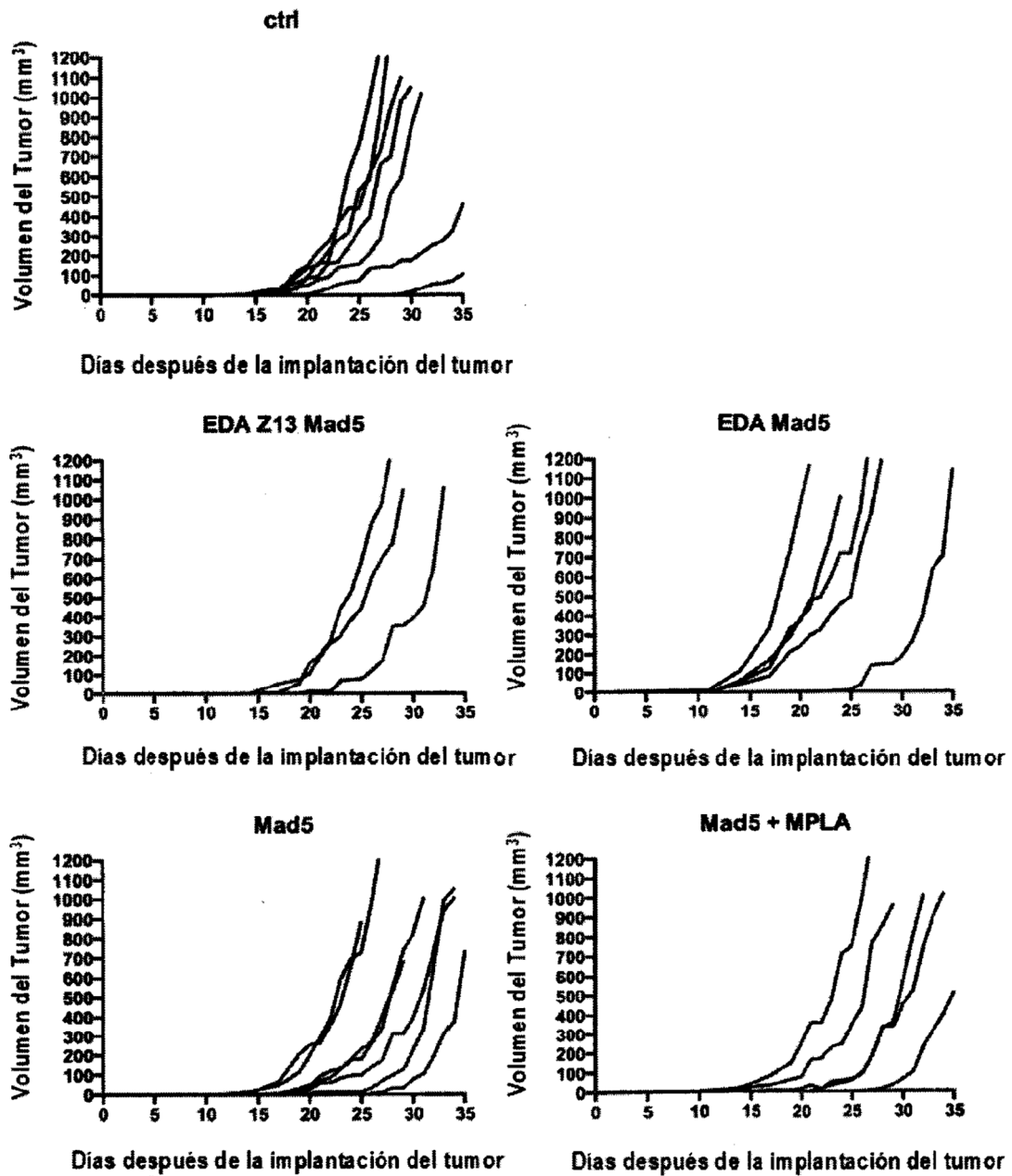


Fig. 10

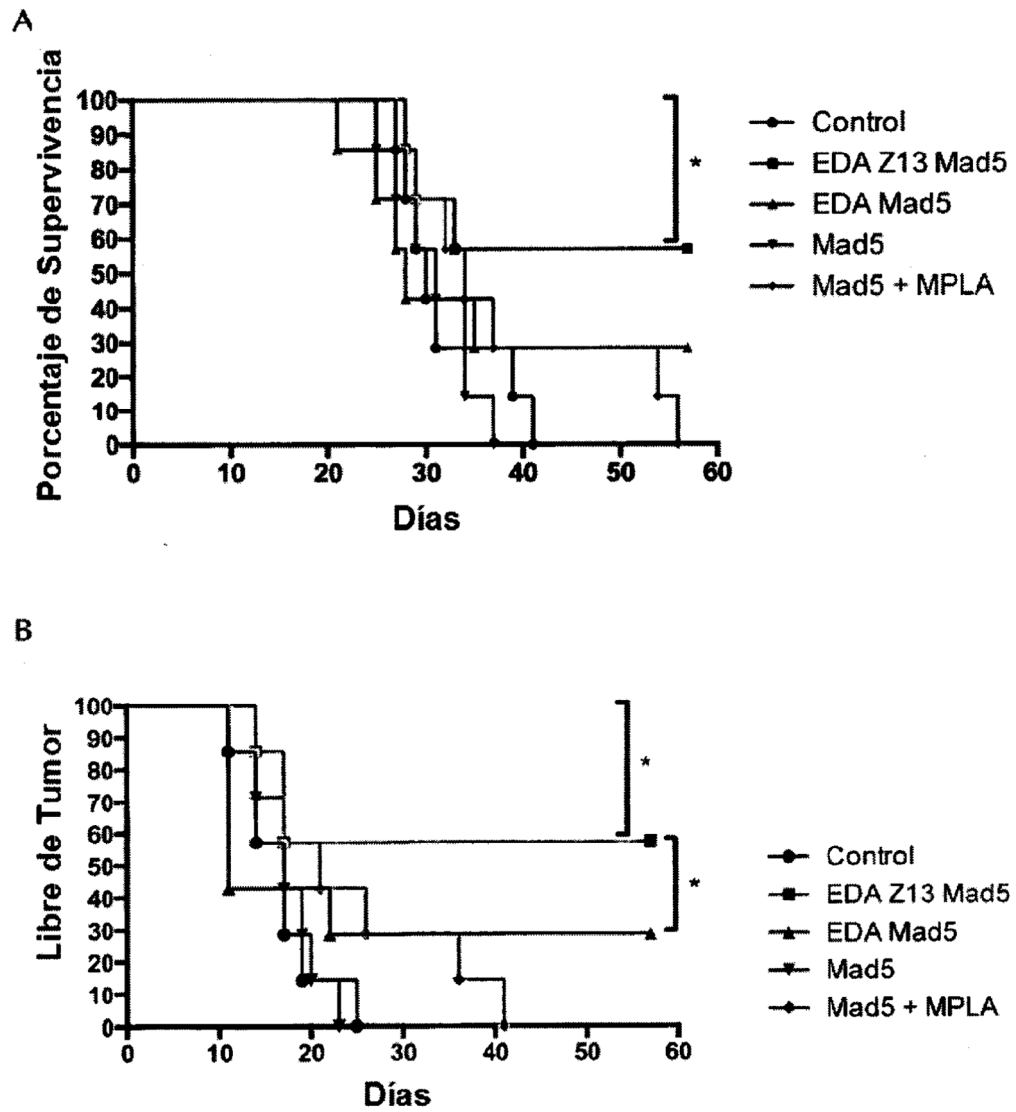


Fig. 11

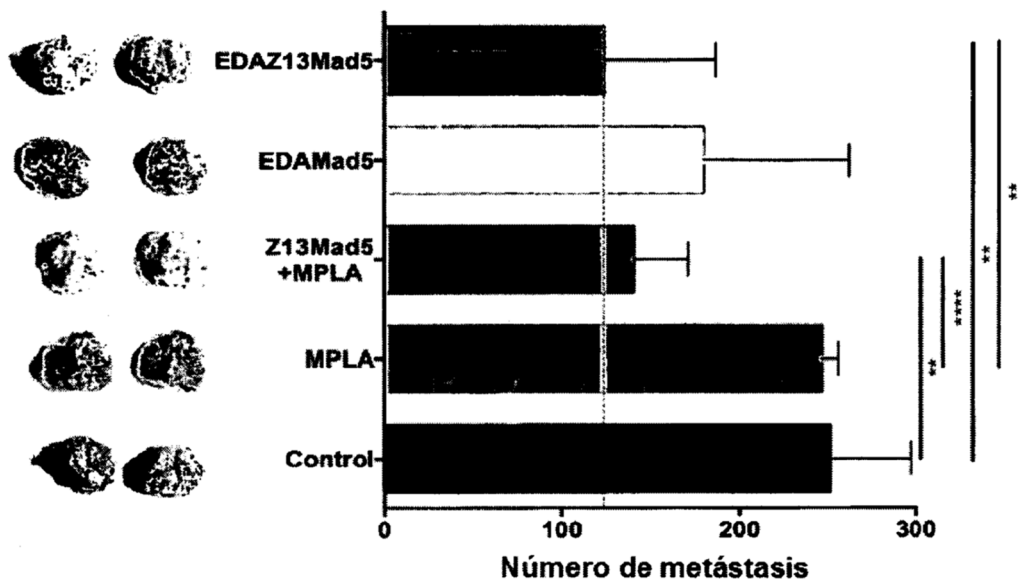


Fig. 12

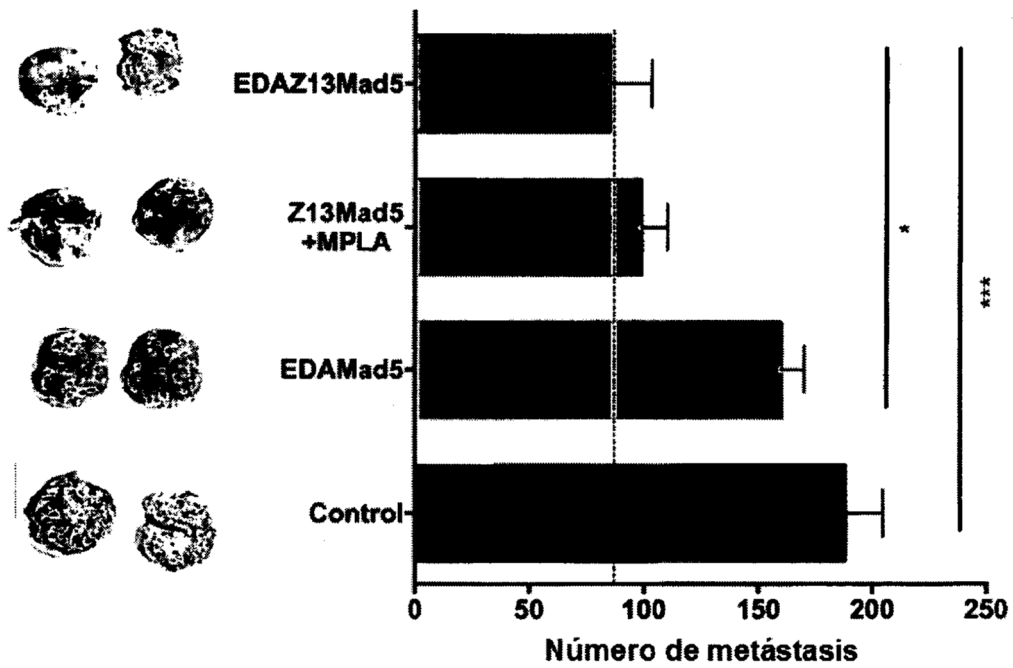


Fig. 13

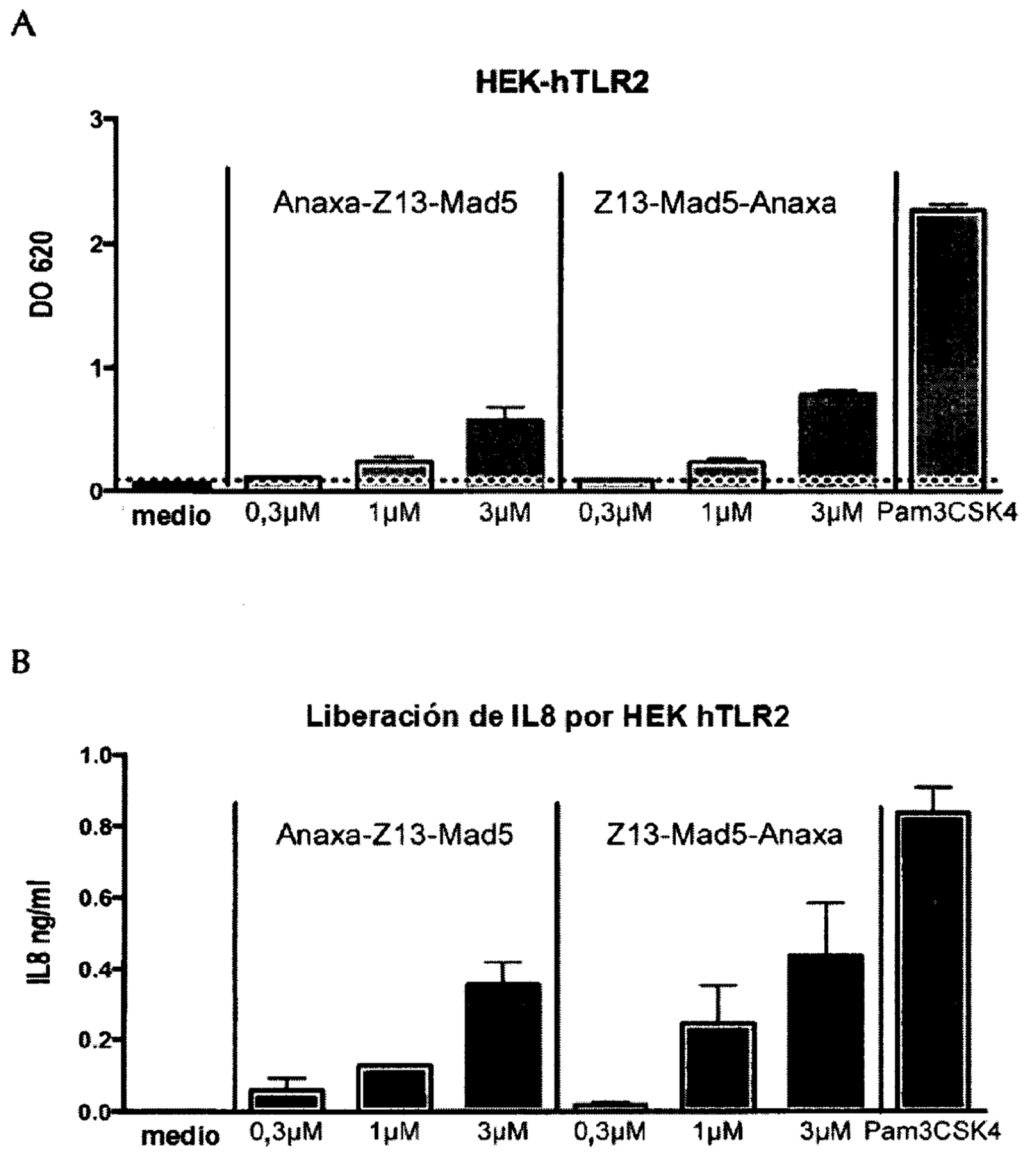
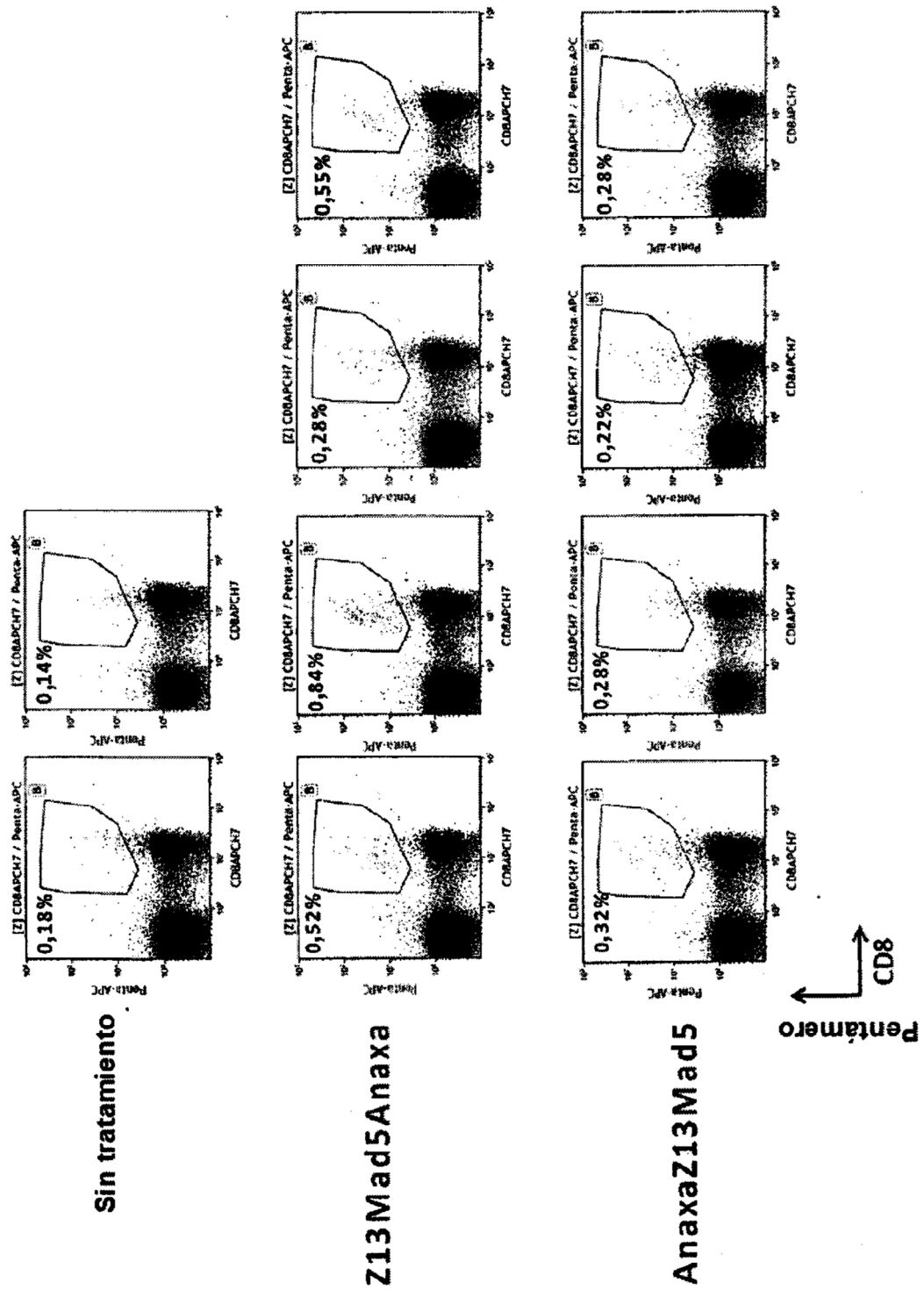


Fig. 14



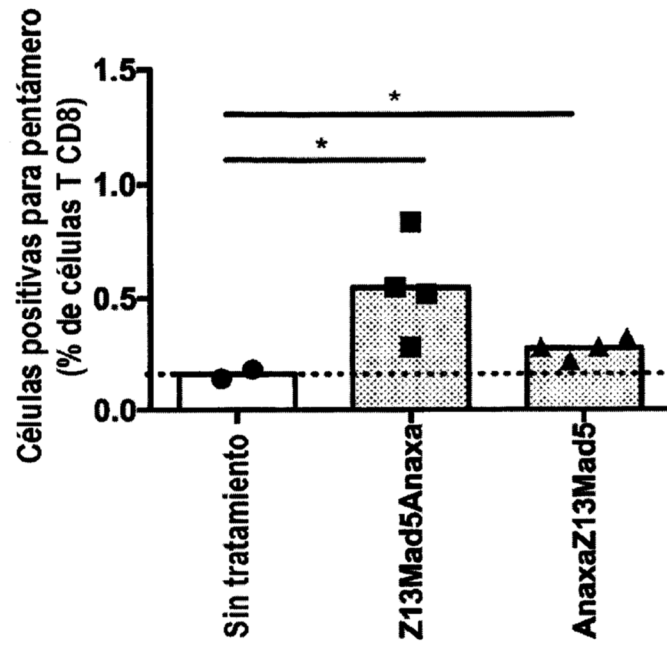


Fig. 16

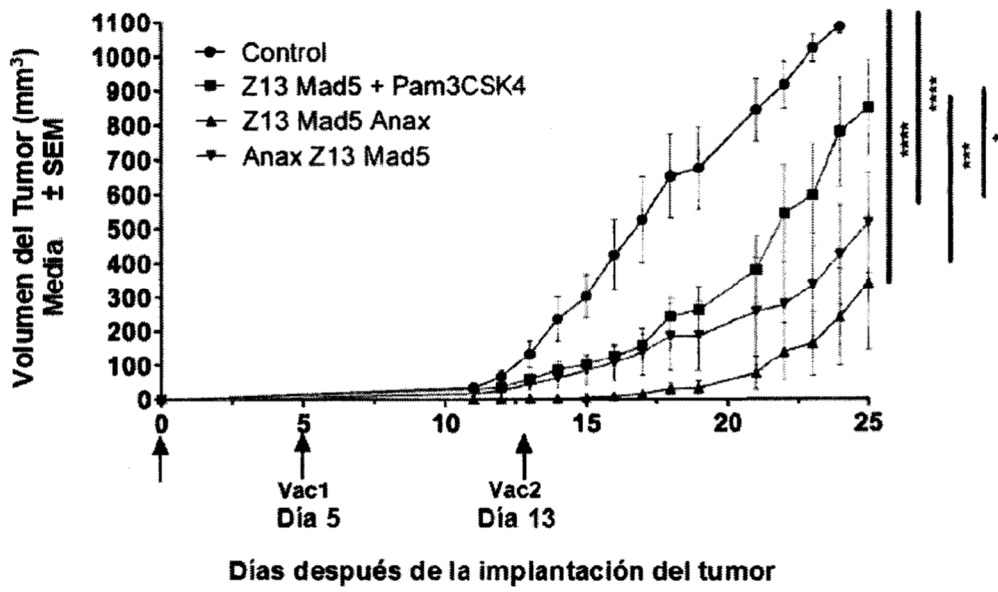


Fig. 17

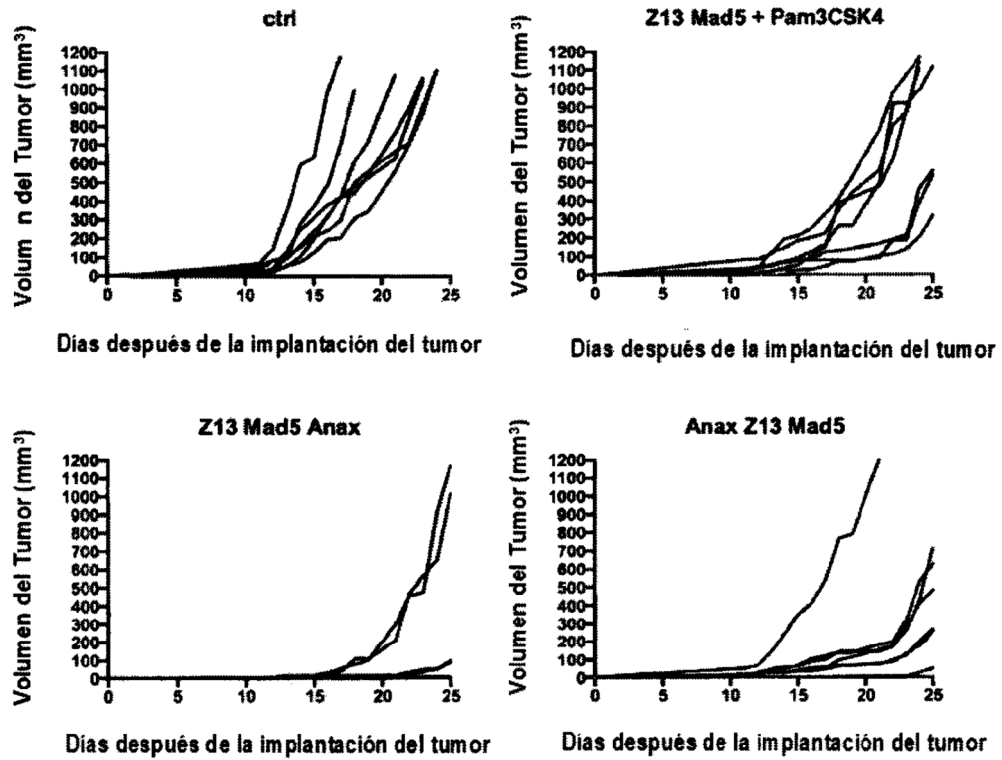


Fig. 18

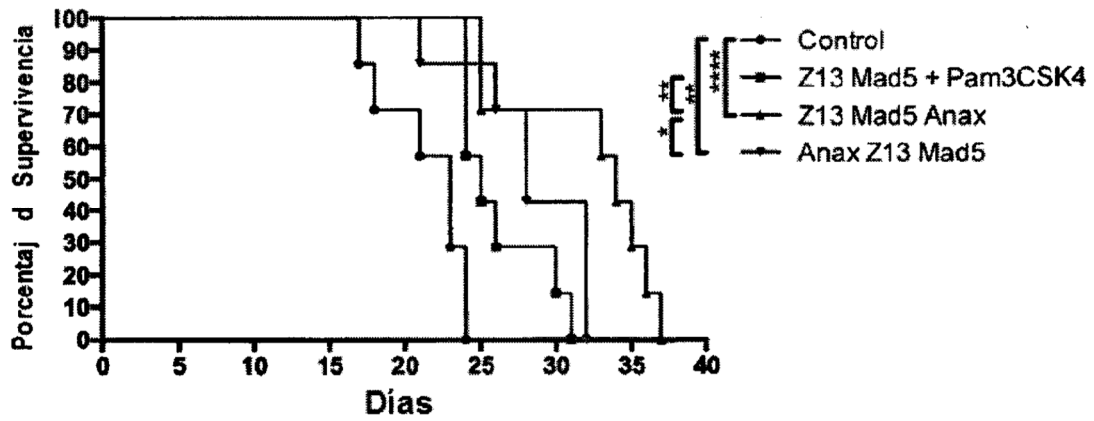


Fig. 19

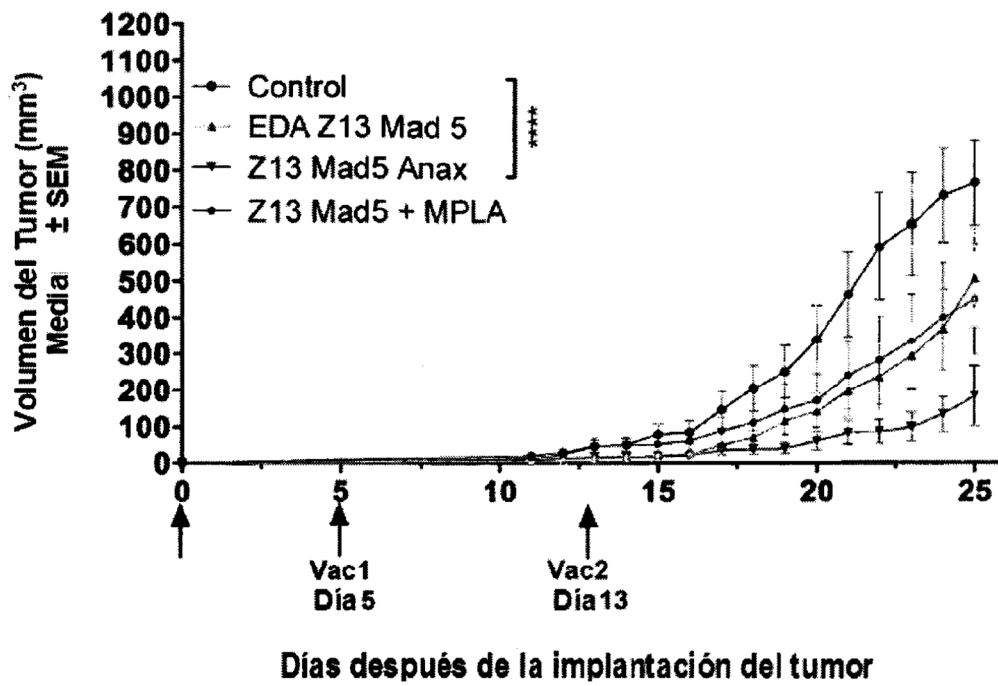


Fig. 20

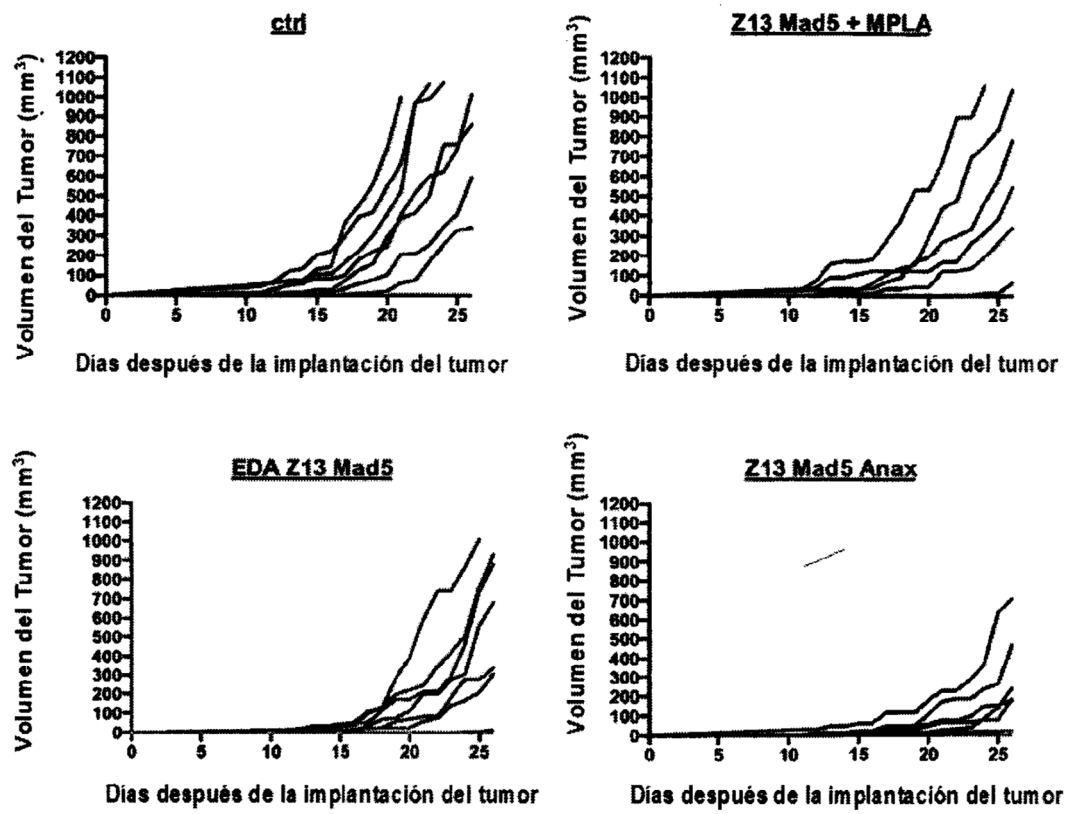


Fig. 21

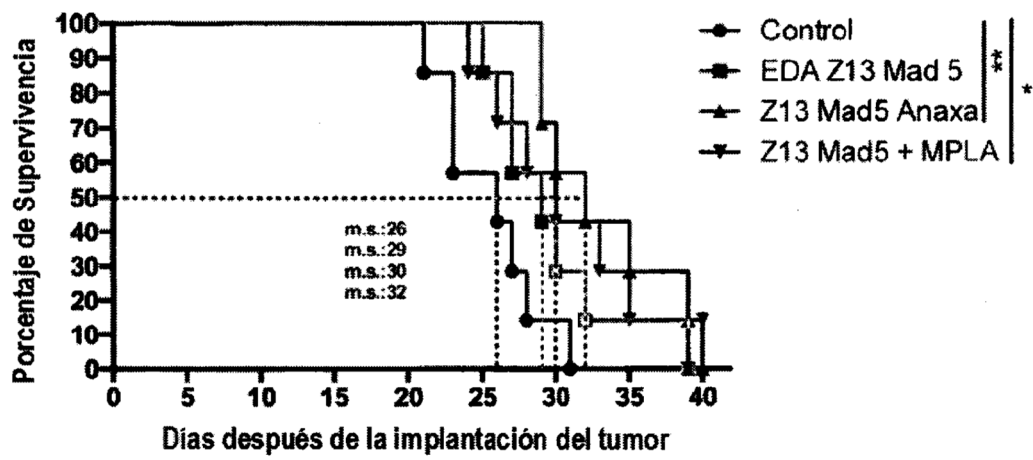


Fig. 22

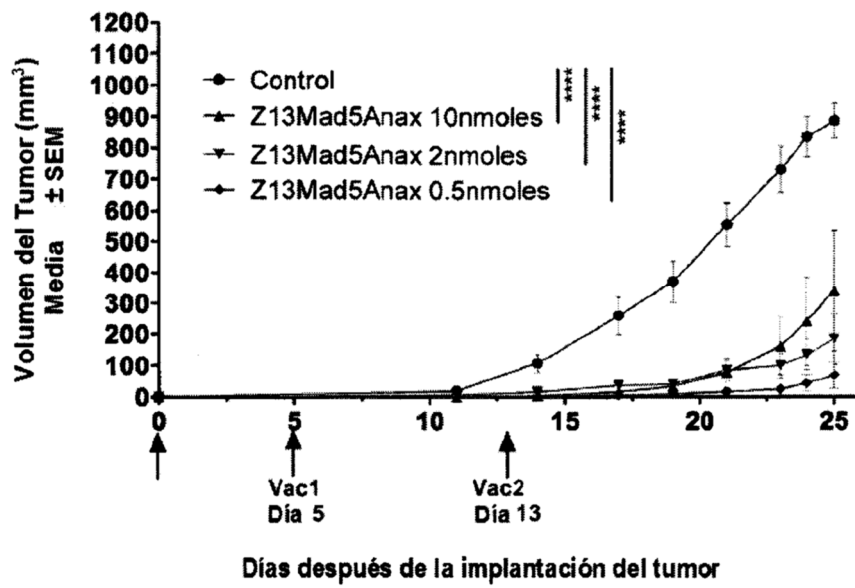
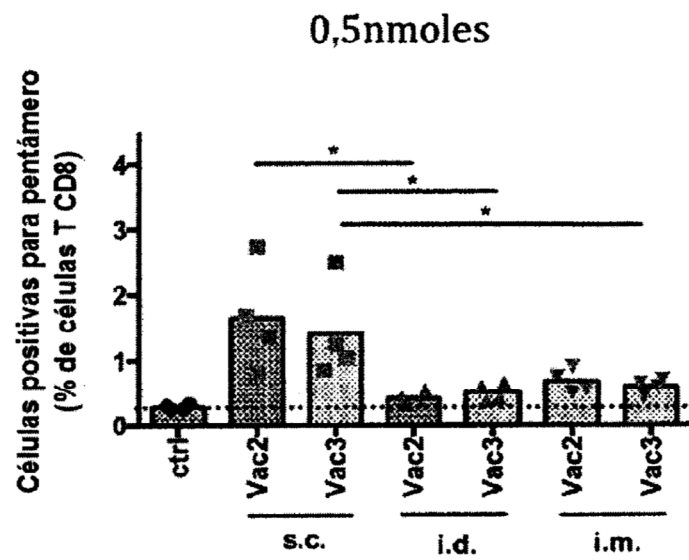


Fig. 23

A



B

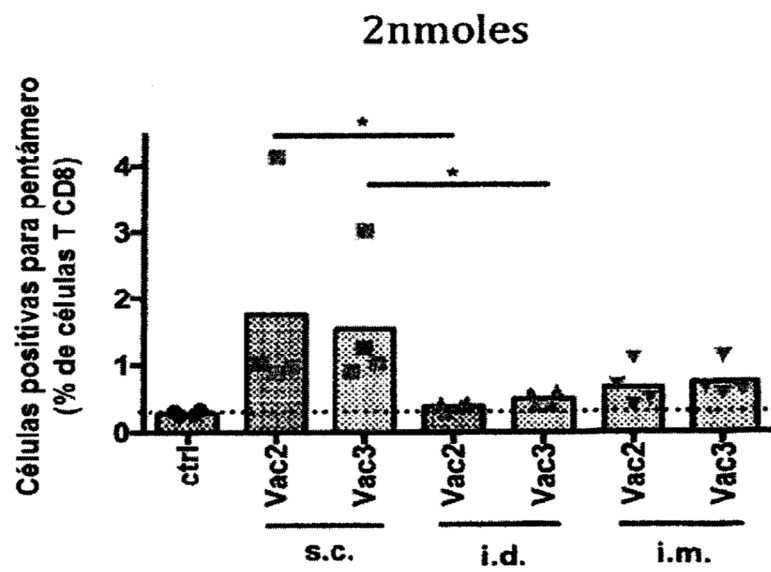
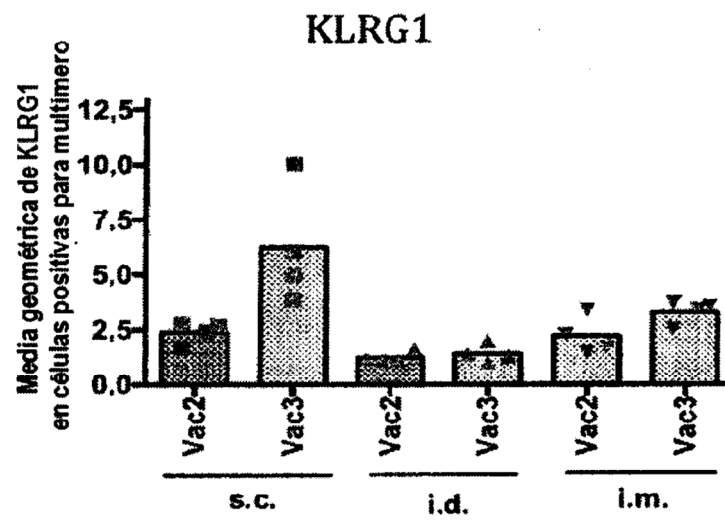


Fig. 24

A



B

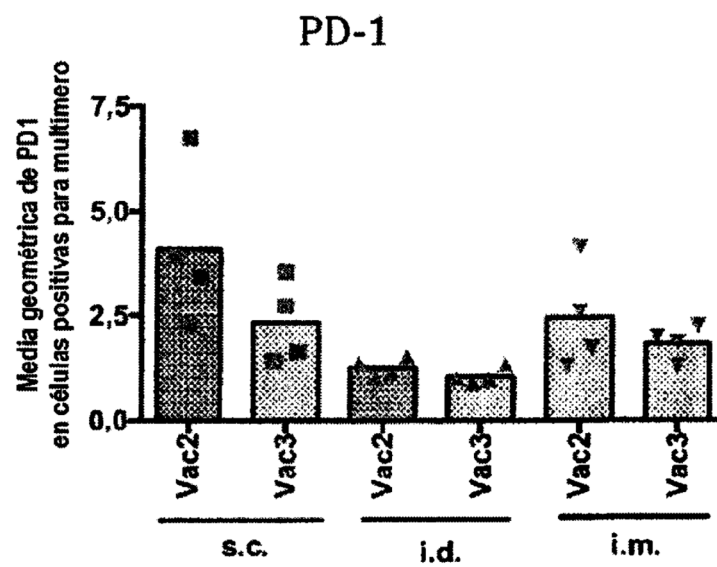


Fig. 25

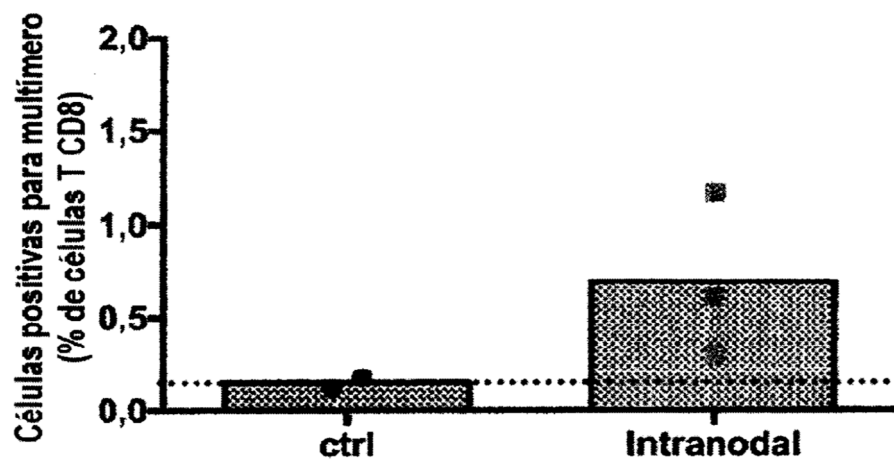


Fig. 26

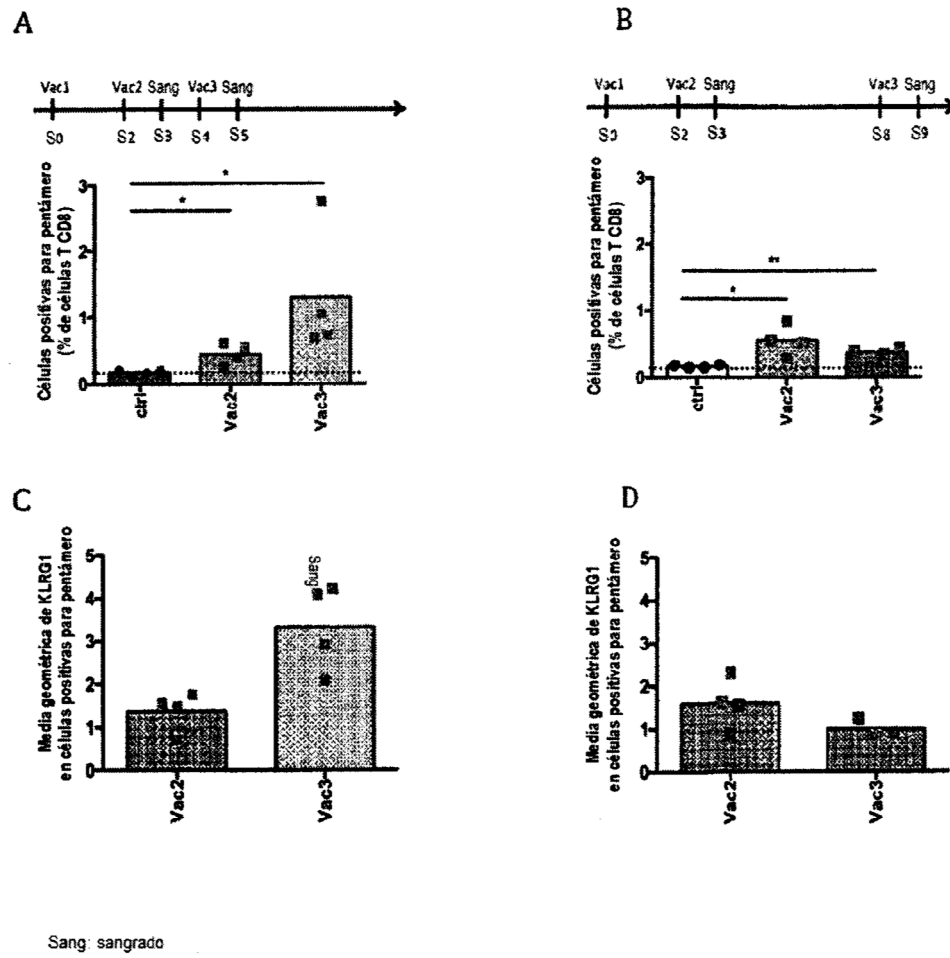


Fig. 27

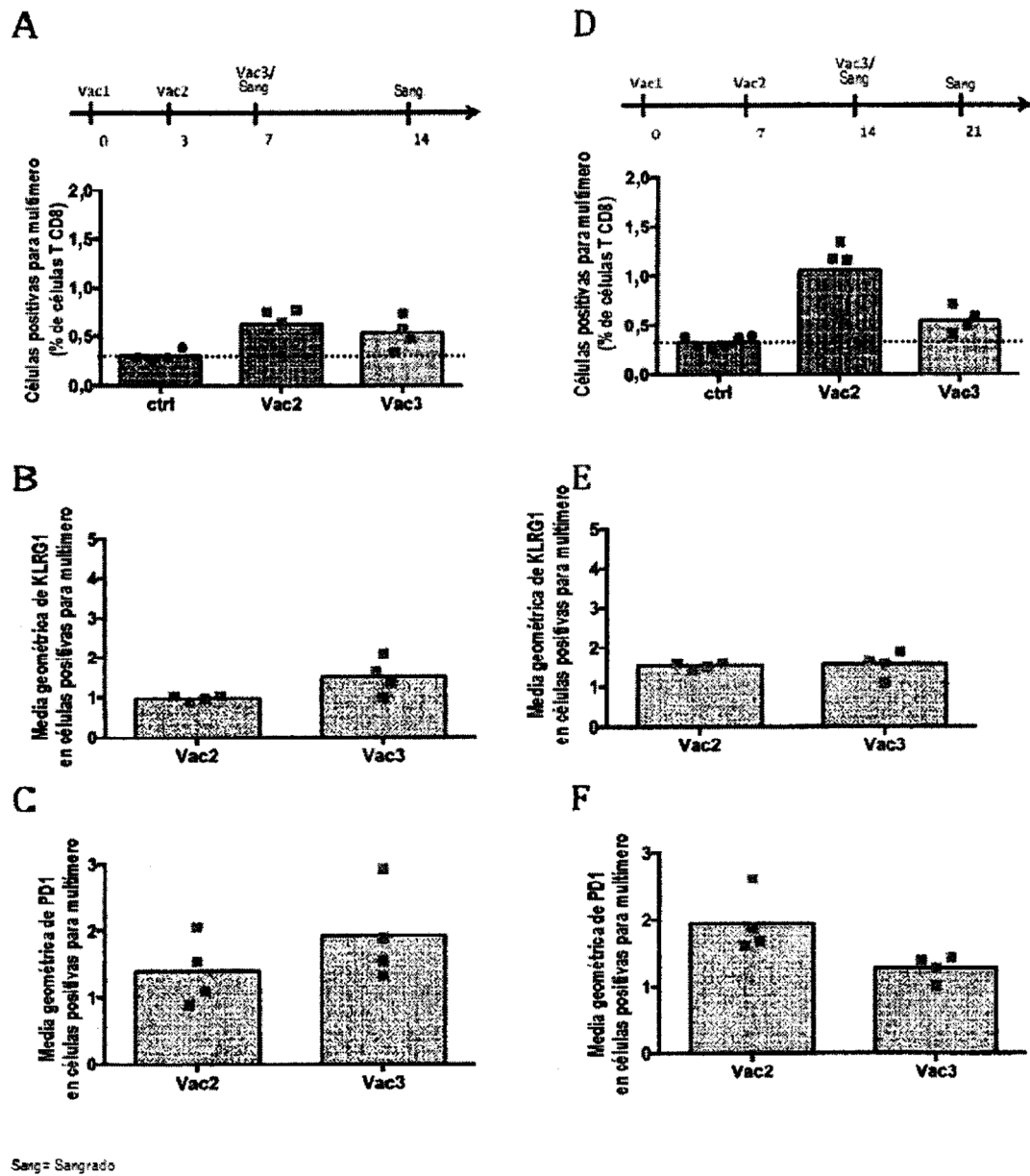


Fig. 28

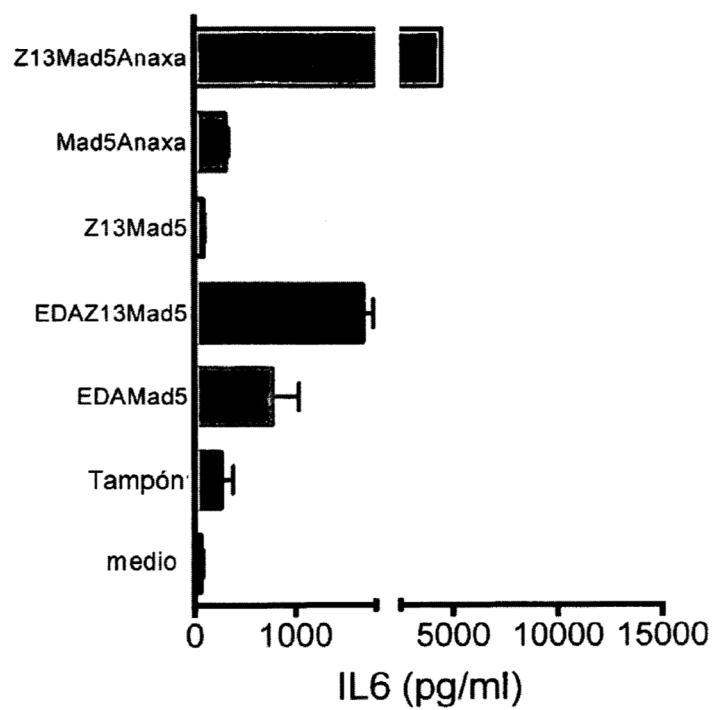


Fig. 29

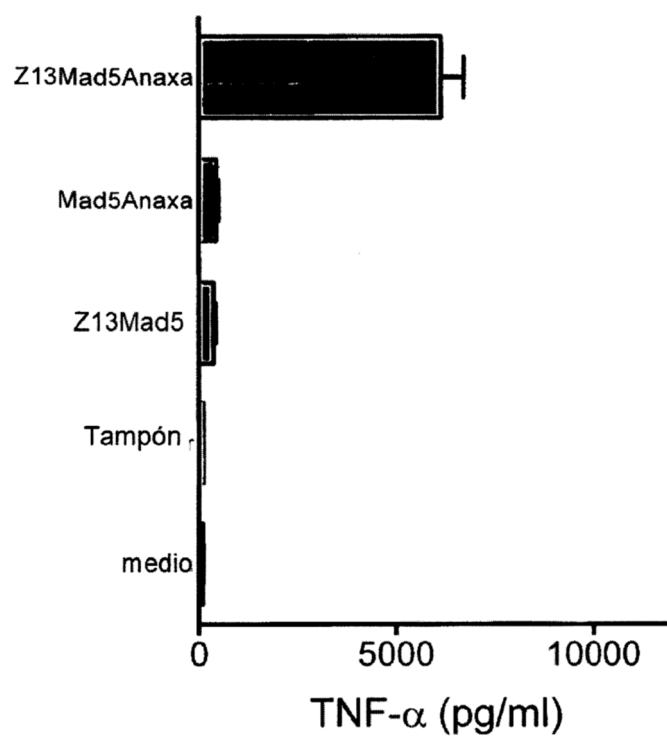


Fig. 30

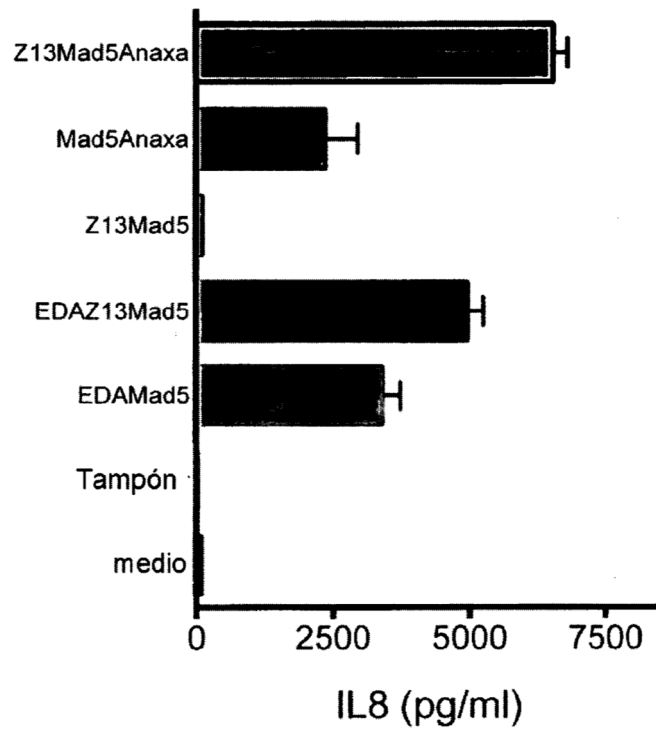


Fig. 31

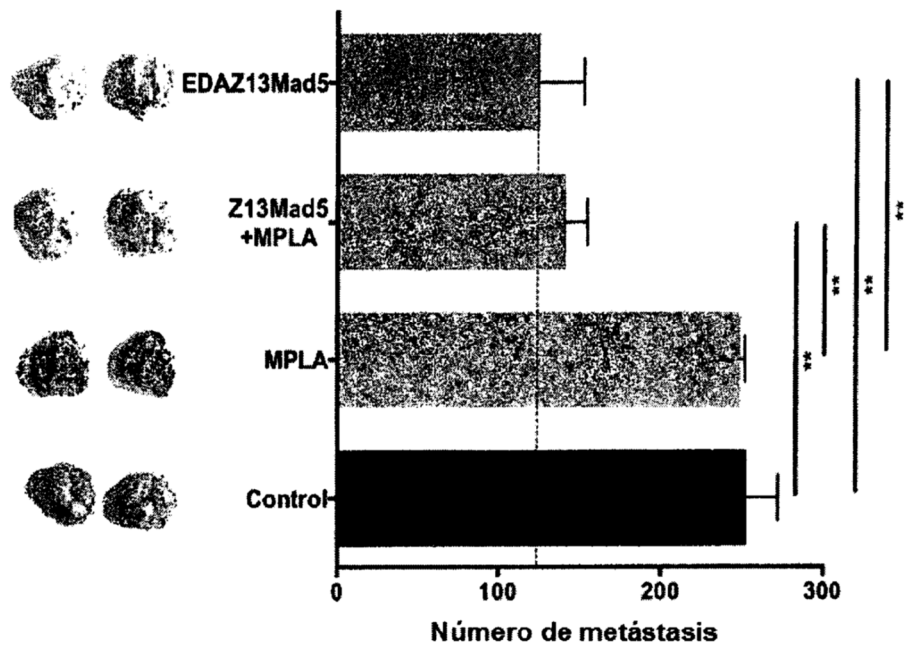


Fig. 32

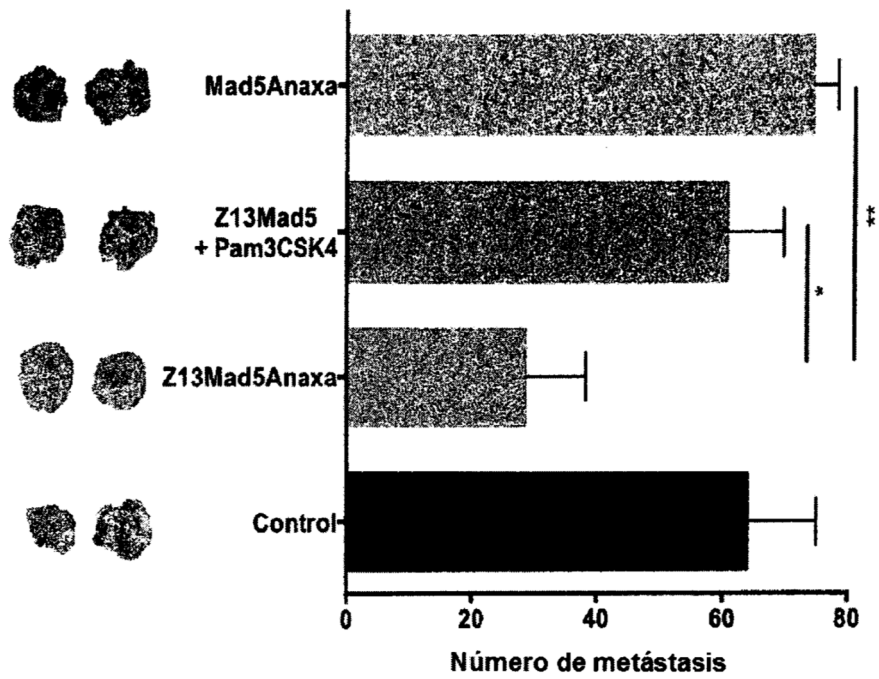


Fig. 33

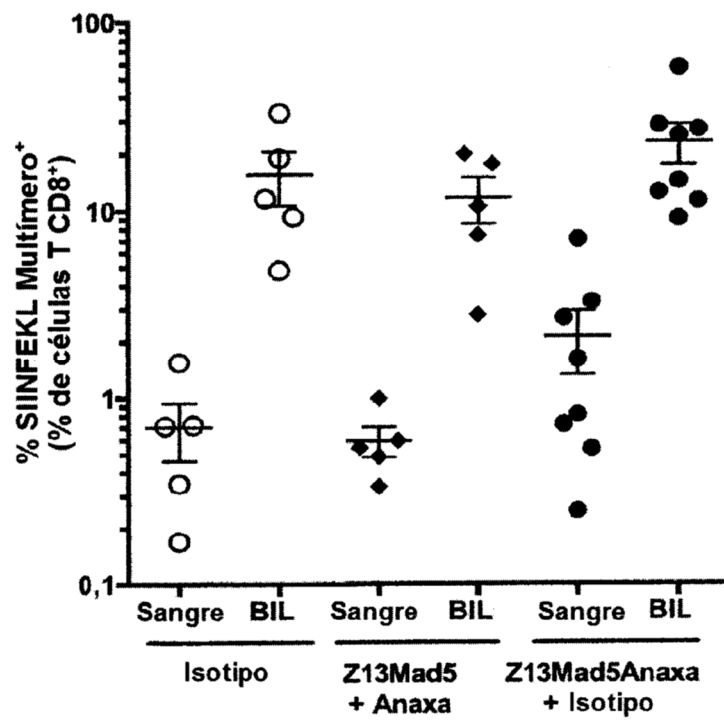


Fig. 34

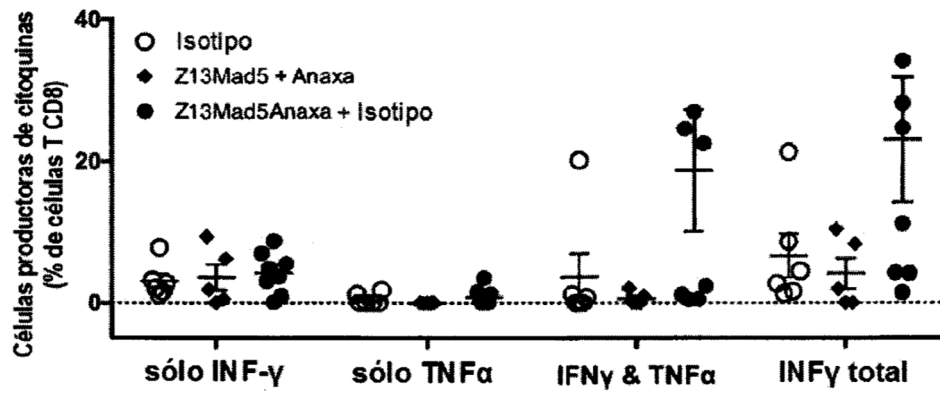


Fig. 35

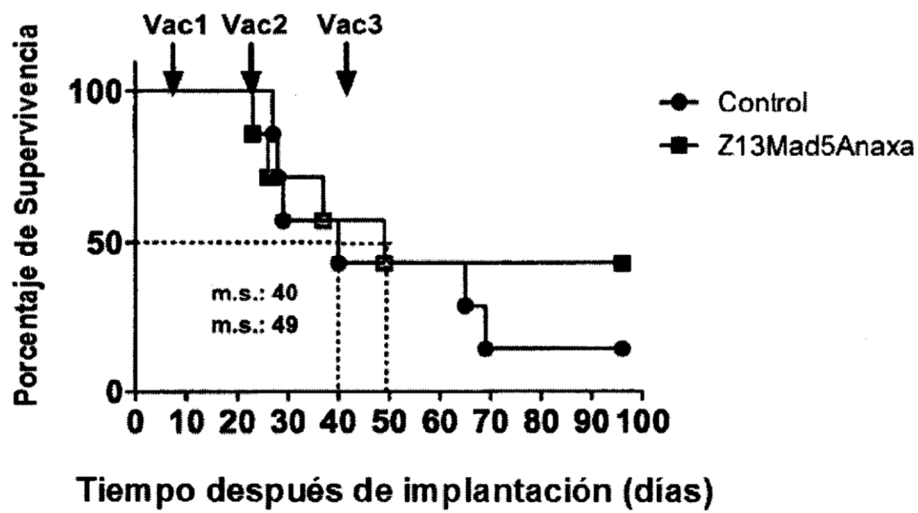
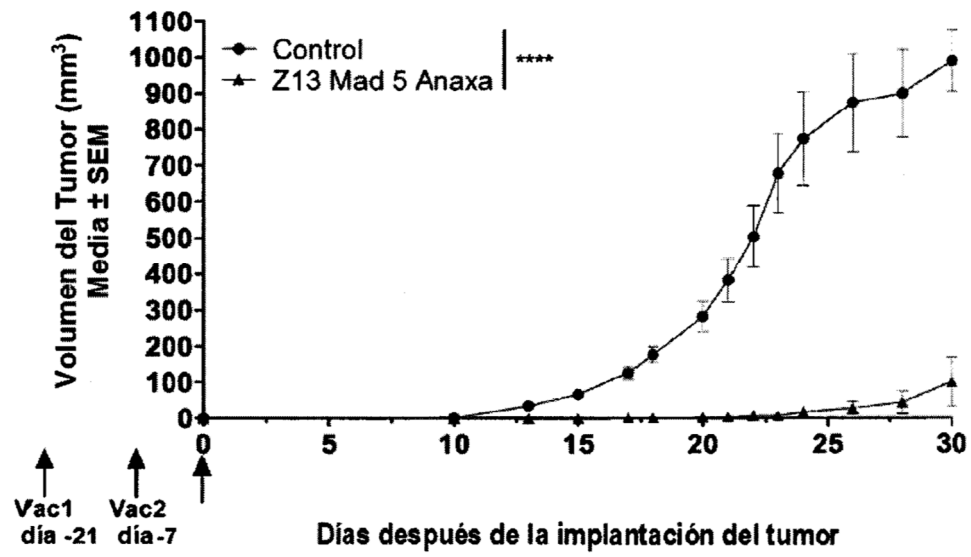


Fig. 36

A



B

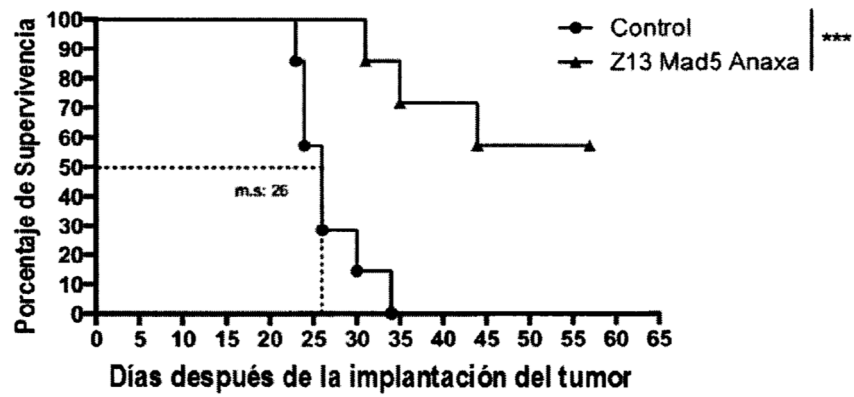
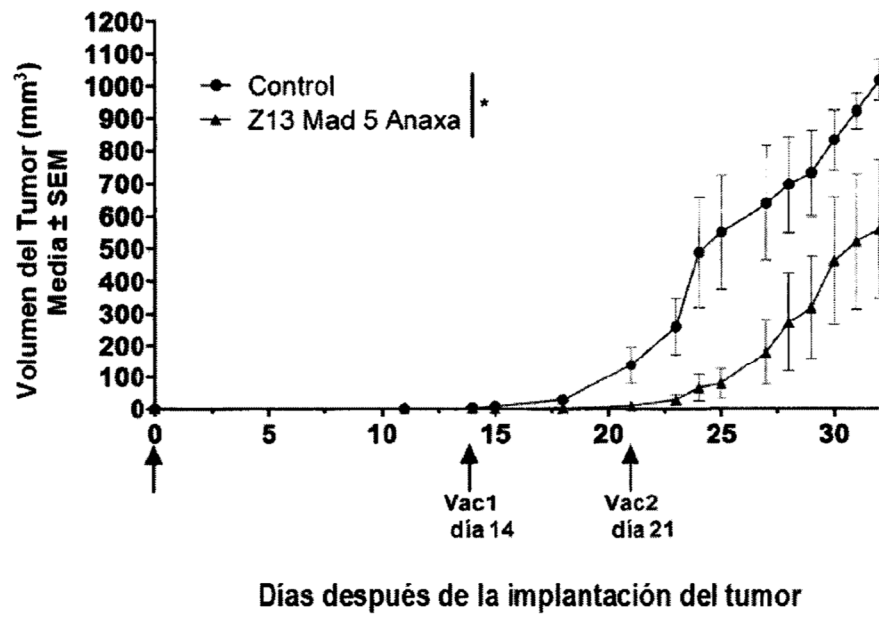


Fig. 37

A



B

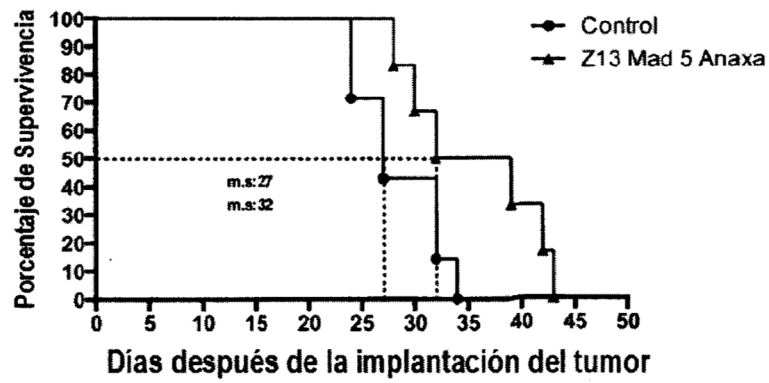
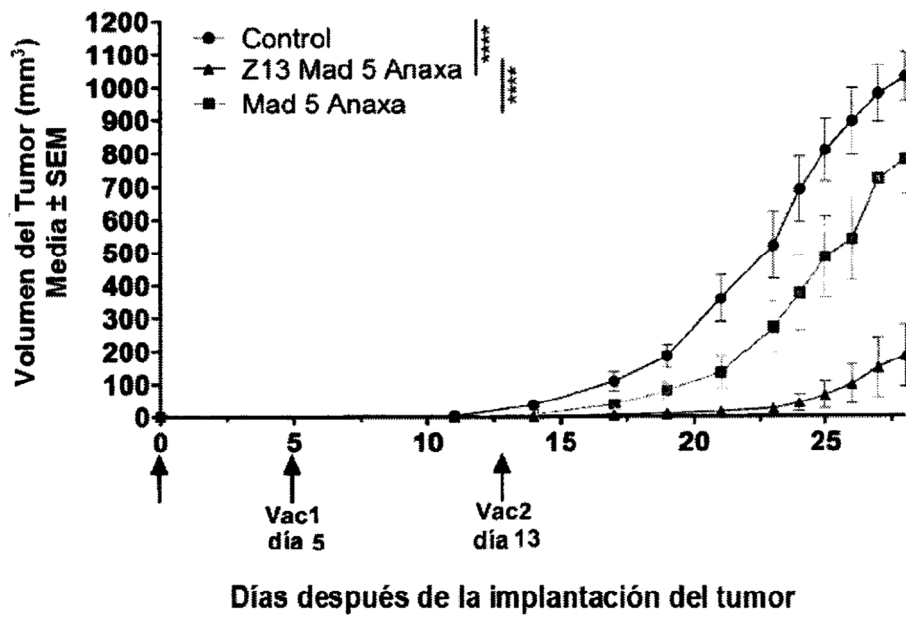


Fig. 38

A



B

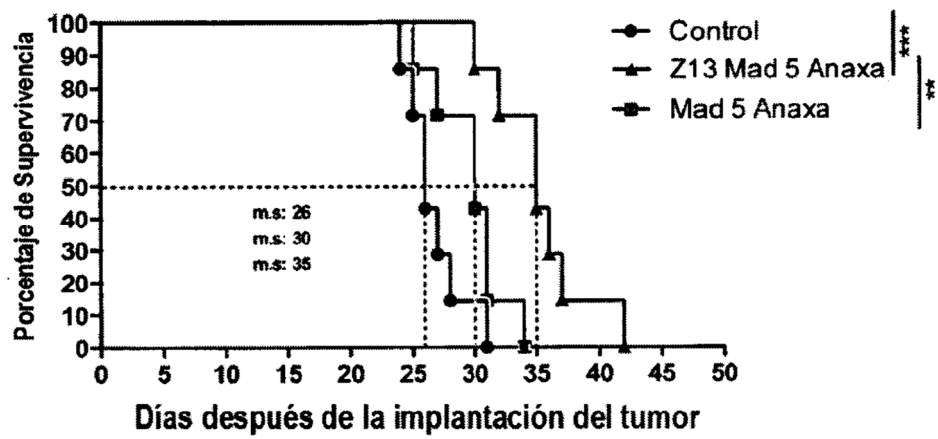
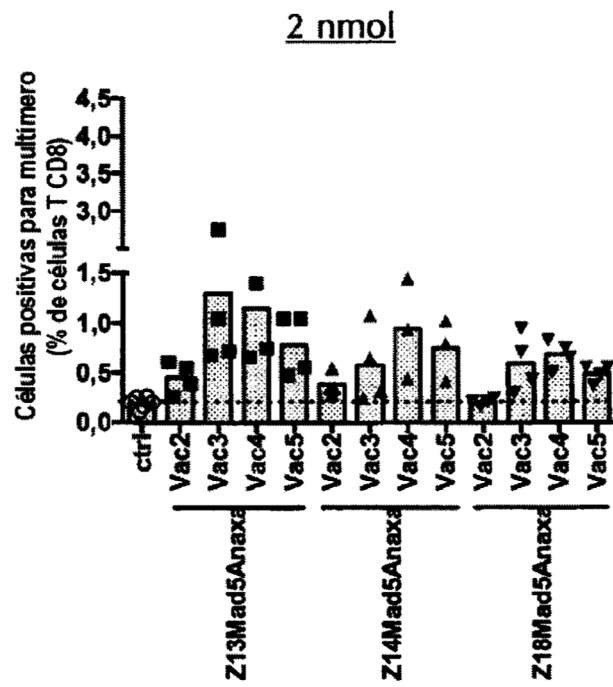


Fig. 39

A



B

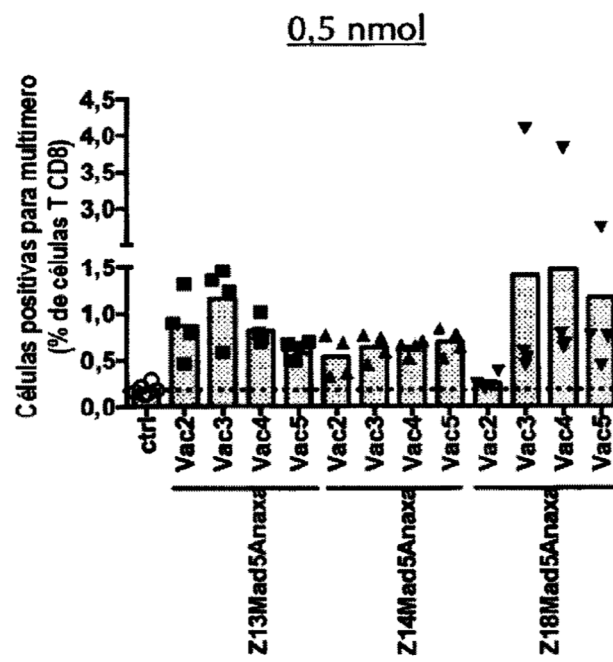


Fig. 40

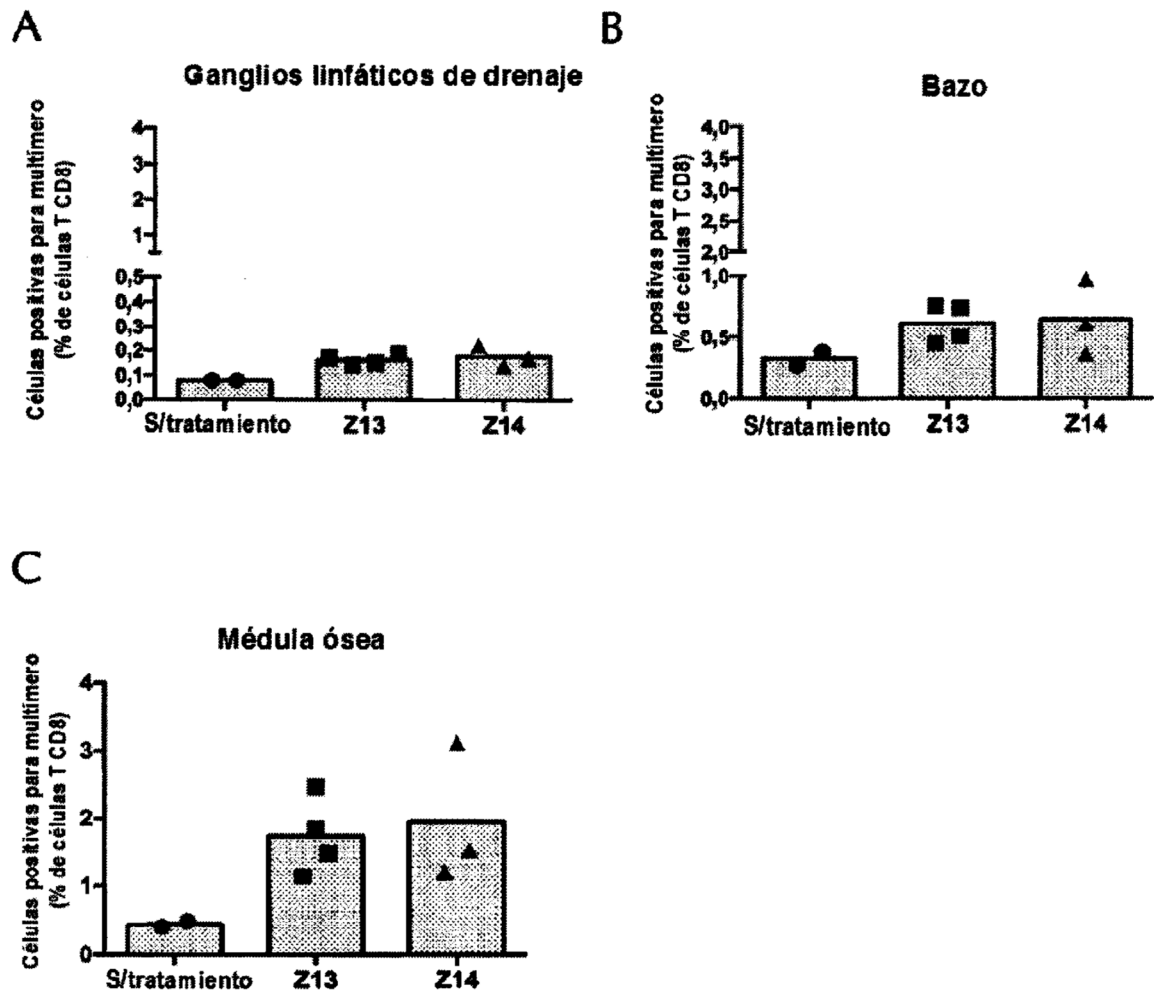
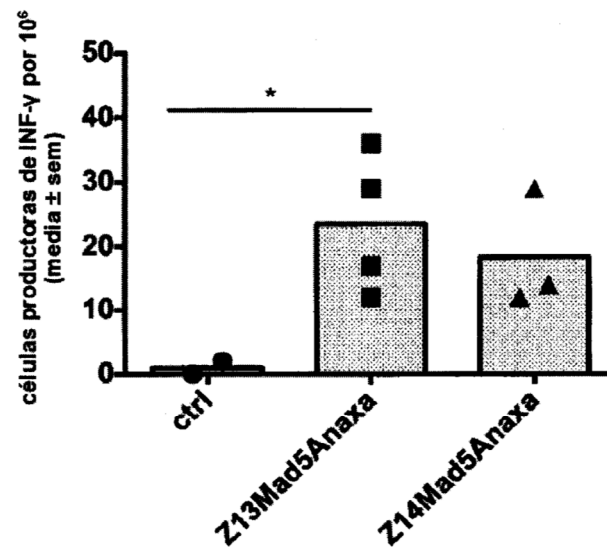


Fig. 41

A



B

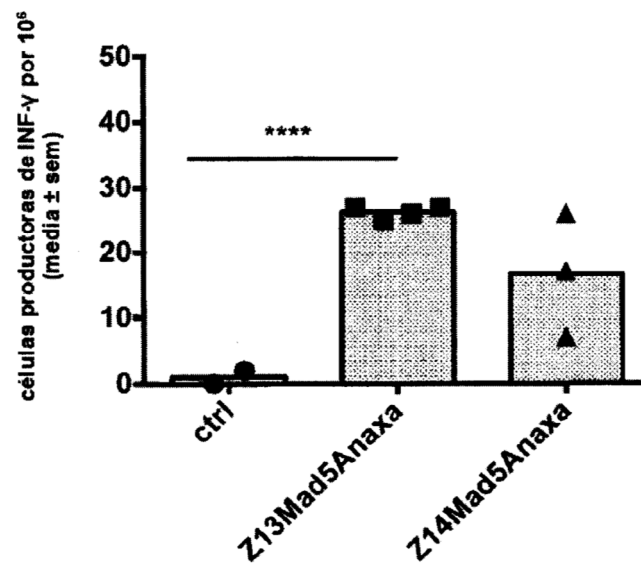


Fig. 42

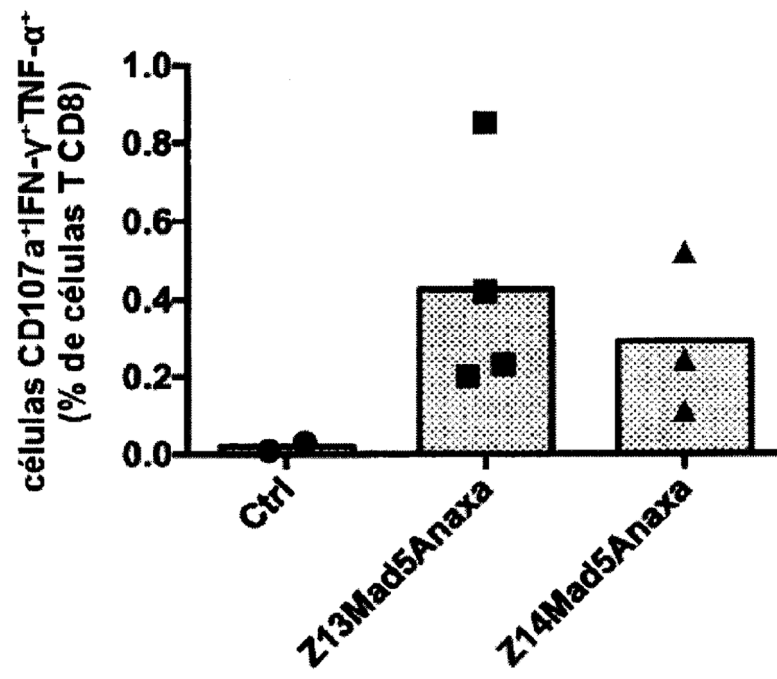
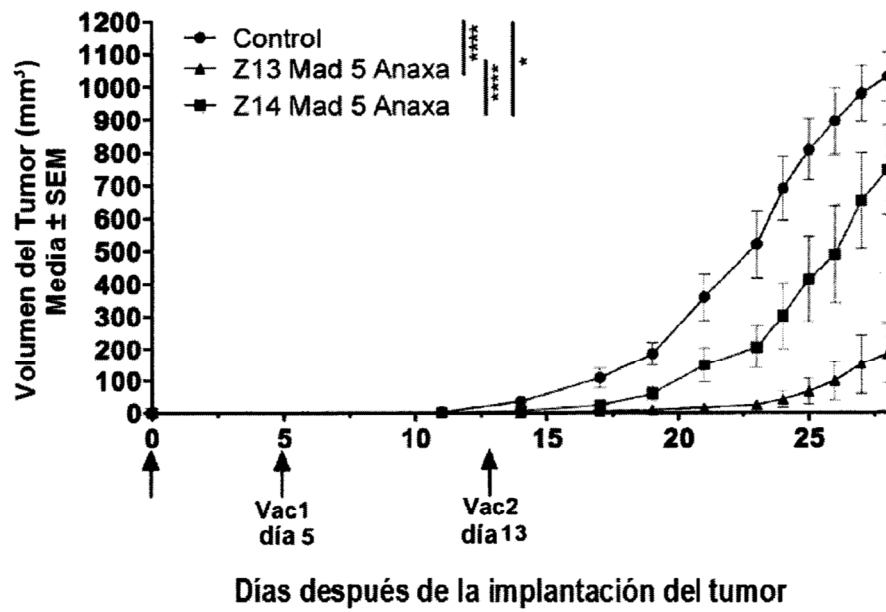


Fig. 43

A



B

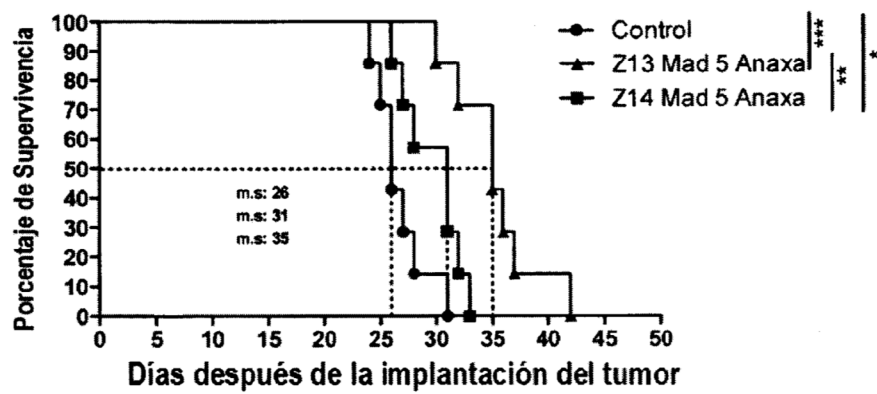
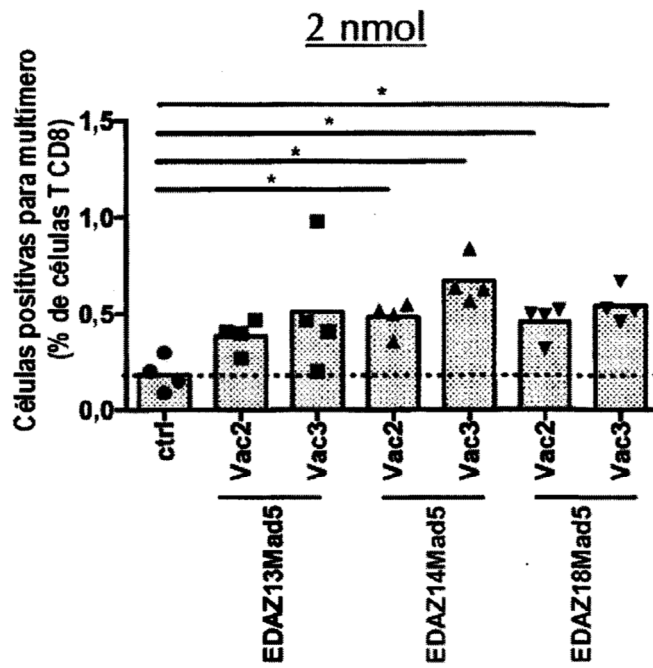


Fig. 44

A



B

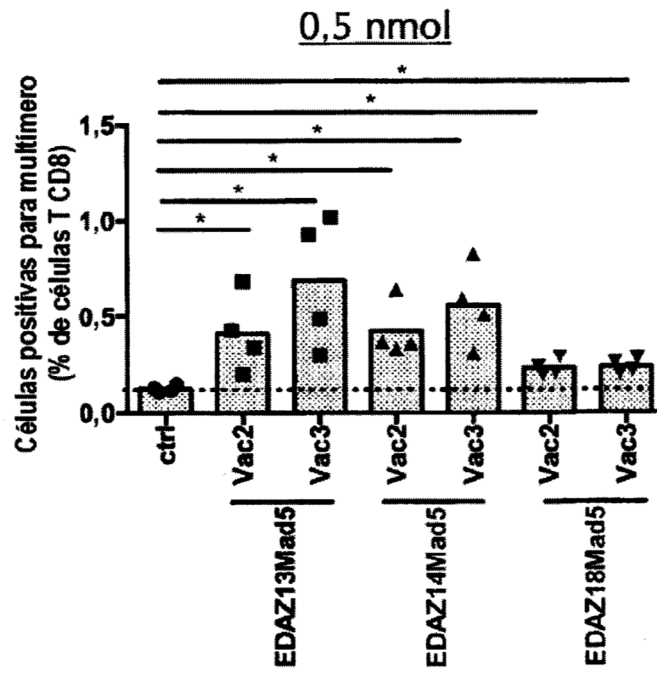


Fig. 45

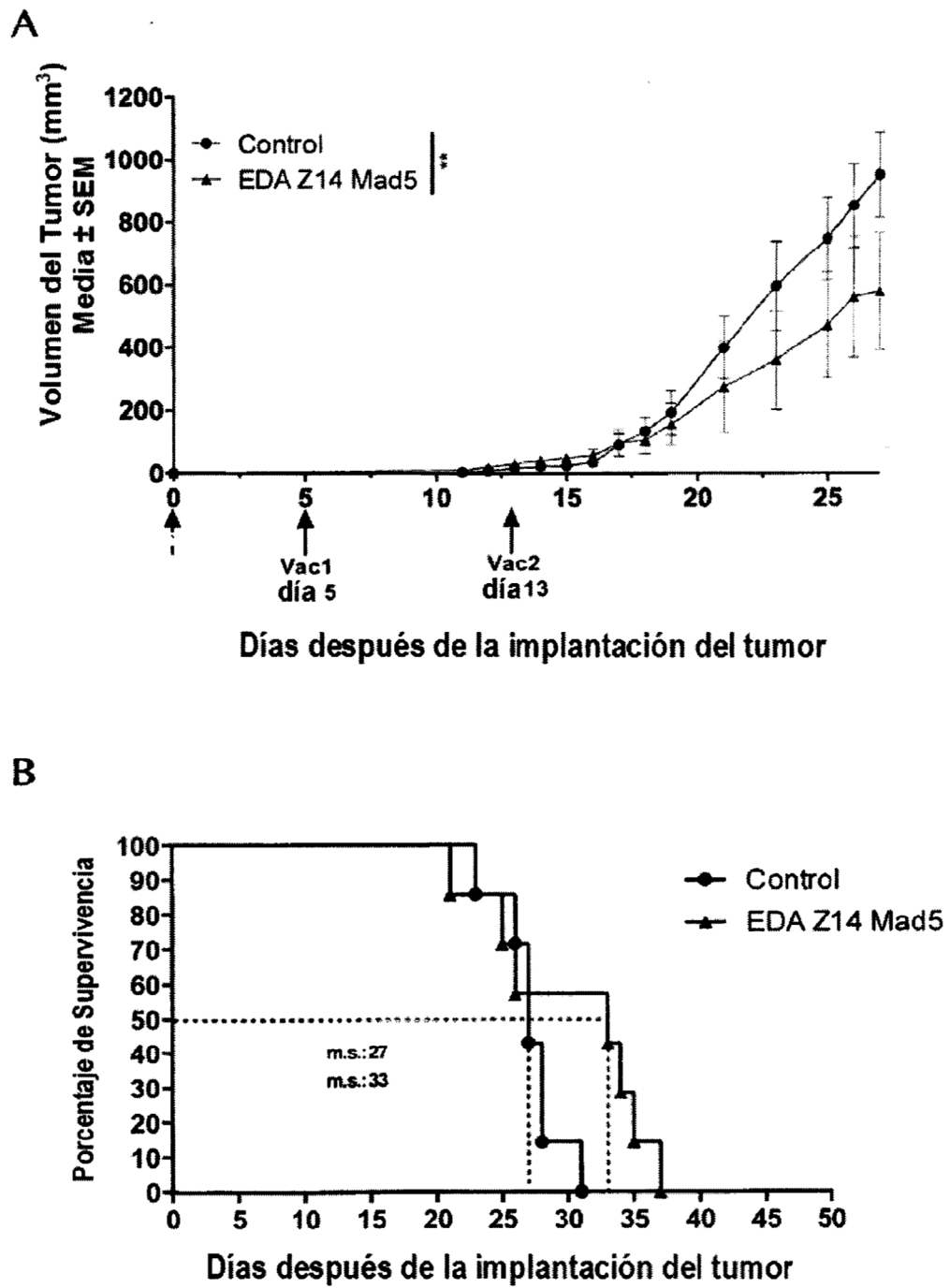


Fig. 46

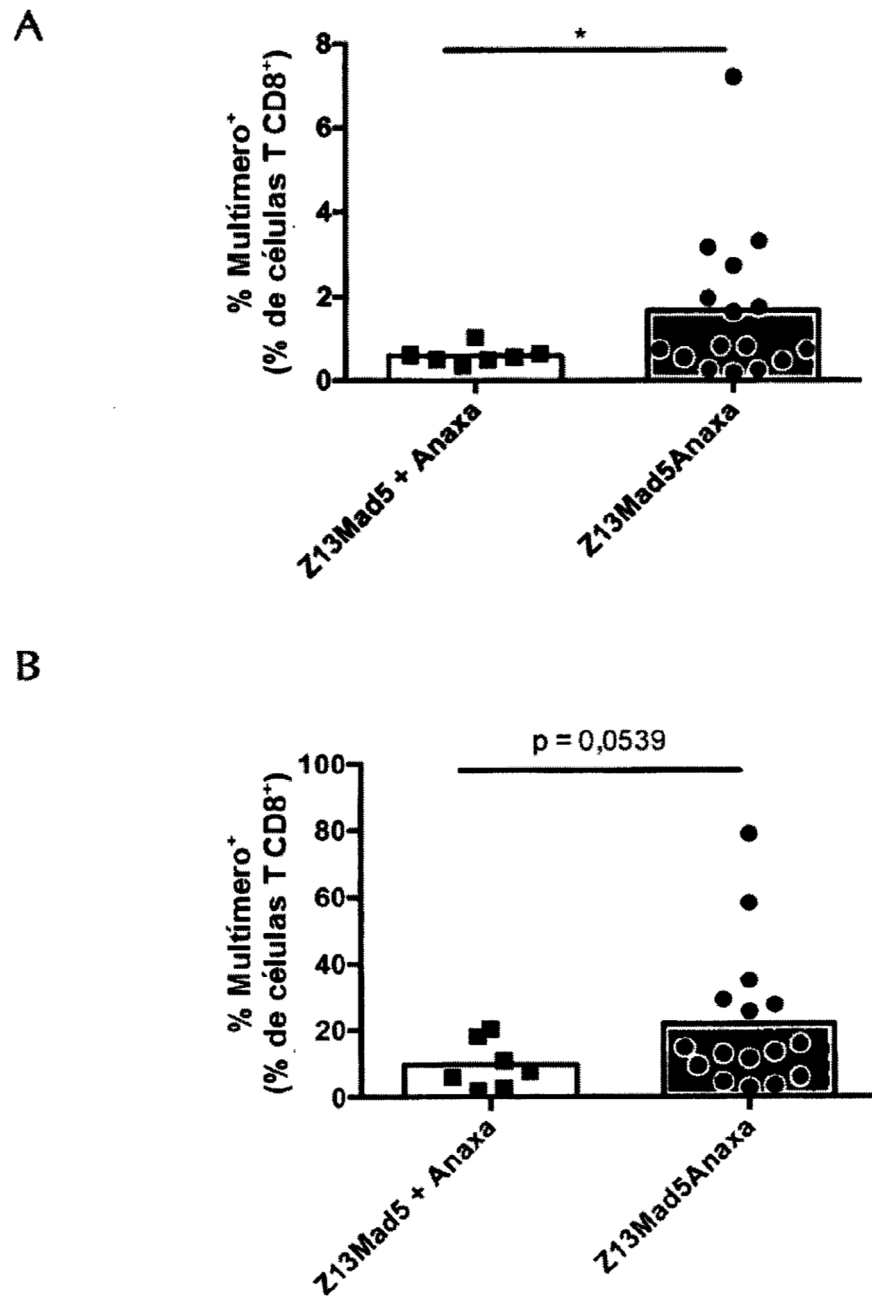


Fig. 47

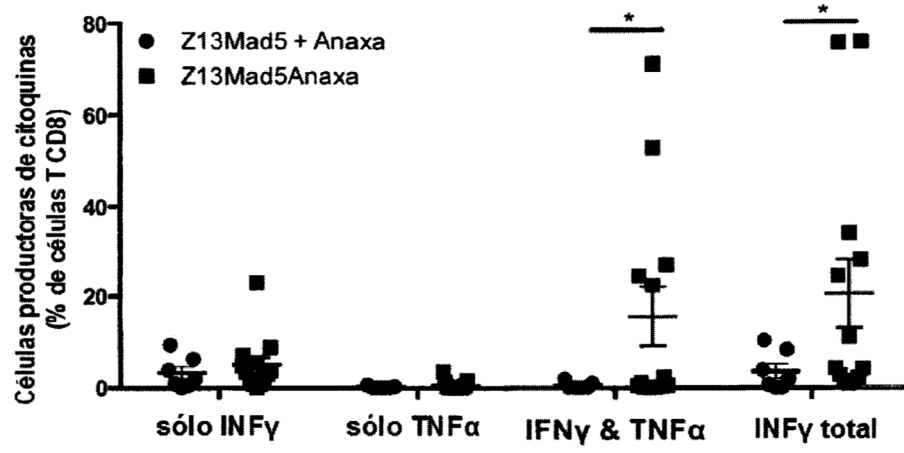
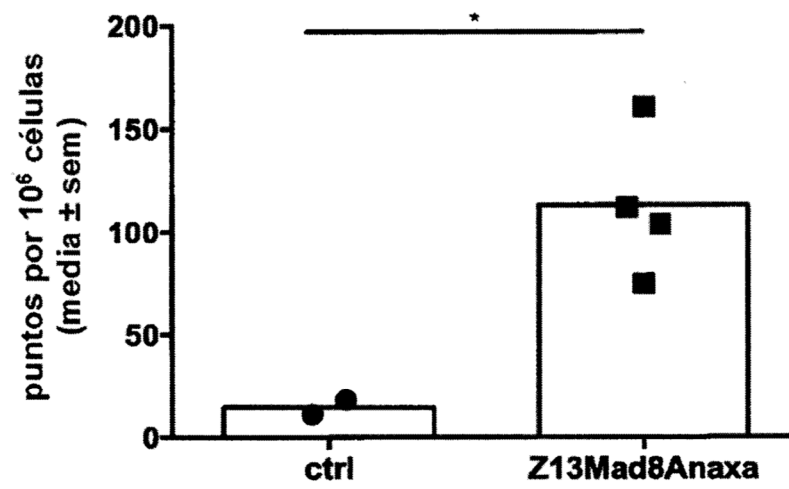


Fig. 48

A



B

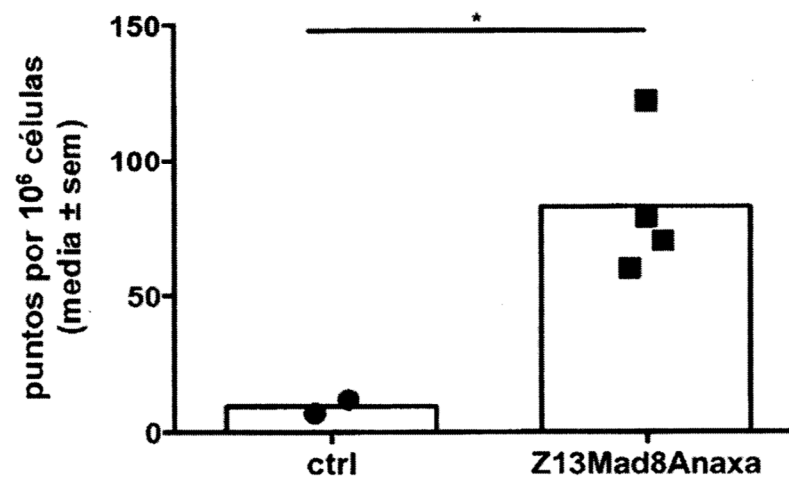
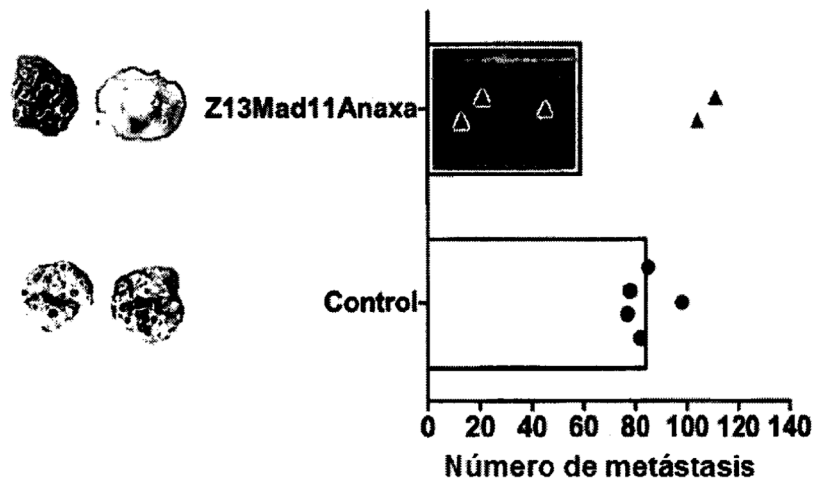


Fig. 49

A



B

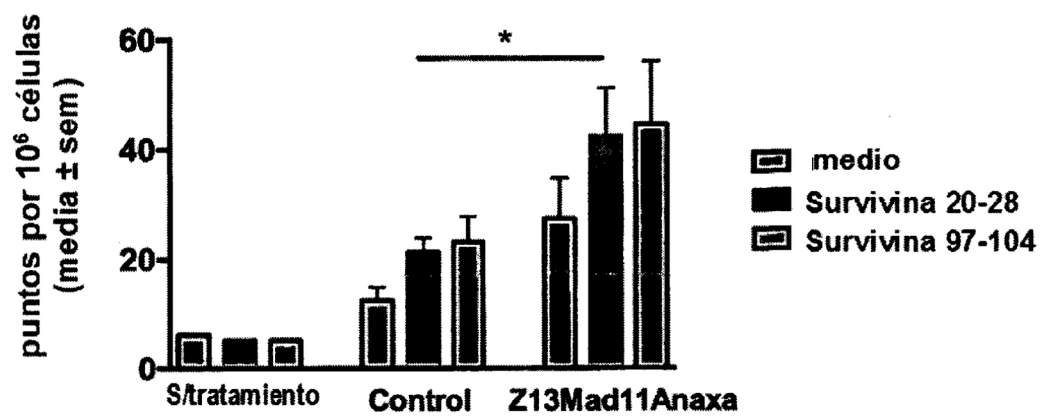


Fig. 50

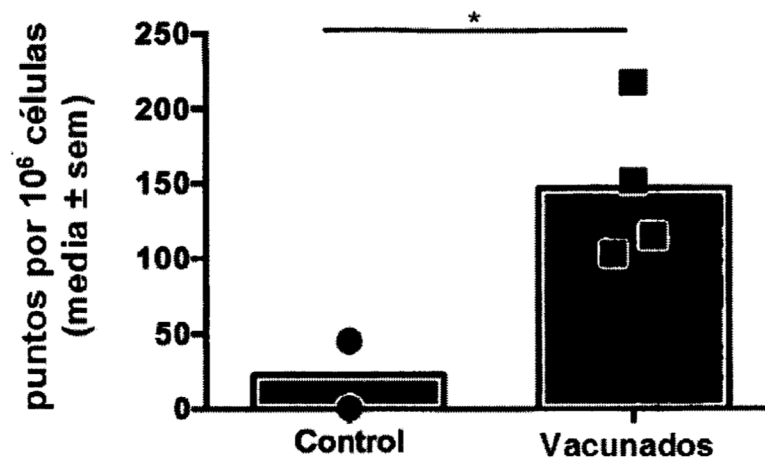


Fig. 51

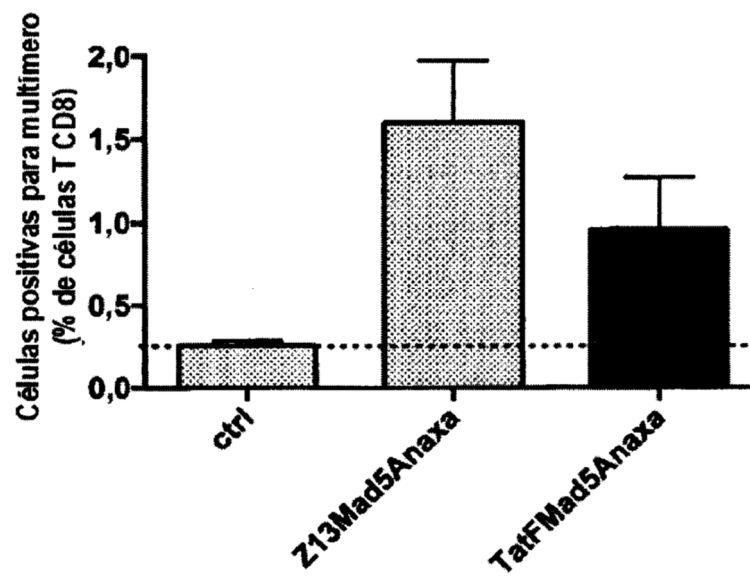


Fig. 52

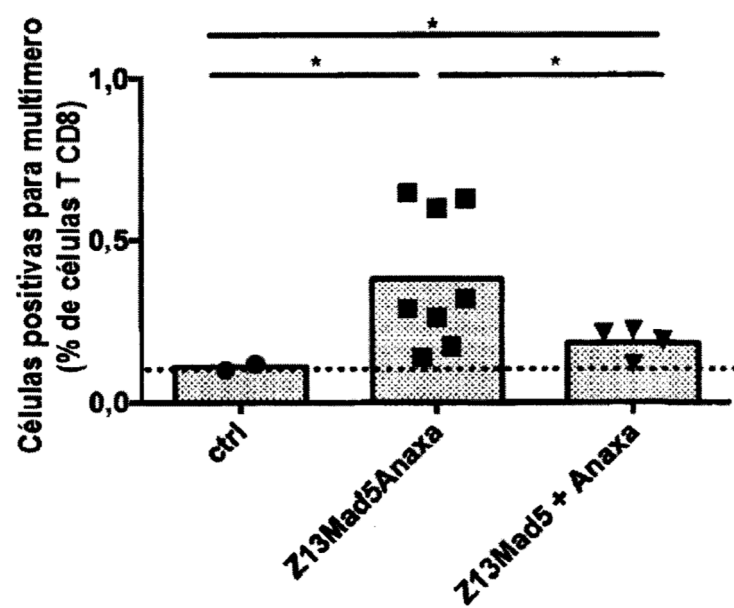


Fig. 53

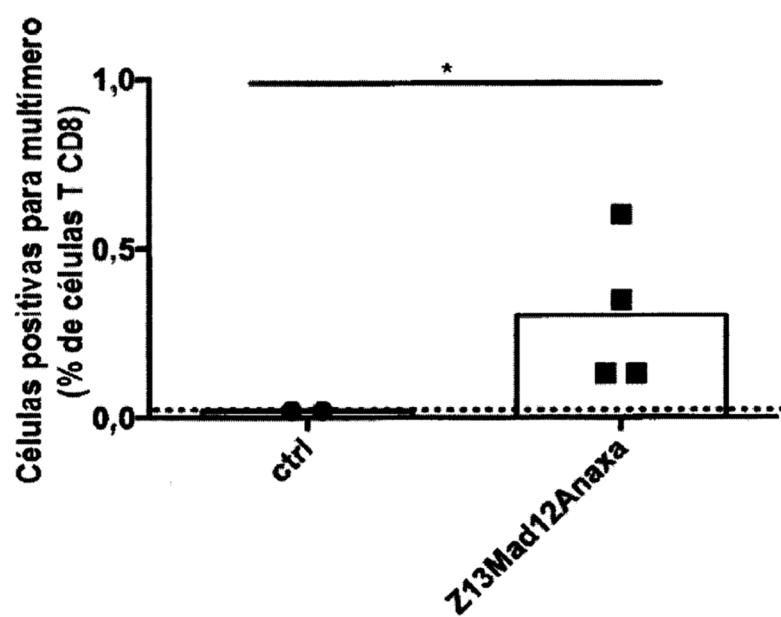


Fig. 54

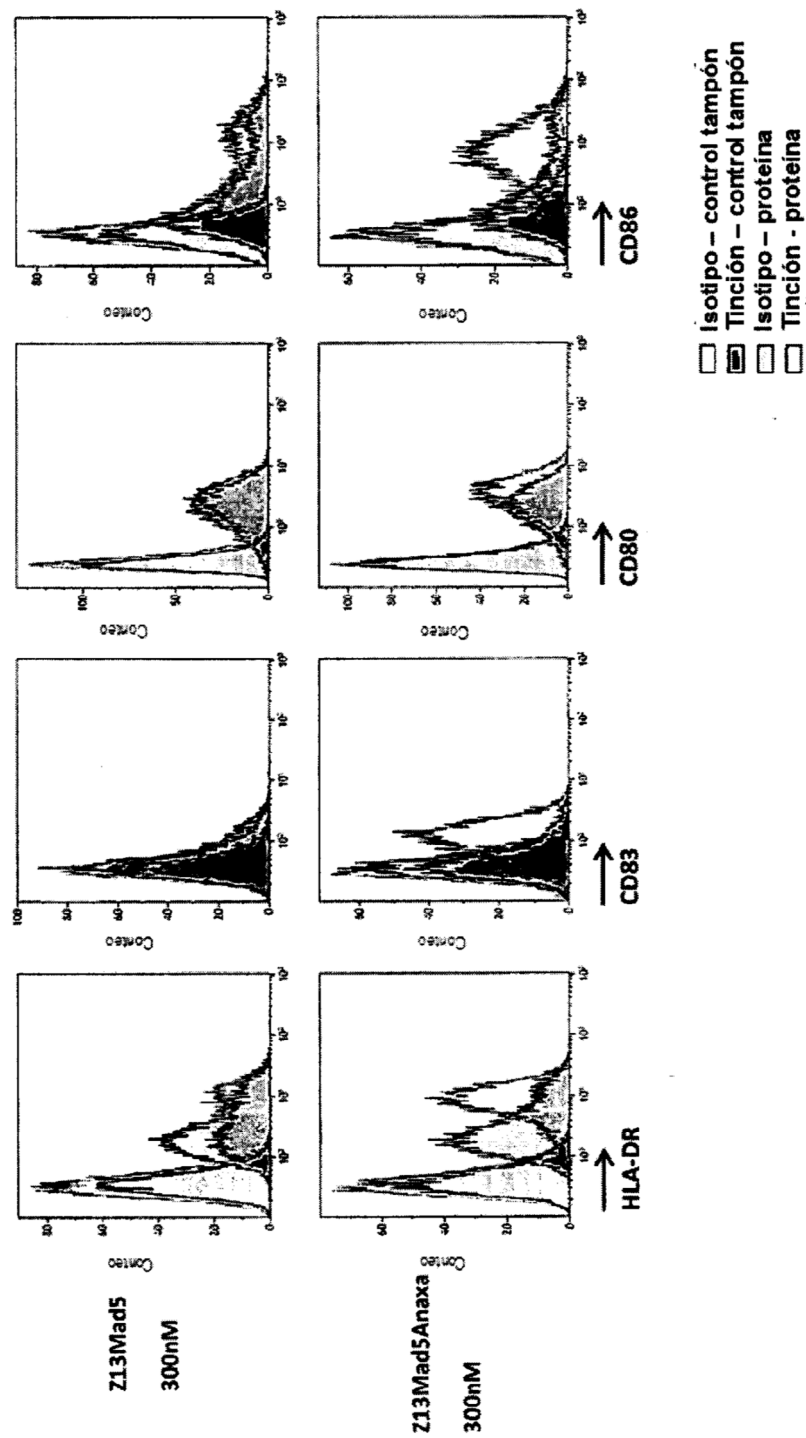


Fig. 55