

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 541**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2017** **PCT/EP2017/056034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017** **WO17157964**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2017** **E 17711617 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2024** **EP 3429618**

54 Título: **Combinación de modulador de puntos de control inmunitarios y complejo que comprende un péptido de penetración celular, una molécula de carga y un agonista peptídico de TLR para su uso en medicina**

30 Prioridad:

16.03.2016 WO PCT/EP2016/000472
26.08.2016 WO PCT/EP2016/070264

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.08.2024

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:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 977 541 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

Combinación de modulador de puntos de control inmunitarios y complejo que comprende un péptido de penetración celular, una molécula de carga y un agonista peptídico de TLR para su uso en medicina

La presente invención se refiere al campo de la vacunación, en particular a vacunas contra el cáncer.

El sistema inmune puede reconocer y en cierta medida eliminar células tumorales, sin embargo, esta respuesta antitumoral a menudo es de baja amplitud e ineficiente. Impulsar esta respuesta antitumoral débil con la vacunación terapéutica ha sido una meta ampliamente buscada para la terapia del cáncer. Así, 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 cuidado estándar. Prometedores datos preclínicos y los avances en los ensayos clínicos demuestran que la inmunización activa es una modalidad de tratamiento segura y factible para ciertos tipos de cáncer. Se ha documentado la inducción de linfocitos T citotóxicos específicos de tumores (CTL) mediada por las respuestas inmunes empleando diferentes enfoques, incluyendo vacunas de células tumorales modificadas, vacunas de péptidos, vectores virales recombinantes, ADN, proteínas o vacunas de células dendríticas. Sin embargo, la inmunidad antitumoral mediada por CTL solo ocasionalmente se correlaciona con la regresión del tumor 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, solo se notificaron 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.

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. 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 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 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 pacientes. Además, los antígenos están completamente definidos, permitiendo un 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.

Se administra una vacuna terapéutica contra el cáncer a pacientes con 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) específicas para las células tumorales. Con este fin y para lograr una respuesta inmune potente, la vacuna debe contener un antígeno o un epítipo antigénico que también está presente en el tumor y que necesita ser suministrado a las células presentadoras de antígeno (APC), en particular a las células dendríticas (DC), para 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 células T. Los péptidos que entonces son reconocidos por las células T y así inducen su estimulación se denominan epítopos. 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, las células T reconocedoras de antígeno requieren de una segunda señal, la señal coestimuladora, que es no específica de antígeno y es proporcionada por la interacción entre las moléculas coestimuladora 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 (i) la especificidad de los antígenos tumorales y (ii) la capacidad de suministrarlos de manera eficiente a las 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 regulación negativa de la expresión de antígenos individuales (escape inmune pasivo), el suministro de antígeno multiepitópico proporciona una ventaja. De hecho, las vacunas basadas en proteínas permiten el suministro de antígenos multiepitópicos 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 ha sido demostrado después de la vacunación con péptidos cortos que no tienen tales requisitos de procesamiento rigurosos (Toes RE, Offringa 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 resultar en vidas medias cortas de los complejos MHC de clase I/péptido en la superficie de las DC, lo que conduce 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 normalmente 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. Cell-penetrating 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 de 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). El documento WO 2014/041505 A1 describe proteínas de fusión de péptidos de penetración celular derivados del activador transcripcional de la cremallera de leucina básica (bZIP) "ZEBRA" del virus Epstein-Barr (VEB) y antígenos cancerígenos/tumorales.

Con el fin de aumentar el nivel de moléculas coestimuladoras en las CD y aumentar la respuesta del sistema inmune a los antígenos diana pueden utilizarse adyuvantes. Los adyuvantes pueden realizar esta tarea por emulación de los componentes microbianos conservados que son naturalmente reconocidos por el sistema inmune. Incluyen, por ejemplo, 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 puede aumentar 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 adyuvantes, de los que solo un número limitado han sido aprobados para uso humano. Estos incluyen Alum, MPL (monofosforil lípido A) y ASO₄ (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): págs. 54-8).

Recientemente, los ligandos de receptores tipo Toll (TLR) están surgiendo como una prometedora clase de adyuvantes (Baxevanis, C.N., I.F. Voutsas, y 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): págs. 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 of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. Immunol Rev. 2011; 239:178-196). Los tipos de señalización y las citoquinas de 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 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. 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. y H. Taguchi, Overview and outlook of Toll-like receptor ligand- antigen conjugate vaccines. Ther Deliv, 2012. 3(6): págs. 749-60). El documento WO 2012/048190 A1 divulga la anexina II o un fragmento inmunomodulador de la misma como agonista peptídico de TLR2. El documento EP 2 476 440 A1 divulga un agonista de TLR4 que comprende un dominio EDA de fibronectina.

Además, recientemente los moduladores de puntos de control inmunitarios surgieron como nuevos objetivos para la inmunoterapia del cáncer, como se describe, por ejemplo, en Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 22 de marzo de 2012;12(4):252-64 y en el documento WO 2015/103037 A2 y como demuestran las recientes autorizaciones de comercialización de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb), Opdivo® (Nivolumab; Bristol Myers Squibb) y Keytruda® (Pembrolizumab; Merck). Los puntos de control inmunitarios son moléculas del sistema inmunitario, en particular de determinadas células inmunitarias, que deben activarse (moléculas estimuladoras o coestimuladoras de puntos de control) o inactivarse (moléculas inhibidoras de puntos de control) para iniciar una respuesta inmunitaria. Muchos de los puntos de control inmunitarios están regulados por interacciones entre pares específicos de receptores y ligandos. A menudo, los cánceres se protegen del sistema inmune utilizando estos puntos de control para evitar ser atacados por el sistema inmune.

En particular, los dos receptores de puntos de control CTLA-4 y PD-1 han sido objeto de mucha atención. CTLA-4, PD-1 y sus ligandos son miembros de la familia CD28-B7 de moléculas de puntos de control de señalización conjunta que desempeñan papeles importantes en todas las etapas de la función de las células T y otras funciones celulares.

El receptor PD-1 se expresa en la superficie de las células T activadas y otras células inmunitarias, como las células B. Sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) se expresan en la superficie de las células T activadas. Sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) se expresan en la superficie de células presentadoras de antígenos, como células dendríticas o macrófagos, y otras células inmunitarias. La unión de PD-L1 o PD-L2 a PD1 desencadena una señal en la célula T, que básicamente la desconecta o la inhibe. En condiciones no patológicas, esta interacción impide que las células T ataquen a otras células del organismo. Sin embargo, las células cancerosas a menudo se aprovechan de este sistema y expresan altos niveles de PD-L1 en su superficie. De este modo, las células cancerosas son capaces de desactivar las células T que expresan PD-1 y, por tanto, de suprimir la respuesta inmunitaria contra el cáncer. Los inhibidores de PD1 y/o sus ligandos, como los anticuerpos monoclonales inhibidores/antagonistas dirigidos a PD1 o a sus ligandos, pueden potenciar la respuesta inmunitaria contra las células cancerosas y son, por tanto, prometedores en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de anticuerpos monoclonales inhibidores/antagonistas de PD1 actualmente aprobados se encuentran Opdivo® (Nivolumab; Bristol Myers Squibb) y Keytruda® (Pembrolizumab; Merck). Otros inhibidores de la vía PD1, que se encuentran actualmente en fase clínica II y/o III incluyen Pidilizumab (mAb inhibidor de PD1; CureTech/Medivation), Durvalumab (mAb inhibidor de PD-L1; MedImmune/AstraZeneca) y Atezolizumab (mAb inhibidor de PD-L1; Roche).

Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb), otro modulador de puntos de control inmunitarios aprobado, es un anticuerpo monoclonal inhibidor/antagonista del antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). CTLA4 también se expresa en la superficie de los linfocitos T activados y sus ligandos se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos profesionales. Se cree que el CTLA-4 regula la proliferación de células T al principio de una respuesta inmunitaria, principalmente en los ganglios linfáticos, y afecta al funcionamiento de las

células T reguladoras. Otro inhibidor de CTLA-4, que se encuentra actualmente en fase clínica II, es, por ejemplo, el Tremelimumab (MedImmune/AstraZeneca).

Las inmunoterapias contra el cáncer con moduladores de puntos de control, en particular con inhibidores de puntos de control, demostraron ser muy eficaces al menos en un subgrupo de sujetos ("respondedores"). Sin embargo, muchos pacientes no responden a los moduladores de puntos de control e incluso en la población que responde la respuesta no siempre es completa u óptima.

Por lo tanto, es deseable combinar la inhibición de las vías PD1 y CTLA4 con el fin de aumentar la eficacia. Por consiguiente, el tratamiento combinado con nivolumab e ipilimumab fue aprobado por la FDA en 2015 para el tratamiento de pacientes con melanoma de tipo salvaje BRAF V600, irreseccable o metastásico. Además, recientemente se informó de un exitoso estudio de fase 1b sobre la combinación de durvalumab y tremelimumab en cáncer de pulmón no microcítico (Antonia, Scott et al., 2016, Safety and antitumour activity of durvalumab plus tremelimumab in non-small cell lung cancer: a multicentre, phase 1b study; Lancet Oncol. 2016 Feb 5. pii: S1470-2045(15)00544-6. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00544-6. [publicación electrónica antes de impresión]).

Sin embargo, la combinación de moduladores de puntos de control entre sí solo se dirige a la inmunidad endógena específica del tumor, en particular porque no se proporcionan antígenos específicos del tumor. Otra estrategia para el tratamiento del cáncer consiste en combinar un modulador de puntos de control con una vacuna que contenga un antígeno o un epítipo antigénico, como se ha descrito anteriormente, que proporcione especificidad contra un determinado tumor. La combinación de un modulador de puntos de control y una vacuna que contiene un antígeno o un epítipo antigénico puede potenciar o prolongar una respuesta antitumoral en un sujeto. Además, la combinación de una vacuna que contiene un antígeno o un epítipo antigénico con un modulador de puntos de control puede potenciar o prolongar los efectos del modulador de puntos de control, permitir que un sujeto responda a un modulador de puntos de control, o permitir la reducción de la toxicidad o la dosis de un modulador de puntos de control. Por ejemplo, el modulador de puntos de control puede eliminar el "freno inmunitario" antes de pisar el "acelerador del tratamiento" mediante la administración de la vacuna.

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar terapias combinadas para iniciar o mejorar la eficacia de los moduladores de puntos de control tanto en los pacientes que responden como en los que no responden. 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 mediada por las células T citotóxicas multiepitópicas, (ii) inducir células T_h y (iii) promover la memoria inmunológica. Estos tres parámetros son esenciales para generar una inmunidad antitumoral potente, de larga duración. De 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.

En vista de lo anterior, es el objeto de la presente invención superar los inconvenientes de las vacunas contra el cáncer actuales descritos anteriormente y proporcionar una combinación de un modulador de puntos de control inmunitarios y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, una carga y un agonista de TLR para aplicaciones de inmunoterapia contra el cáncer que representen una vacuna más potente, en particular una vacuna contra el cáncer, con una actividad antitumoral mejorada. Así pues, la presente invención se refiere a un modulador de puntos de control inmunitarios y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, una carga y un agonista de TLR para su uso en una terapia combinada para iniciar, permitir, potenciar o mejorar una respuesta inmunitaria antitumoral, en particular que permite, potencia o mejora la respuesta del sujeto o del tumor a los moduladores de punto de control.

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

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 estos pueden variar. Debe entenderse también que la terminología usada aquí no pretende limitar el alcance de la presente invención, que está limitado solo 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 entendidos por un experto medio en la técnica.

A lo largo de esta memoria y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que el término "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" 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", "la" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse como inclusivos tanto el singular como del plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. La inclusión de intervalos de valores en este documento solo 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 texto contenido 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 $x \pm 10\%$.

Combinación de un modulador de puntos de control y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y un agonista peptídico de TLR para su uso en medicina

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una combinación de:

- (i) un modulador de puntos de control inmunitarios y
- (ii) un complejo que comprende:

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

donde los componentes a) - c) que comprende el complejo (es decir, el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o epítipo antigénico y el al menos un agonista peptídico de TLR), están unidos de forma covalente para su uso en medicina.

A continuación, se describen en detalle los componentes de la combinación para uso según la presente invención, es decir, el modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo que comprende el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o epítipo antigénico y el al menos un agonista peptídico de TLR, y las realizaciones preferidas de los mismos. Se entiende que (i) una realización preferida de la combinación para uso según la presente invención comprende una realización preferida del modulador de puntos de control inmunitarios; (ii) una realización preferida de la combinación para uso según la presente invención comprende una realización preferida del complejo que comprende el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o epítipo antigénico y el al menos un agonista peptídico de TLR; y (iii) una realización más preferida de la combinación para uso según la presente invención comprende una realización preferida del modulador de puntos de control inmunitarios y una realización preferida del complejo que comprende el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o epítipo antigénico y el al menos un agonista peptídico de TLR.

Modulador de puntos de control inmunitarios

Tal como se utiliza en el presente documento (es decir, en toda la presente memoria descriptiva), el término "modulador de puntos de control inmunitarios" (también denominado "modulador de puntos de control") se refiere a una molécula o a 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 puntos de control inmunitarios puede ser un "inhibidor de puntos de control inmunitarios" (también denominado "inhibidor de puntos de control" o "inhibidor") o un "activador de puntos de control inmunitarios" (también denominado "activador de puntos de control" o "activador"). Un "inhibidor de puntos de control inmunitarios" (también denominado "inhibidor de puntos 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 puntos de control inmunitarios" (también denominado "activador de puntos de control" o "activador") activa, estimula, aumenta, refuerza, apoya o modula positivamente la función de una o más moléculas de puntos de control total o parcialmente. Los moduladores de puntos de control inmunitarios son típicamente capaces de modular (i) la autotolerancia y/o (ii) la amplitud y/o la duración de la respuesta inmune. Preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios usado según la presente invención modula la función de una o más moléculas de puntos de control humanos y, por tanto, es un "modulador de puntos de control humanos". Preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios es un activador o un inhibidor de una o más moléculas de puntos de control inmunitarios 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.

Las moléculas de puntos 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. Por consiguiente, la función de las moléculas de punto de control, que es modulada (por ejemplo, total o parcialmente reducida, inhibida, interferida, activada, estimulada, aumentada, reforzada o apoyada) por los moduladores de punto de control, es típicamente la (regulación de) la activación de células T, la proliferación de células T y/o la función de células T. Así pues, las moléculas de puntos de control inmunitarios regulan y mantienen la autotolerancia y la duración y amplitud de las respuestas inmunes fisiológicas. Muchas de las moléculas de control de punto 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 dominio citoplasmático (véase Susumu Suzuki *et al.*, 2016: Current status of immunotherapy. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2016: doi: 10.1093/jco/hyv201 [publicación electrónica antes de impresión]; en particular, Tabla 1).

Desde hace una década, se ha venido analizando el papel de la familia B7 y se han identificado nuevos miembros y nuevas funciones de estas importantes moléculas reguladoras de células T (Greenwald, R.J., G.J. Freeman, y A.H. Sharpe, The B7 family revisited. Annu Rev Immunol, 2005. 23: págs. 515-48). En la actualidad, la familia B7:CD28 comprende las vías más utilizadas en la investigación de los puntos de control inmunitarios. Los mecanismos iniciales y complejos de CTLA-4 - B7-1/B7-2 fueron progresivamente secundados por la interesantísima pareja PD-1 - B7-H1(PDL1)/B7-DC(PD-L2) que demostró tener una asociación con muchos microambientes tumorales inmunológicos y clínicos (Zou, W. y L. Chen, Inhibitory B7-family molecules in the tumor microenvironment. Nat Rev Immunol, 2008. 8(6): págs. 467-77). Otro miembro de esta familia es ICOS-ICOSL/B7-H2, que se identificó en el mismo periodo. Otros miembros de esa familia incluyen B7-H3 (Chapoval, A.I., *et al.*, B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. Nat Immunol, 2001. 2(3): págs. 269-74) y B7-H4 (Sica, G.L., *et al.*, B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. Immunity, 2003. 18(6): págs. 849-61), aunque aún no se han identificado los receptores de ambos ligandos. Sin embargo, la función de B7-H3 en la inmunidad antitumoral (Loos, M., *et al.*, B7-h3 and its role in antitumor immunity. Clin Dev Immunol, 2010. 2010: p. 683875) y su papel en la evasión inmune tumoral (Hofmeyer, K.A., A. Ray, y X. Zang, The contrasting role of B7-H3. Proc Natl Acad Sci USA, 2008.105(30): págs. 10277-8) así como su sobreexpresión en muchos cánceres en estadio avanzado (Zou, W. y L. Chen, Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol, 2008. 8(6): págs. 467-77), concretamente en el cáncer colorrectal (Sun, J., *et al.*, Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H3 in human colorectal carcinoma. Cancer Immunol Immunother, 2010. 59(8): págs. 1163-71), sugieren que se seguirá investigando en esa dirección. Del mismo modo, B7-H4 ha entrado recientemente en el bucle de evaluación como posible agente que actúa sobre el escape inmunitario tumoral y la respuesta antitumoral (Dangaj, D. y N. Scholler, Blocking the B7-H4 pathway with novel recombinant antibodies enhances T cell-mediated antitumor responses. Oncoimmunology, 2013. 2(8): p. e25913; Dangaj, D., *et al.*, Novel recombinant human b7-h4 antibodies overcome tumoral immune escape to potentiate T-cell antitumor responses. Cancer Res, 2013. 73(15): págs. 4820-9) o interactuando con muchas vías de quinasas (Wang, X., *et al.*, B7-H4 Treatment o/TCells Inhibits ERK, JNK, p38, and AKT Activation. PLoS One, 2012. 7(1): p. e28232). Los resultados de este interés se ven subrayados por una publicación sobre un conjugado anticuerpo-fármaco anti-B7-H4 para el tratamiento del cáncer de mama (Leong, S.R., *et al.*, An anti-b7-h4 antibody-drug conjugate for the treatment of breast cancer. Mol Pharm, 2015.12(6): págs.1717-29).

CD28 se expresa constitutivamente en casi todas las células T CD4+ humanas y en aproximadamente la mitad de todas las células T CD8. La unión con sus dos ligandos, CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), expresados en las células dendríticas, provoca la expansión de las células T. La molécula coestimuladora de puntos de control CD28 compete con la molécula inhibidora de puntos de control CTLA4 por los mismos ligandos, CD80 y CD86 (véase Buchbinder E. I. y Desai A., 2016: CTLA-4 and PD-1 Pathways - Similarities, Differences and Implications of Their Inhibition; American Journal of Clinical Oncology, 39(1): 98-106).

La proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4; también conocida como CD152) es un homólogo de CD28 con una afinidad de unión mucho mayor por B7. Los ligandos de CTLA-4 son CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), de forma similar a CD28. Sin embargo, a diferencia de CD28, la unión de CTLA4 a B7 no produce una señal estimuladora, sino que impide la señal coestimuladora que normalmente proporciona CD28. Además, se supone que la unión de CTLA4 a B7 produce incluso una señal inhibidora que contrarresta las señales estimuladoras de la unión CD28:B7 y TCR:MHC. CTLA-4 se considera el "líder" de los puntos de control inmunitarios inhibidores, ya que detiene las células T potencialmente autorreactivas en la etapa inicial de activación de las células T vírgenes, típicamente en los ganglios linfáticos (Buchbinder E. I. y Desai A., 2016: CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences and Implications of Their Inhibition; American Journal of Clinical Oncology, 39(1): 98-106). Los inhibidores de puntos de control de CTLA4 preferidos incluyen los anticuerpos monoclonales Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y Tremelimumab (Pfizer/MedImmune). Otros inhibidores de CTLA-4 preferidos incluyen los anticuerpos anti-CTLA4 descritos en los documentos WO 2001/014424, WO 2004/035607, US 2005/0201994 y EP 1212422 B1. Anticuerpos CTLA-4 preferidos adicionales se describen en los documentos US 5.811.097, US 5.855.887, US 6.051.227, US 6.984.720, WO 01/14424, WO 00/37504, US 2002/0039581 y US 2002/086014. Otros anticuerpos anti-CTLA-4 preferidos que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 98/42752; US 6.682.736 y US 6.207.156; Hurwitz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17):10067-10071 (1998); Camacho *et al.*, J. Clin. Oncology, 22(145): Abstract No. 2505 (2004) (anticuerpo CP-675206); Mokyr *et al.*, Cancer Res., 58:5301-5304 (1998), en los documentos US 5.977.318, US 6.682.736, US 7.109.003 y en US 7.132.281.

El receptor de muerte programada 1 (PD1) tiene dos ligandos, PD-L1 (también conocido como B7-H1 y CD274) y PD-L2 (también conocido como B7-DC y CD273). La vía PD1 regula las células T previamente activadas en las últimas etapas de una respuesta inmune, principalmente en tejidos periféricos. Por lo tanto, una ventaja de dirigirse a PD1 es que puede restaurar la función inmune en el microambiente tumoral. Los inhibidores preferidos de la vía PD1 incluyen Opdivo® (Nivolumab; Bristol Myers Squibb), Keytruda® (Pembrolizumab; Merck), Durvalumab (MedImmune/AstraZeneca), MEDI4736 (AstraZeneca; véase el documento WO 2011/066389 A1), Atezolizumab (MPDL3280A, Roche/Genentech; véase el documento US 8.217.149 B2), Pidilizumab (CT-011; CureTech), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), Avelumab (Merck), MSB-0010718C (Merck), PDR001 (Novartis), BMS -936559 (Bristol Myers Squibb), REGN2810 (Regeneron Pharmaceuticals), MIH1 (Affymetrix), AMP-224 (Amplimmune, GSK), BGB-A317 (BeiGene) y Lambrolizumab (por ejemplo, divulgado como hPD109A y sus derivados humanizados h409AII, h409A16 y h409A17 en el documento WO2008/156712; Hamid *et al.*, 2013; N. Engl. J. Med. 369: 134-144).

El coestimulador inducible de células T (ICOS; también conocido como CD278) se expresa en células T activadas. Su ligando es ICOSL (B7-H2; CD275), expresado principalmente en células B y células dendríticas. La molécula parece ser importante en la función efectora de las células T.

B7-H3 (también conocida como CD276) se entendió originalmente como una molécula coestimuladora, pero ahora se considera coinhibitoria. Un inhibidor preferido de puntos de control de B7-H3 es el anticuerpo monoclonal optimizado para Fc Enoblituzumab (MGA271; MacroGenics; véase el documento US 2012/0294796 A1).

B7-H4 (también conocido como VTCN1), es expresado por células tumorales y macrófagos asociados a tumores y participa en el escape tumoral. Los inhibidores de B7-H4 preferidos son los anticuerpos descritos en Dangaj, D. *et al.*, 2013; Cancer Research 73(15): 4820-9 y en la Tabla 1 y la descripción respectiva de Jenessa B. Smith *et al.*, 2014: B7-H4 as a potential target for immunotherapy for gynecologic cancers: A closer look. Gynecol Oncol 134(1): 181-189. Otros ejemplos preferidos de inhibidores de B7-H4 incluyen anticuerpos contra B7-H4 humano como se divulga, por ejemplo, en los documentos WO 2013/025779 A1 y WO 2013/067492 A1 o formas recombinantes solubles de B7-H4, como se divulga en el documento US 2012/0177645 A1.

La superfamilia de TNF comprende, en particular, 19 ligandos proteicos que se unen a 29 receptores de citoquinas. Están involucrados en muchas respuestas fisiológicas como la apoptosis, la inflamación o la supervivencia celular (Croft, M., C.A. Benedict y C.F. Ware, Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. Nat Rev Drug Discov, 2013.12(2): págs. 147 -68). Estos efectos comúnmente encontrados hacen que los miembros de la superfamilia TNF sean muy atractivos para el desarrollo de fármacos (más de 60 fármacos de la familia TNF en desarrollo en 2013 (Croft, M., C.A. Benedict y C.F. Ware, Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. Nat Rev Drug Discov, 2013.12(2): págs. 147-68)) pero también difíciles de manejar debido a los posibles efectos opuestos que deben equilibrarse (Aggarwal, B.B., Signaling Paths of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol, 2003 3(9): págs. 745-56). Croft, M., CA. Benedicto y C.F. Ware, Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. Nat Rev Drug Discov, 2013.12(2): págs. 147-68 sugieren priorizar nueve receptores para indicaciones oncológicas: TNFRSF4 (OX40/OX40L), TNFRSFs (CD40L/CD40), TNFRSF7 (CD27/CD70), TNFRSF8 (CD30/CD30L), TNFRSF9 (4-1BB/4-1BBL), TNFRSF10 (TRAILR/TRAIL), TNFRSF12 (FN14/TWEAK), TNFRSF13 (BAFFRTACI/APRIL-BAFF) y TNFRSF18 (GITR/GITRL) (Avogadri, F., *et al.*, Modulation of CTLA-4 and CTR/or cancer immunotherapy. Curr Top Microbiol Immunol, 2011. 344: págs. 211-44; Naidoo, J., D.B. Page y J.D. Wolchok, Immune modulation for cancer therapy. Br J Cancer, 2014.111(12): págs. 2214-9). Esta lista se complementa para inmunoterapias con Bremer, E., Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy. ISRN Oncol, 2013. 2013: págs. 371854), añadiendo Fas-Ligand y TNFRSF1 (TNFα/TNFR). Además, la vía del atenuador de linfocitos B y T (BTLA)/mediador de entrada del virus del herpes (HVEM) debe considerarse como objetivo para mejorar las respuestas inmunitarias, al igual que el bloqueo de CTLA-4 (Croft, M., C.A. Benedict y C.F. Ware, Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. Nat Rev Drug Discov, 2013.12(2): págs.147-68. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención se prefieren tales moduladores de puntos de control para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer, que modulan una o más moléculas de puntos de control seleccionadas de TNFRSF4 (OX40/OX40L), TNFRSFs (CD40L/CD40), TNFRSF7 (CD27/CD70), TNFRSF9 (4-1BB/4-1BBL), TNFRSF18 (GITR/GITRL), FasR/DcR3/ligando Fas, TNFRSF1 (TNFα/TNFR), BTLA/HVEM y CTLA4.

OX40 (también conocido como CD134 o TNFRSF4) promueve la expansión de las células T efectoras y de memoria, pero también es capaz de suprimir la diferenciación y la actividad de las células T reguladoras y de regular la producción de citoquinas. El ligando de OX40 es OX40L (también conocido como TNFSF4 o CD252). OX40 se expresa transitoriamente después de la activación del receptor de células T y solo se regula positivamente en las células T activadas por antígeno más recientemente dentro de las lesiones inflamatorias. Los moduladores de puntos de control preferidos de OX40 incluyen MEDI6469 (MedImmune/AstraZeneca), MEDI6383 (MedImmune/AstraZeneca), MEDI0562 (MedImmune/AstraZeneca), MOXR0916 (RG7888; Roche/Genentech) y GSK3174998 (GSK).

CD40 (también conocido como TNFRSF5) es expresado por diversas células del sistema inmune, incluidas las células presentadoras de antígenos. Su ligando CD40L, también conocido como CD154 o TNFSF5, se expresa transitoriamente en la superficie de las células T CD4+ activadas. La señalización CD40 "autoriza" a las células dendríticas a madurar y, por tanto, desencadena la activación y diferenciación de las células T. Sin embargo, las

células tumorales también pueden expresar CD40 y, por tanto, la estimulación/activación de CD40 en pacientes con cáncer puede ser beneficiosa o perjudicial. En consecuencia, se han desarrollado moduladores estimuladores e inhibidores de este punto de control inmunitario (Sufia Butt Hassan, Jesper Freddie Sorensen, Barbara Nicola Olsen y Anders Elm Pedersen, 2014: Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 36:2, 96-104). Ejemplos preferidos de moduladores del punto de control de CD40 incluyen (i) anticuerpos agonistas anti-CD como se describe en Sufia Butt Hassan, Jesper Freddie Sorensen, Barbara Nicola Olsen y Anders Elm Pedersen, 2014: Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 36:2, 96-104, como Dacetuzumab (SGN-40), CP-870893, FGK 4.5/FGK 45 y FGK115, preferentemente Dacetuzumab, y (ii) anticuerpos antagonistas anti-CD como se describe en Sufia Butt Hassan, Jesper Freddie Sorensen, Barbara Nicola Olsen y Anders Elm Pedersen, 2014: Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 36:2, 96-104, como Lucatumumab (HCD122, CHIR-12.12). Otros moduladores de puntos de control inmunitarios de CD40 preferidos incluyen SEA-CD40 (Seattle Genetics), ADC-1013 (Alligator Biosciences), APX005M (Apexigen Inc) y RO7009789 (Roche).

CD27 (también conocido como TNFRSF7) favorece la expansión específica de antígeno de células T vírgenes y desempeña un papel importante en la generación de memoria de células T. CD27 también es un marcador de memoria de las células B. La disponibilidad transitoria de su ligando, CD70 (también conocido como TNFSF7 o CD27L), en linfocitos y células dendríticas regula la actividad de CD27. Además, se sabe que la coestimulación de CD27 suprime la función de las células efectoras Th17. Un modulador preferido de puntos de control inmunitarios de CD27 es Varlilumab (Celldex). Los moduladores preferidos de puntos de control inmunitario de CD70 incluyen ARGX-110 (arGEN-X) y SGN-CD70A (Seattle Genetics).

CD137 (también conocido como 4-1BB o TNFRSF9) es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y se asocia cada vez más con la actividad coestimuladora de las células T activadas. En particular, la señalización de CD137 (a través de su ligando CD137L, también conocido como TNFSF9 o 4-1BBL) da lugar a la proliferación de células T y protege a las células T, en particular, a las células T CD8+, de la muerte celular inducida por la activación. Los moduladores de puntos de control de CD137 preferidos incluyen PF-05082566 (Pfizer) y Urelumab (BMS).

El gen relacionado con la familia TNFR inducido por glucocorticoides (GITR, también conocido como TNFRSF18), provoca la expansión de células T, incluida la expansión de las Treg. El ligando de GITR (GITRL, TNFSF18) se expresa principalmente en células presentadoras de antígenos. Se ha demostrado que los anticuerpos contra GITR promueven una respuesta antitumoral mediante la pérdida de estabilidad del linaje Treg. Los moduladores de puntos de control de GITR preferidos incluyen BMS-986156 (Bristol Myers Squibb), TRX518 (GITR Inc) y MK-4166 (Merck).

Otra molécula de puntos de control preferida a modular es BTLA. El atenuador de linfocitos B y T (BTLA; también conocido como CD272) se expresa en particular mediante células T CD8+, donde la expresión superficial de BTLA se regula a la baja gradualmente durante la diferenciación de las células T CD8+ humanas del fenotipo de célula virgen al fenotipo de célula efectora. Sin embargo, las células T CD8+ humanas específicas de tumores expresan altos niveles de BTLA. La expresión de BTLA se induce durante la activación de las células T, y BTLA permanece expresada en las células Th1, pero no en las Th2. Al igual que PD1 y CTLA4, BTLA interactúa con un homólogo de B7, B7H4. Sin embargo, a diferencia de PD-1 y CTLA-4, BTLA muestra inhibición de células T mediante la interacción con receptores de la familia de necrosis tumoral (TNF-R), no solo con la familia B7 de receptores de superficie celular. BTLA es un ligando de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (receptor), miembro 14 (TNFRSF14), también conocido como mediador de entrada del virus del herpes (HVEM; Herpesvirus Entry Mediator, también conocido como CD270). Los complejos BTLA-HVEM regulan negativamente las respuestas inmunitarias de las células T. Los inhibidores de BTLA preferidos son los anticuerpos descritos en la Tabla 1 de Alison Crawford y E. John Wherry, 2009: Editorial: Therapeutic potencial of targeting BTLA. *Journal of Leukocyte Biology* 86: 5-8, en particular los anticuerpos humanos de los mismos. Otros anticuerpos preferidos en este contexto, que bloquean la interacción de BTLA humana con su ligando, se divulgan en el documento WO 2011/014438, tal como "4C7" como se describe en el documento WO 2011/014438.

Otra familia de moléculas de puntos de control incluye moléculas de puntos de control relacionadas con las dos clases principales de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (MHC de clase I y clase II). Su función es desencadenar una respuesta del sistema inmune a través de sus respectivas vías; el receptor tipo Ig asesino (KIR) para la clase I y el gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3) para la clase II parecen abrir nuevas estrategias inmunoterapéuticas para el tratamiento de pacientes con cáncer (Hemon, P., *et al.*, MHC class II engagement by its ligand LAG-3 (CD223) contributes to melanoma resistance to apoptosis. *J Immunol*, 2011. 186(9): págs. 5173-83 Thielens, A., E. Vivier y F. Romagne, NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol*, 2012. 24(2): págs. 239-45).

El receptor tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR) es un receptor para moléculas MHC de clase I en células asesinas naturales. Un inhibidor a modo de ejemplo de KIR es el anticuerpo monoclonal Lirilumab (IPH 2102; Innate Pharma/BMS; véanse el documento US 8.119.775 B2 y Benson *et al.*, 2012, *Blood* 120:4324-4333).

La señalización del gen de activación linfocitaria 3 (LAG3, también conocido como CD223) conduce a la supresión de

una respuesta inmune por acción sobre las Treg así como por efectos directos sobre las células T CD8+. Un ejemplo preferido de un inhibidor de LAG3 es el anticuerpo monoclonal anti-LAG3 BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb). Otros ejemplos preferidos de un inhibidor de LAG3 incluyen LAG525 (Novartis), IMP321 (Immutep) y LAG3-Ig como se divulga en el documento WO 2009/044273 A2 y en Brignon *et al.*, 2009, lin. Cancer Res. 15: 6225-6231, así como anticuerpos de ratón o humanizados que bloquean LAG3 humano (por ejemplo, IMP701 como se describe en el documento WO 2008/132601 A1), o anticuerpos completamente humanos que bloquean LAG3 humano (como se divulga en el documento EP 2320940 A2).

Otra vía de moléculas de puntos de control es la vía TIM-3/GAL9. El dominio de inmunoglobulina de células T y el dominio de mucina 3 (TIM-3, también conocido como HAVcr-2) se expresan en células T CD4+ humanas activadas y regula las citoquinas Th1 y Th17. TIM-3 actúa como un regulador negativo de la función Th1/Tc1 desencadenando la muerte celular tras la interacción con su ligando, galectina-9 (GAL9). TIM-3 es una molécula de superficie celular específica de T helper tipo 1 que regula la inducción de la tolerancia periférica. En efecto, un estudio reciente ha demostrado que los anticuerpos TIM-3 pueden mejorar significativamente la inmunidad antitumoral (Ngiow, S.F., *et al.*, Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN-gamma-mediated antitumor immunity and suppresses established tumors. Cancer Res, 2011. 71(10): págs. 3540-51). Ejemplos preferidos de inhibidores de TIM-3 incluyen anticuerpos dirigidos a TIM3 humano (por ejemplo, como se divulga en el documento WO 2013/006490 A2) o, en particular, el anticuerpo bloqueador de TIM3 antihumano F38-2E2 como divulgan Jones *et al.*, 2008, J Exp. Medicina. 205 (12): 2763-79.

Más recientemente, se sugirió una nueva diana denominada CEACAM1 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario), ya que estudios recientes mostraron el papel de los miembros de la familia CEA CAM en la modulación de las respuestas inmunitarias asociadas con el cáncer (Huang, Y.H., *et al.*, CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. Nature, 2015. 517(7534): págs. 386-90; Gray-Owen, SD y R.S. Blumberg, CEACAM1: contact-dependent control of immunity. Nat Rev Immunol, 2006. 6(6): págs.433-46). Un modulador de puntos de control preferido de CEACAM1 es CM-24 (cCAM Biotherapeutics).

Otra nueva molécula de puntos de control inmunitarios es GARP, que desempeña un papel en la capacidad de los tumores para escapar del sistema inmunológico del paciente. Actualmente en ensayos clínicos, el candidato (ARGX-115) parece demostrar un efecto interesante. Por consiguiente, ARGX-115 es un modulador de puntos de control GARP preferido.

Además, varios grupos de investigación han demostrado que otra molécula de puntos de control es la fosfatidilserina (también denominada "PS") que puede ser un objetivo para el tratamiento del cáncer (Creelan, B.C., Update on immune checkpoint inhibitors in lung cancer. Cancer Control, 2014. 21(1): págs. 80-9; Yin, Y., *et al.*, Phosphatidylserine-targeting antibody induces M1 macrophage polarization and promotes myeloid-derived suppressor cell differentiation. Cancer Immunol Res, 2013. 1(4): págs. 256-68). Un modulador de puntos de control preferido de la fosfatidilserina (PS) es Baviximab (Peregrine).

Otra vía de puntos de control es CSF1/CSF1R (Zhu, Y., *et al.*, CSF1/CSF1R Blockade Reprograms Tumor-Infiltrating Macrophages and Improves Response to T-cell Checkpoint Immunotherapy in Pancreatic Cancer Models. Cancer Research, 2014. 74 (18): págs. 5057-5069). Los moduladores de puntos de control preferidos de CSF1R incluyen FPA008 (FivePrime), IMC-CS4 (Eli-Lilly), PLX3397 (Plexxicon) y RO5509554 (Roche).

Además, se evalúa el papel del receptor de células asesinas naturales CD94/NKG2A en el carcinoma de cuello uterino (Sheu, B.C., *et al.*, Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumor infiltrating CD8+ T lymphocytes in human cervical carcinoma. Cancer Res, 2005. 65(7): págs. 2921-9) y en la leucemia (Tanaka, J., *et al.*, Cytolytic activity against primary leukemic cells by inhibitory NK cell receptor (CD94/NKG2A)-expressing T cells expanded from various sources of blood mononuclear cells. Leukemia, 2005. 19(3): págs. 486-9). Un modulador de puntos de control preferido de NKG2A es IPH2201 (Innate Pharma).

Otra molécula de puntos de control preferida es IDO, la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa de la vía de la quinurenina (Ball, H.J., *et al.*, Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. Int J Biochem Cell Biol, 2009. 41(3): págs. 467-71). La indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) es una enzima catabólica de triptófano con propiedades inmunoinhibitorias. Se sabe que IDO suprime las células T y NK, genera y activa Treg y células supresoras derivadas de mieloides y promueve la angiogénesis tumoral. IDO1 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer y se ha demostrado que permite que las células tumorales escapen del sistema inmunológico (Liu, X., *et al.*, elective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. Blood, 2010. 115 (17): págs. 3520-30; Ino, K., *et al.*, Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. Clin Cancer Res, 2008. 14 (8): págs. 2310-7) y para facilitar la progresión tumoral crónica cuando es inducida por inflamación local (Muller, A.J., *et al.*, Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxigenase. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 2008. 105 (44): págs. 17073-8). Inhibidores de IDO preferidos incluyen exiguamina A, epacadostat (INCB024360; InCyte), Indoximod (NewLink Genetics), NLG919 (NewLink Genetics/Genentech), GDC-0919 (NewLink Genetics/Genentech), F001287 (Flexus Biosciences/BMS) y moléculas pequeñas tales como 1-metil-triptófano, en particular 1-metil-[D]-triptófano y los inhibidores de IDO

enumerados en la Tabla 1 de Sheridan C., 2015: IDO inhibitors move center stage in immune-oncology; *Nature Biotechnology* 33: 321-322.

Otra molécula de puntos de control inmunitarios preferida a modular es también miembro de la vía metabólica de la quinurenina: TDO (triptófano-2,3-dioxigenasa). Varios estudios ya han demostrado el interés de la TDO en la inmunidad y la autoinmunidad contra el cáncer (Garber, K., Evading immunity: new enzyme implicated in cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2012. 104(5): págs. 349-52; Platten, M., W. Wick y B.J. Van den Eynde, Tryptophan catabolism in cancer: beyond DO and tryptophan depletion. *Cancer Res*, 2012. 72(21): págs. 5435-40; Platten, M., *et al.*, Cancer Immunotherapy by Targeting IDO/TDO and Their Downstream Effectors. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 673).

Otra molécula de puntos de control inmunitarios preferida para ser modulada es A2AR. El receptor de adenosina A2A (A2AR) se considera un punto de control importante en la terapia contra el cáncer porque el microambiente tumoral suele tener concentraciones relativamente altas de adenosina, lo que activa el A2AR. Dicha señalización proporciona un bucle de retroalimentación inmune negativa en el microambiente inmunitario (para una revisión, véase Robert D. Leone *et al.*, 2015: A2aR antagonists: Next Generation checkpoint blockade for cancer immunotherapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 13: 265-272). Los inhibidores de A2AR preferidos incluyen Istradefylline, PBS-509, ST1535, ST4206, Tozadenant, V81444, Preladenant, Vipadenant, SCH58261, SYN115, ZM241365 y FSPTP.

Otra molécula de puntos de control inmunitarios preferida a modular es VISTA. El supresor de activación de células T de dominio V (VISTA; también conocido como C10orf54) se expresa principalmente en células hematopoyéticas, de modo que la expresión constante de VISTA en leucocitos dentro de los tumores puede permitir que el bloqueo de VISTA sea eficaz en una amplia gama de tumores sólidos. Un inhibidor de VISTA preferido es JNJ-61610588 (ImmuNext), un anticuerpo anti-VISTA, que ha entrado recientemente en la fase 1 de ensayos clínicos.

Otra molécula de puntos de control inmunitarios es CD122. CD122 es la subunidad beta del receptor de interleucina-2. CD122 aumenta la proliferación de células T CD8+ efectoras.

Los ejemplos más preferidos de moléculas de puntos de control incluyen la "vía CTLA4" y la "vía PD1" con CTLA4 y sus ligandos CD80 y CD86, así como PD1 con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 (más detalles sobre las vías CTLA4 y PD-1, así como otras sustancias implicadas, se describen en Buchbinder E. I. y Desai A., 2016: CTLA-4 and PD-1 Pathways - Similarities, Differences and Implications of Their Inhibition; *American Journal of Clinical Oncology*, 39(1): 98-106). De forma más general, ejemplos preferidos de moléculas de puntos de control incluyen 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 así como, en particular, sus ligandos.

Las moléculas de puntos de control inmunitario son responsables de interacciones coestimuladoras o inhibitoras de las respuestas de las células T. Por consiguiente, las moléculas de puntos de control pueden dividirse en (i) moléculas de puntos de control (co)estimuladoras y (ii) moléculas de puntos de control inhibitoras. Por lo general, las moléculas de puntos de control (co)estimuladoras actúan positivamente en conjunto con la señalización del receptor de células T (TCR) inducida por la estimulación antigénica y las moléculas de puntos de control inhibitoras regulan negativamente la señalización de TCR. Ejemplos de moléculas de puntos de control (co)estimuladoras incluyen CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR e ICOS. Ejemplos de moléculas de puntos de control inhibitoras incluyen CTLA4 y PD1 con sus ligandos PD-L1 y PD-L2; y A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, IDO, KIR, LAG3, TIM-3, VISTA, CEACAM1, GARP, PS, CSF1R, CD94/NKG2A, TDO, TNFR y FasR/DcR3.

Preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios es un activador de una molécula (co)estimuladora de puntos de control, un inhibidor de una molécula inhibidora de puntos de control o una combinación de los mismos. Por consiguiente, el modulador de puntos de control inmunitarios es más preferentemente (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.

Como se ha descrito anteriormente, se conocen varios moduladores (inhibidores/activadores) de CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR, ICOS, A2AR, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, PD1, PDL-1, PD-L2, IDO, LAG-3, BTLA, TIM3, VISTA, KIR, CEACAM1, GARP, PS, CSF1R, CD94/NKG2A, TDO, TNFR y/o FasR/DcR3 y algunos de ellos ya están en ensayos clínicos o incluso aprobados. Sobre la base de estos moduladores de puntos de control inmunitarios conocidos, es posible que en un futuro (próximo) se desarrollen moduladores de puntos de control inmunitarios alternativos. En particular, los moduladores conocidos de las moléculas de puntos de control inmunitario preferidos pueden usarse como tales o pueden usarse análogos de los mismos, en particular, formas quimerizadas, humanizadas o humanas de anticuerpos.

Más preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de una molécula inhibidora de puntos de control (pero preferentemente ningún inhibidor de una molécula estimuladora de puntos de control). Por consiguiente, el modulador de puntos de control inmunitarios es incluso más preferentemente 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 las mismas.

También se prefiere que el modulador de puntos de control inmunitarios sea un activador de una molécula de puntos de control estimuladora o coestimuladora (pero preferentemente ningún activador de una molécula inhibidora de puntos de control). Por consiguiente, el modulador de puntos de control inmunitarios es más preferentemente un activador de CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR y/o ICOS o de un ligando de las mismas.

Es incluso más preferente que el modulador de puntos de control inmunitarios sea un modulador de la vía CD40, de la vía IDO, de la vía CTLA-4 y/o de la vía PD-1. En particular, el modulador de puntos de control inmunitarios es preferentemente un modulador de CD40, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO, más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO o un activador de CD40, incluso más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-1 y/o IDO y más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4 y/o PD-1.

Es incluso más preferente que el modulador de puntos de control inmunitarios sea un modulador de la vía CD40, de la vía IDO, de la vía LAG3, de la vía CTLA-4 y/o de la vía PD-1. En particular, el modulador de puntos de control inmunitarios es preferentemente un modulador de CD40, LAG3, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO, más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1, LAG3 y/o IDO o un activador de CD40, incluso más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-1, LAG3 y/o IDO, incluso más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de LAG3, CTLA-4 y/o PD-1, y lo más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4 y/o PD-1.

Por consiguiente, el modulador de puntos de control puede seleccionarse de entre moduladores conocidos de la vía CD40, la vía CTLA-4 o la vía PD-1. Preferentemente, el modulador de puntos de control puede seleccionarse de entre moduladores conocidos de la vía CD40, la vía LAG3, la vía CTLA-4 o la vía PD-1. Los inhibidores preferidos de la vía CTLA-4 y de la vía 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 el documento WO 2011/066389 A1), MPDL3280A (Roche/Genentech; véase el documento US 8.217.149 B2), Pidilizumab (CT-011; CureTech), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), MSB-0010718C (Merck), MIH1 (Affymetrix) y Lambrolizumab (por ejemplo, divulgado como hPD109A y sus derivados humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en el documento WO2008/156712; Hamid *et al.*, 2013; N. Engl. J. Med. 369: 134-144). Los inhibidores de puntos de control más preferidos incluyen los inhibidores de CTLA-4 Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y Tremelimumab (Pfizer/MedImmune), así como los inhibidores de PD-1 Opdivo® (Nivolumab; Bristol Myers Squibb), Keytruda® (Pembrolizumab; Merck), Pidilizumab (CT-011; CureTech), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), AMP-224 y Lambrolizumab (por ejemplo, divulgado como hPD109A y sus derivados humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en el documento WO2008/156712; Hamid O. *et al.*, 2013; N. Engl. J. Med. 369: 134-144). Como se ha descrito anteriormente, un ejemplo preferido de un inhibidor de LAG3 es el anticuerpo monoclonal anti-LAG3 BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb). Otros ejemplos preferidos de un inhibidor de LAG3 incluyen LAG525 (Novartis), IMP321 (Immutep) y LAG3-Ig como se describe en el documento WO 2009/044273 A2 y en Brignon *et al.*, 2009, Clin. Cancer Res. 15: 6225-6231, así como anticuerpos de ratón o humanizados que bloquean LAG3 humano (por ejemplo, IMP701 como se describe en el documento WO 2008/132601 A1), o anticuerpos completamente humanos que bloquean LAG3 humano (como se describe en el documento EP 2320940 A2).

Preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios no es un modulador de CD40. En particular, se prefiere que el modulador de puntos de control inmunitarios no sea un ligando de CD40. También se prefiere que el modulador de puntos de control inmunitarios no sea un anticuerpo anti-CD40.

En el contexto de la presente invención se prefiere el uso de más de un modulador de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, inhibidor de punto de control), en particular al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos (por ejemplo, inhibidores de puntos de control), preferentemente 2, 3, 4 o 5 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos (por ejemplo, inhibidores de puntos de control), más preferentemente 2, 3 o 4 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos (por ejemplo, inhibidores de puntos de control), incluso más preferentemente 2 o 3 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos (por ejemplo, inhibidores de puntos de control) y, más preferentemente, 2 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos (por ejemplo, inhibidores de puntos de control). Por lo tanto, moduladores de puntos de control inmunitarios "distintos" (por ejemplo, inhibidores de puntos de control) significa, en particular, que modulan (por ejemplo, inhiben) diferentes vías de moléculas de puntos de control.

Preferentemente, un inhibidor de la vía PD-1 se combina con un inhibidor de la vía CTLA-4. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, la FDA aprobó en 2015 una terapia combinada con Nivolumab (anti-PD1) e Ipilimumab (anti-CTLA4) para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico o irresecable BRAF V600 de tipo salvaje. Además, recientemente se informó de un exitoso estudio de fase 1b sobre la combinación de Durvalumab (anti-PD-L1) y Tremelimumab (anti-CTLA4) en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Antonia, Scott *et al.*, 2016 Safety and antitumour activity of durvalumab plus tremelimumab in non-small cell lung cancer: a multicentre, phase 1b study;

Lancet Oncol. 5 de febrero de 2016. pii: S1470-2045(15)00544-6. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00544-6. [Publicación electrónica antes de impresión]. Por consiguiente, las combinaciones preferidas de moduladores de puntos de control inmunitarios de la vía PD-1 y de la vía CTLA-4 son (i) Nivolumab (anti-PD1) e Ipilimumab (anti-CTLA4) o (ii) Durvalumab (MED14736; anti-PD- L1) y Tremelimumab (anti-CTLA4). También se prefieren combinaciones de los mismos, por ejemplo, Nivolumab (anti-PD1) y Tremelimumab (anti-CTLA4) o Durvalumab (MED14736; anti-PD-L1) e Ipilimumab (anti-CTLA4).

Otras combinaciones preferidas de al menos dos moduladores de puntos de control inmunitarios distintos en el contexto de la presente invención pueden comprender una combinación seleccionada de (i) una combinación de un inhibidor de KIR y un inhibidor de CTLA-4, tal como Lirilumab/Ipilimumab; (ii) una combinación de un inhibidor de KIR y un inhibidor de la vía PD-1, tal como un inhibidor de PD-1, por ejemplo Lirilumab/Nivolumab; (iii) una combinación de un inhibidor de LAG3 y un inhibidor de la vía PD-1, tal como un inhibidor de PD-1 o un inhibidor de PD-L1, por ejemplo, como se describe en Woo *et al.*, 2012, Cancer Res. 72: 917-27 o en Butler N. S. *et al.*, 2011, Nat Immunol. 13: 188-95) y los ejemplos preferidos de dicha combinación incluyen Novilumab/BMS-986016 y PDR001/LAG525; (iv) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a ICOS y un inhibidor de CTLA-4, por ejemplo, como se describe en Fu *et al.*, 2011, Cancer Res. 71: 5445-54; (v) una combinación de moduladores de puntos de control que modulan 4-1 BB e inhibidores de CTLA-4, tal como se describe en Curran *et al.*, 2011, PLoS One 6(4): el 9499; (vi) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a PD1 y CD27, como Novilumab/Varlilumab y Atezolizumab/Varlilumab; (vii) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a OX40 y CTLA-4, como MEDI6469/Tremelimumab; (viii) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a OX40 y PD-1, como MEDI6469/MEDI4736, MOXR0916/MPDL3280A, MEDI6383/MEDI4736 y GSK3174998/Pembrolizumab; (ix) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a PD-1 y 4-1BB, como Novilumab/Urelumab, Pembrolizumab/PF-05082566 y Avelumab/PF-05082566; (x) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a PD-1 e IDO, como Ipilimumab/Indoximod, Pembrolizumab/INCB024360, MEDI4736/INCB024360, MPDL3280A/GDC-0919 y Atezolizumab/INCB024360; (xi) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a PD-1 y CSF1R, como Pembrolizumab/PLX3397, Novilumab/FPA008 y MPDL3280A/RO5509554; (xii) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a PD-1 y GITR, como Novilumab/BMS-986156 y Pembrolizumab/MK-4166; (xiii) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a PD-1 y CD40, como MPDL3280A/RO7009789; (xiv) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a PD-1 y B7-H3, como Pembrolizumab/MGA271; (xv) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a CTLA-4 y B7-H3, como Ipilimumab/MGA271 y (xvi) una combinación de moduladores de puntos de control dirigidos a KIR y 4-1BB, como Lirilumab/Urelumab.

Más preferentemente, la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR para su uso según la presente invención comprende al menos (i) un inhibidor de CTLA-4 y (ii) un inhibidor de PD-1, PD-L1 o PD-L2, preferentemente al menos (i) un inhibidor de CTLA-4 y (ii) un inhibidor de PD-1. Ejemplos de dicha combinación preferida incluyen una combinación de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y Opdivo® (Nivolumab; Bristol Myers Squibb), una combinación de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y Keytruda® (Pembrolizumab; Merck), una combinación de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y Durvalumab (MedImmune/AstraZeneca), una combinación de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y MEDI4736 (AstraZeneca; véase el documento WO 2011/066389 A1), una combinación de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y MPDL3280A (Roche/Genentech; véase el documento US 8.217.149 B2), una combinación de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y Pidilizumab (CT-011; CureTech), una combinación de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), una combinación de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y MSB-0010718C (Merck), una combinación de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y MIH1 (Affymetrix), una combinación de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y AMP-224, una combinación de Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y Lambrolizumab, una combinación de Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) y Opdivo® (Nivolumab; Bristol Myers Squibb), una combinación de Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) y Keytruda® (Pembrolizumab; Merck), una combinación de Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) y Durvalumab (MedImmune/AstraZeneca), una combinación de Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) y MEDI4736 (AstraZeneca; véase el documento WO 2011/066389 A1), una combinación de Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) y MPDL3280A (Roche/Genentech; véase el documento US 8.217.149 B2), una combinación de Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) y Pidilizumab (CT-011; CureTech), una combinación de Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) y MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), una combinación de Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) y MSB-0010718C (Merck), una combinación de Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) y MIH1 (Affymetrix), una combinación de Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) y AMP-224 y una combinación de Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) y Lambrolizumab.

En el contexto de la presente invención también se prefiere el uso de más de un modulador de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, inhibidor de punto de control) de la misma vía de punto de control, en particular al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 moduladores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, inhibidores de puntos de control) de la misma vía de puntos de control, preferentemente 2, 3, 4 o 5 moduladores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, inhibidores de puntos de control) de la misma vía de puntos de control, más preferentemente 2, 3 o 4 moduladores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, inhibidores de puntos de control) de la misma vía de puntos de control, incluso más preferentemente 2 o 3 moduladores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo,

inhibidores de puntos de control) de la misma vía de puntos de control y más preferentemente 2 moduladores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, inhibidores de puntos de control) de la misma vía de puntos de control. Las vías de puntos de control a modular preferidas son la vía PD-1, la vía CTLA-4, la vía CD40 o la vía IDO, más preferentemente la vía PD-1, la vía CTLA-4 o la vía CD40 e incluso más preferentemente la vía PD-1 o la vía CTLA-4. Por ejemplo, se puede usar una combinación de MEDI4736 y MEDI0680 para modular, en particular para inhibir, la vía PD-1.

En el contexto de la presente invención los moduladores de puntos de control inmunitarios pueden ser cualquier tipo de molécula o agente, siempre que reduzca, inhiba, interfiera, active, estimule, aumente, refuerce o apoye total o parcialmente la función de una o más moléculas de puntos de control como se ha descrito anteriormente. En particular, el modulador de puntos de control inmunitario se une a una o más moléculas de puntos de control, tales como proteínas de puntos de control, o a sus precursores, por ejemplo, a nivel de ADN o ARN, modulando así (por ejemplo, reduciendo total o parcialmente, inhibiendo, interfiriendo, activando, estimulando, aumentando, reforzando o apoyando) la función de una o más moléculas de puntos de control como se ha descrito anteriormente. Los moduladores de puntos de control inmunitarios preferidos son oligonucleótidos, ARNsi, ARNsh, ribozimas, moléculas de ARN antisentido, inmunotoxinas, inhibidores de moléculas pequeñas y (por ejemplo, bloqueadores de moléculas de puntos de control, antagonistas o agonistas de moléculas de puntos de control) anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios es un oligonucleótido. Un oligonucleótido de este tipo se usa preferentemente para disminuir la expresión de proteínas, en particular para disminuir la expresión de una proteína de punto de control, tal como los receptores o ligandos de puntos de control descritos anteriormente. Los oligonucleótidos son moléculas cortas de ADN o ARN, que normalmente comprenden de 2 a 50 nucleótidos, preferentemente de 3 a 40 nucleótidos, más preferentemente de 4 a 30 nucleótidos e incluso más preferentemente de 5 a 25 nucleótidos, tales como, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. Los oligonucleótidos suelen producirse en el laboratorio mediante síntesis química en fase sólida. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, aunque en el contexto de la presente invención el oligonucleótido es preferentemente monocatenario. Más preferentemente, el oligonucleótido modulador de puntos de control es un oligonucleótido antisentido. Los oligonucleótidos antisentido son cadenas simples de ADN o ARN que son complementarias a una secuencia elegida, en particular a una secuencia elegida de la secuencia de ADN o ARN (o un fragmento de la misma) de una proteína de puntos de control. El ARN antisentido se utiliza normalmente para prevenir la traducción de proteínas de las cadenas de ARN mensajero, por ejemplo, de ARNm para una proteína de puntos de control, uniéndose al ARNm. El ADN antisentido se utiliza normalmente para dirigirse a un ARN complementario específico (codificante o no codificante). Si se produce la unión, dicho híbrido de ADN/ARN puede ser degradado por la enzima RNasa H. Además, los oligonucleótidos antisentido morfolino se pueden utilizar para la desactivación de genes en vertebrados. Por ejemplo, Kryczek *et al.*, 2006 (Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, *et al.* B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. J Exp Med. 2006; 203:871-81) diseñaron un morfolino específico de B7-H4 que bloqueaba específicamente la expresión de B7-H4 en macrófagos, lo que daba como resultado un aumento de la proliferación de células T y una reducción de los volúmenes tumorales en ratones con células T específicas del antígeno asociado a tumores (TAA).

Preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios es un ARNsi. El ARN de interferencia pequeño (ARNsi), a veces conocido como ARN de interferencia corto o ARN silenciador, es una clase de moléculas de ARN de doble cadena, que normalmente tiene entre 20 y 25 pares de bases de longitud. En la vía de interferencia de ARN (ARNi), el ARNsi interfiere con la expresión de genes específicos, como los genes que codifican proteínas de punto de control, con secuencias de nucleótidos complementarias. Los ARNsi funcionan provocando la degradación postranscripcional del ARNm para que no pueda traducirse. La transfección de ARNsi exógeno puede utilizarse para el bloqueo de genes; sin embargo, el efecto puede ser solo transitorio, especialmente en células que se dividen rápidamente. Esto puede solucionarse, por ejemplo, mediante modificación del ARN o utilizando un vector de expresión para el ARNsi. La secuencia de ARNsi también puede modificarse para introducir un bucle corto entre las dos cadenas. La transcripción resultante es un ARN en horquilla corto (ARNsh, también "ARN de horquilla pequeña"), que puede ser procesado en un ARNsi funcional mediante Dícer en la forma habitual. El ARNsh, es un mediador ventajoso de ARNi porque tiene una tasa de degradación y recambio relativamente baja. Por consiguiente, el modulador de puntos de control inmunitarios es preferentemente un ARNsh. El ARNsh normalmente requiere el uso de un vector de expresión, por ejemplo, un plásmido o un vector viral o bacteriano.

Preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios es una inmunotoxina. Las inmunotoxinas son proteínas quiméricas que contienen una fracción diana (como un anticuerpo), que normalmente se dirige a un antígeno en una determinada célula, como una célula cancerosa, ligada a una toxina. En el contexto de la presente invención, se prefiere una inmunotoxina que contenga una fracción diana dirigida a una molécula de punto de control. Cuando la inmunotoxina se une a una célula portadora del antígeno, por ejemplo, la molécula de puntos de control se absorbe mediante endocitosis y la toxina puede matar la célula. Las inmunotoxinas comprenden preferentemente un anticuerpo (modificado) o un fragmento de anticuerpo, unido a una (fragmento de una) toxina. Para la unión, los métodos son bien conocidos en la técnica y pueden utilizarse los mismos métodos que se describen en el presente documento para la unión de los componentes del complejo. La porción diana de la inmunotoxina normalmente comprende una porción Fab de un anticuerpo que se dirige a un tipo de célula específico. La toxina suele ser citotóxica, como una proteína

derivada de una proteína bacteriana o vegetal, de la que se ha eliminado el dominio de unión natural, de modo que la fracción diana de la inmunotoxina dirige la toxina al antígeno de la célula diana. Sin embargo, las inmunotoxinas también pueden comprender una fracción diana distinta de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tal como un factor de crecimiento. Por ejemplo, las proteínas de fusión recombinantes que contienen una toxina y un factor de crecimiento también se denominan inmunotoxinas recombinantes.

Preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios es un fármaco de molécula pequeña (también denominado "inhibidor de molécula pequeña"). Un fármaco de molécula pequeña es un compuesto orgánico de bajo peso molecular (hasta 900 dalton) que normalmente interactúa con (la regulación de) un proceso biológico. En el contexto de la presente invención, un fármaco de molécula pequeña que es un modulador de puntos de control inmunitarios, es un compuesto orgánico que tiene un peso molecular no superior a 900 dalton, que reduce, inhibe, interfiere o modula negativamente, total o parcialmente, la función de una o más moléculas de puntos de control como se ha descrito anteriormente. El límite superior de peso molecular de 900 dalton permite la posibilidad de difusión rápida a través de las membranas celulares y la biodisponibilidad oral. Más preferentemente, el peso molecular del fármaco de molécula pequeña que es un modulador de puntos de control inmunitarios no es superior a 500 dalton. Por ejemplo, diversos antagonistas de A2AR conocidos en la técnica son compuestos orgánicos que tienen un peso molecular inferior a 500 dalton.

Más preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en particular anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a receptores de puntos de control inmunitarios o anticuerpos que se unen a ligandos de receptores de puntos de control inmunitarios. Preferentemente, dichos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son agonistas o antagonistas de receptores de puntos de control inmunitarios o de ligandos de receptores de puntos de control inmunitarios. Ejemplos de moduladores de puntos de control de tipo anticuerpo incluyen moduladores de puntos de control inmunitarios, que en la actualidad están aprobados como se ha descrito anteriormente, a saber, Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb), Opdivo® (Nivolumab; Bristol Myers Squibb) y Keytruda® (Pembrolizumab; Merck) y otros anticuerpos contra receptores de puntos de control o anticuerpos contra ligandos de puntos de control como se ha descrito anteriormente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca diversas formas de anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos enteros, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos genéticamente modificados (anticuerpos variantes o mutantes) siempre que se mantengan las propiedades características según la invención, lo que significa que el anticuerpo (o el fragmento de unión a antígeno) modula (por ejemplo, reduce total o parcialmente, inhibe, interfiere, activa, estimula, aumenta, refuerza o apoya) la función de una o más moléculas de puntos de control como se ha descrito anteriormente. En particular, el anticuerpo (o el fragmento de unión a antígeno) media esta función uniéndose a una molécula de punto de control. Por consiguiente, el anticuerpo (o el fragmento de unión a antígeno) es preferentemente un anticuerpo "bloqueante" (o el fragmento de unión a antígeno), en particular un anticuerpo "antagonista" (o el fragmento de unión al antígeno), o un anticuerpo "agonista" (o el fragmento de unión al antígeno). En particular, el término "anticuerpo" incluye inmunoglobulinas tanto glicosiladas como no glicosiladas de cualquier isotipo o subclase (preferentemente IgG) o a una región de unión a antígeno de las mismas que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica, a menos que se especifique lo contrario. Los ejemplos preferidos de anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos, miméticos de anticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpos, conjugados de anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, derivados de anticuerpos, análogos de anticuerpos y fragmentos de los mismos, respectivamente. A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" incluye, además de anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, derivados, variantes y fragmentos de los mismos. En algunos casos, un "anticuerpo" puede incluir menos cadenas. Se prefieren especialmente los anticuerpos monoclonales humanos o humanizados y/o los anticuerpos recombinantes, especialmente los anticuerpos monoclonales humanos recombinantes. Son particularmente preferidos los anticuerpos de tipo IgG humano.

El término "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M. A., y van de Winkel, J. G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., *et al.*, Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., *et al.*, Year Immunol. 7 (1993) 3340). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom, H. R., y Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J. D., *et al.*, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); y Boerner, P., *et al.*, J. Immunol. 147 (1991) 86-95). El término "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el

presente documento, también comprende aquellos anticuerpos que se modifican, por ejemplo, en la región variable para generar las propiedades según la invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo recombinante" pretende incluir todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped tal como, por ejemplo, una célula CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para, por ejemplo, genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Por lo tanto, los anticuerpos recombinantes son anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (i) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (ii) anticuerpos aislados de una célula huésped transfectada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (iii) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatorios recombinantes, y (iv) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique empalme de secuencias de genes de inmunoglobulinas con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos pueden tener regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal de dos especies distintas de animales. También se prefieren los anticuerpos sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de inmunoglobulina humana, mutagénesis somática *in vivo*), mientras que las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de dichos anticuerpos pueden ser secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal de una especie particular (por ejemplo, humana), pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos de esa especie *in vivo*. Los anticuerpos recombinantes pueden tener regiones variables y constantes en una forma reordenada y/o, por ejemplo, ciertas mutaciones que no ocurren en la naturaleza.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "fragmento de unión a antígeno", "fragmento" y "fragmento de anticuerpo" se usan indistintamente para referirse a cualquier fragmento de un anticuerpo de la invención que retiene la actividad de unión específica del anticuerpo según la invención. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen un anticuerpo de cadena sencilla, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv. Los fragmentos de los anticuerpos de la invención pueden obtenerse a partir de los anticuerpos por métodos que incluyen digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o por escisión de enlaces disulfuro mediante reducción química. De manera alternativa, pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos por clonación y expresión de parte de las secuencias de las cadenas pesada y/o ligera. Los "fragmentos" incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La invención también abarca fragmentos Fv monocatenarios (scFv) derivados de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención incluye un scFv que comprende las CDR de un anticuerpo de la invención. También se incluyen monómeros y dímeros de cadena pesada o ligera, anticuerpos de cadena pesada de dominio único, anticuerpos de cadena ligera de dominio único, así como anticuerpos de cadena única, por ejemplo, Fv de cadena única en los que los dominios variables de cadena pesada y ligera están unidos por un enlazador peptídico. Los fragmentos de anticuerpos de la invención pueden impartir interacciones monovalentes o multivalentes y estar contenidos en una variedad de estructuras como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las moléculas scFv pueden sintetizarse para crear un "triacuerpo" trivalente o un "tetracuerpo" tetravalente. Las moléculas scFv pueden incluir un dominio de la región Fc dando como resultado minicuerpos bivalentes.

Además, las secuencias de la invención pueden ser un componente de moléculas multiespecíficas en las que las secuencias de la invención se dirigen a la molécula de puntos de control y otras regiones de la molécula se unen a otras dianas. Las moléculas a modo de ejemplo incluyen Fab₂ biespecífico, Fab₃ trispecífico, scFv biespecífico y diacuerpos (Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology 9: 1126-1136). Aunque la memoria descriptiva, incluidas las reivindicaciones, puede, en algunos lugares, referirse explícitamente a fragmento(s) de unión a antígeno, fragmento(s) de anticuerpo, variante(s) y/o derivado(s) de anticuerpos, se entiende que el término "anticuerpo" o "anticuerpo de la invención" incluye todas las categorías de anticuerpos, a saber, fragmento(s) de unión a antígeno, fragmento(s) de anticuerpo, variante(s) y derivado(s) de anticuerpos. Además, el término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, incluye tanto anticuerpos como fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Preferentemente, los moduladores de puntos de control inmunitarios en la combinación utilizada según la presente invención son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden bloquear parcial o totalmente la vía PD-1 (por ejemplo, pueden ser antagonistas parciales o totales de la vía PD-1), en particular PD-1, PD-L1 o PD-L2, más preferentemente, el anticuerpo puede bloquear parcial o totalmente PD-1 (por ejemplo, pueden ser antagonistas parciales o totales de PD-1). Dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno incluyen anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-1 humanos, anticuerpos anti-PD-1 de ratón, anticuerpos anti-PD-1 de mamífero, anticuerpos anti-PD-1 humanizados, anticuerpos anti-PD-1 monoclonales, anticuerpos anti-PD-1 policlonales, anticuerpos anti-PD-1 quiméricos, anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-PD-L2, adnectinas anti-PD-1, anticuerpos de dominio anti-PD-1, fragmentos anti-PD-1 de cadena sencilla, fragmentos anti-PD-1 de cadena pesada y fragmentos anti-PD-1 de cadena ligera. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-1 puede ser un fragmento de unión a antígeno. Preferentemente, el anticuerpo anti-PD-1 es capaz de unirse a PD-1 humano y bloquear parcial o totalmente la actividad de PD-1 (por ejemplo, pueden ser antagonistas parciales o totales de PD-1), desencadenando de este modo en particular la función de las células inmunitarias que expresan PD-1.

Preferentemente, los moduladores de puntos de control inmunitarios en la combinación utilizada según la presente

invención son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden bloquear parcial o totalmente la vía CTLA-4 (por ejemplo, pueden ser antagonistas parciales o totales de la vía CTLA-4). Dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno incluyen anticuerpos anti-CTLA4, anticuerpos anti-CTLA4 humanos, anticuerpos anti-CTLA4 de ratón, anticuerpos anti-CTLA4 de mamífero, anticuerpos anti-CTLA4 humanizados, anticuerpos anti-CTLA4 monoclonales, anticuerpos anti-CTLA4 policlonales, anticuerpos quiméricos anti-CTLA4, MDX-010 (ipilimumab), tremelimumab, anticuerpos anti-CD28, adnectinas anti-CTLA4, anticuerpos de dominio anti-CTLA4, fragmentos anti-CTLA4 de cadena sencilla, fragmentos anti-CTLA4 de cadena pesada y fragmentos anti-CTLA4 de cadena ligera. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CTLA4 puede ser un fragmento de unión a antígeno. Preferentemente, el anticuerpo anti-CTLA4 es capaz de unirse a CTLA4 humano y bloquear parcial o totalmente la actividad de CTLA4 (por ejemplo, pueden ser antagonistas parciales o totales de CTLA-4), desencadenando de este modo en particular la función de las células inmunitarias que expresan CTLA4.

Complejo que comprende un péptido de penetración celular y al menos un antígeno o epítipo antigénico

Además del modulador de puntos de control inmunitarios descrito anteriormente, la combinación para uso según la presente invención comprende un complejo que comprende:

- a) un péptido de penetración celular;
- b) al menos un antígeno o epítipo antigénico; y
- c) al menos un agonista peptídico 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 un agonista peptídico de TLR, están unidos de forma covalente. En lo sucesivo, también se hace referencia a dicho complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR, que están unidos de forma covalente, utilizando el término "el complejo" o "el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención". están unidos de forma covalente; y

Dicho complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención proporciona simultáneamente (i) la estimulación de la inmunidad mediada por células T citotóxicas multiepitópicas, (ii) la inducción de células T_H y (iii) la promoción de memoria inmunológica. Así, un complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención proporciona una potente vacuna, en particular con una actividad antitumoral mejorada.

El complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención es un polipéptido o una proteína, en particular un polipéptido recombinante o una proteína recombinante, preferentemente una proteína de fusión recombinante o un polipéptido de fusión recombinante. El término "recombinante" tal como se utiliza en el presente documento (es decir, a lo largo de la memoria descriptiva) significa que (aquí: el polipéptido o la proteína) no se produce naturalmente. Por consiguiente, el complejo comprendido por la combinación para uso según 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 estos 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 retroinversas". El término "secuencia (peptídica) retroinversa" 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 postraduccionales, o mediante procesos químicos, los cuales son bien conocidos por el experto en la materia. 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 postraduccionales naturales o sintéticos, bien conocidos por el experto en la materia. 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) 2ª 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 y Rattan *et al.*, (1992) Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci, 663: 4862). Por consiguiente, los términos "péptido", "polipéptido", "proteína" preferentemente incluyen, por ejemplo, lipopéptidos, lipoproteínas, glicopéptidos, y glicoproteínas.

Sin embargo, en una realización particularmente preferida, el complejo según se describe el presente documento 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, unidos entre sí por enlaces peptídicos normales.

Si el complejo comprendido por la combinación para uso según 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 preferentemente al menos 120, al menos 130, con especial preferencia al menos 140 o más preferentemente 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 las 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) comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede verificarse mediante métodos estándar conocidos por el experto en la materia, 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 cargados 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 transactivación del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-TAT) para penetrar en las células (Frankel, A.D. y C.O. Pabo, Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. Cell, 1988. 55(6): págs. 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 USA, 1991. 88(5): págs. 1864-8). En 1994, se caracterizó el primer péptido 16-mer CPP llamado penetratina, que tiene la secuencia de aminoácidos RQIKIYFQNRMRKWK (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): págs. 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): págs. 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): págs. 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): págs. 20224-33), o de venomas, por ejemplo melitina (Dempsey, C.E., The actions of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1990. 1031(2): págs. 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): págs. 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): págs. 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): págs. 21349-60) o buforina (Kobayashi, S., *et al.*, Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. *Biochemistry*, 2004. 43(49): págs. 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): págs. 5836-40) o el transportano (Pooga, M., *et al.*, Cell penetration by transportan. *FASEB J*, 1998. 12(1): págs. 67-77). Cualquiera de los CPP arriba descritos puede emplearse como péptido de penetración celular, es decir como componente a), en el complejo tal como se describe en el presente documento. En particular, el componente a), es decir el CPP, en el complejo comprendido por la combinación para uso según 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede comprender penetratina, con la secuencia de aminoácidos RQIKIYFQNRMRKWK (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 de penetración celular, es decir, como componente a), en el complejo comprendido por la combinación para 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 pueden utilizarse como péptidos de penetración celular, es decir, como componente a), en el complejo comprendido por la combinación para 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 bibliotecas 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,

- i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente 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 según la SEQ ID NO: 3, donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la 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,

- i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y
- 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 según la SEQ ID NO: 3, donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de secuencia de dicho fragmento.

Tales CPP preferentes se describen en el documento WO 2014/041505.

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:

```
MMDPNSTSEDVKFTPDPYQVPFVQAFDQATRVYQDLGGPSQAPLPCVLWPVLPEPLPQGQL
TAYHVSTAPTGSWFSAPQPAPENAYQAYAAPQLFPVSDITQNQQTNQAGGEAPQPGDNST
VQTAAAVVFACPGANQGQQLADIGVPQPAPVAAPARRTRKPKQPESLEECDSELEIKRYKNR
VASRKCRAKFKQLLQHYREVAATAKSSENDRLRLLLKQMCPSLDVDSIIPRTPDVLHEDLLNF
(SEQ ID NO: 3 - Secuencia aminoacídica de ZEBRA (secuencia natural del virus Epstein - Barr (EBV))
(YP_401673))
```

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. Por consiguiente, tal CPP puede suministrar péptidos multiepitópicos a las 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención a las células presentadoras de antígeno (APC) y conducir a una presentación restringida de MHC de clase I y II multiepitópica.

En el contexto de la presente invención, el término "MHC de clase I" designa una de las dos clases primarias 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. En el contexto de la presente invención, el término "MHC de clase II" designa la otra clase primaria de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Las moléculas MHC de 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 las cuales son células presentadoras de antígenos (APC) dedicadas.

Preferentemente, 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 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, incluso más preferentemente 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 anular 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 preferentemente como una secuencia truncada del mismo, es decir, una secuencia de aminoácidos que está N-terminal, C-terminal y/o intrasecuencialmente truncada en comparación con la secuencia de aminoácidos de la secuencia nativa. Además, dicho "fragmento" del dominio mínimo de ZEBRA preferentemente tienen una longitud de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, con especial preferencia de 15 a 45 aminoácidos en total.

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. Preferentemente, una secuencia de referencia es cualquiera de las secuencias citadas en la "Tabla de secuencias y números de SEQ ID" (listado de secuencias), es decir de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 47. Preferentemente, una variante de secuencia comparte, en particular a lo largo de toda la secuencia, al menos un 70 %, al menos un 75 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, incluso más preferentemente 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 en al menos un 70 %, al menos un 75 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, incluso más preferentemente 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.

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 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, preferentemente dentro de las definiciones anteriores de variantes o fragmentos. Lo mismo es, por supuesto, aplicable de manera similar a las secuencias de ácido nucleico.

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), lo que es más adecuado para secuencias de longitud desigual.

Los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. El porcentaje en el que dos secuencias son idénticas puede determinarse, por ejemplo, empleando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente 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 (véase también Altschul *et al.*, 1 990, J. Mol. Biol. 21 5, 403-410 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.*, 1 984, 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 (1 981), J. Mol. Biol. 147, 195-197) y encuentra la mejor región única de similitud entre dos secuencias.

Más preferentemente, los fragmentos del péptido de penetración celular 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 epítomos 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 epítomos 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 materia, 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 epítomos.

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, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente 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 según la SEQ ID NO: 3, donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la 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 |
| Residuos originales | Ejemplos de sustituciones |
| Val (V) | Ile, Met, Leu, Phe, Ala |

10 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, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente 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 según 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

20 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 la 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):

25 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}SX_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}$

donde 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han sustituido, eliminado y/o añadido sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, donde

- 30 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;
 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;
35 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;
 X_9 es S o T;
 X_{10} es R, K, o H, preferentemente X_{10} es R o K;

X₁₁ es K, R, o H, preferentemente X₁₁ es R o K;
 X₁₃ es R, K o H, preferentemente X₁₃ es R o K;
 X₁₄ es A, V, L, I o G, preferentemente X₁₄ es A o G;
 X₁₅ es K, R o H, preferentemente X₁₅ es K o R;
 X₁₆ es F, L, V, I, Y, W o M, preferentemente X₁₆ es F, Y o W; y
 X₁₇ es K, R o H, preferentemente X₁₇ es K o R.

Preferentemente, dicho péptido, polipéptido o proteína está compuesto (enteramente) por L-aminoácidos o (enteramente) por D-aminoácidos, formando así "secuencias peptídicas retroinversas". El término "secuencias retroinversas (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)).

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₁ es K.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₂ es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₃ es Y.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₄ es K.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₅ es N.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₆ es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₇ es V.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₈ es A.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₉ es S.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₁₀ es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₁₁ es K.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₁₃ es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₁₄ es A.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₁₅ es K.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₁₆ es F.

En una realización particular, el péptido de penetración celular es como se define genéricamente anteriormente en la fórmula (I), donde X₁₇ es K.

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 es particularmente preferente que el péptido de penetración celular preferido, que

- i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente 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 según la SEQ ID NO: 3, donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de secuencia de dicho fragmento
- comprenda o consista en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en las secuencias de aminoácidos según las SEQ ID NO: 4-13, o variantes de secuencia de las mismas, sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferentemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de penetración celular del péptido.
- CPP1 (Z11):
KRYKNRVASRKCRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLKQMC
(SEQ ID NO: 4)
- CPP2 (Z12):
KRYKNRVASRKCRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLK
(SEQ ID NO: 5)
- CPP3 (Z13):
KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLK
(SEQ ID NO: 6)
- CPP4 (Z14):
KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAK
(SEQ ID NO: 7)
- CPP5 (Z15):
KRYKNRVASRKSRAKFK
(SEQ ID NO: 8)
- CPP6 (Z16):
QHYREVAAAKSSSEND
(SEQ ID NO: 9)
- CPP7 (Z17):
QLLQHYREVAAAK
(SEQ ID NO: 10)
- CPP8 (Z18):
REVAAAKSS END RLRLLLK
(SEQ ID NO: 11)
- CPP9 (Z19):
KRYKNRVA
(SEQ ID NO: 12)
- CPP10 (Z20):
VASRKSRAKFK
(SEQ ID NO: 13)
- Así, es particularmente preferido un péptido de penetración celular que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13), la SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14), la SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15), o la SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18), o variantes de secuencia de las mismas, sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferentemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido. Además, es especialmente preferido un péptido de penetración celular que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) o la SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14) o variantes de secuencia de las mismas, sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferentemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido. Además, es particularmente preferido un péptido de penetración celular que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) o variantes de secuencia de la misma, sin anular la

capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferentemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido.

5 En una realización preferida, el péptido de penetración celular según la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13).

En otra realización preferida, el péptido de penetración celular según la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14).

10 En otra realización preferida, el péptido de penetración celular según la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15).

En otra realización preferida, el péptido de penetración celular según la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18).

15 El experto en la materia entenderá que la secuencia de aminoácidos primaria del péptido de penetración celular puede ser modificada postraduccionalmente, tal como por glucosilación o fosforilación, sin apartarse de la invención.

20 En una realización adicional, el péptido de penetración celular 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, NucleicAcids Res. 31(1): 397- 399)

25 (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 está unido a un antígeno o epítipo antigénico y facilita la internalización celular de dicho antígeno o epítipo antigénico.

30 El complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede comprender un único péptido de penetración celular o más de un péptido de penetración celular. Preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende no más de cinco péptidos de penetración celular, en especial el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende no más de cuatro péptidos de penetración celular, incluso más preferentemente el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende no más de tres péptidos de penetración celular, con particular preferencia el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende no más de dos péptidos de penetración celular y con total preferencia el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende un único péptido de penetración celular.

40 Componente b) - antígeno/epítipo antigénico

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

45 Tal como se utiliza en el presente documento, 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 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 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.

Preferentemente, en el complejo comprendido por la combinación para 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 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, ARNs, ARNs, oligonucleótidos antisentido, ADN señuelo, plásmido) o un fármaco de moléculas pequeñas (por ejemplo ciclosporina A, paclitaxel, 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención.

- 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 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 comprendido por la combinación para 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.
- 10 Preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente 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.
- 15 Más preferentemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico comprende o consiste en (i) al menos un epítipo de patógeno y/o (ii) al menos un epítipo de cáncer/tumor, en particular al menos un epítipo de tumor. Más preferentemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico comprende o consiste en al menos un epítipo de cáncer/tumor, en particular al menos un epítipo de tumor.
- 20 Es particularmente preferente que el complejo comprendido por la combinación para uso según 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 epítipo(s) de cáncer/tumor; en particular, son antígeno(s) asociado(s) a tumor, antígeno(s) específico(s) de tumor y/o epítipo(s) de tumor.
- 25 Tal como se utiliza en el presente documento, "epítipo de cáncer" significa un epítipo de un antígeno asociado a cáncer o de un antígeno específico de cáncer. Por consiguiente, "epítipo de tumor" 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. Por ejemplo, los epítopos de cáncer/tumor incluyen epítopos de glioma. 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. Por consiguiente, estos antígenos normalmente están presentes desde el nacimiento (o incluso antes). Así, existe la posibilidad de que el sistema inmunitario desarrolle autotolerancia 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 para el sistema inmunitario, el riesgo de autotolerancia 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 cáncer 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención.
- 50 Preferentemente, un complejo comprendido por la combinación para 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 preferentemente no epítopos específicos de cáncer/tumor). También se prefiere que un complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprenda uno o más epítopos específicos de cáncer/tumor y/o uno o más antígenos específicos de cáncer/tumor (pero preferentemente no epítopos específicos de cáncer/tumor). Un complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención también puede comprender preferentemente, (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 y (ii) uno o más epítopos específicos de cáncer/tumor y/o uno o más antígenos específicos de cáncer/tumor.
- 60 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 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; desarrollada 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, IL13 α 2,

Epha2 (receptor de efrina tipo A2), fragmentos inmunogénicos de los mismos y fusiones de tales antígenos y/o fragmentos. Además, ejemplos de epítomos de cáncer/tumor incluyen epítomos de neoantígenos, tales como, por ejemplo, un neoantígeno de la línea celular tumoral MC-38 como se describe por Yadav *et al.* Nature. 2014 Nov 27;515(7528):572-6. 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención incluyen los siguientes antígenos: Próstata: antígeno prostático específico (PSA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), PAP, PSCA (PNAS 95(4) 1735-1740 1998), antígeno prostático de mucina (PMA) (Beckett y Wright, 1995, Int. J. Cancer 62: 703-710), Prostasa, Her-2neu, SPAS-1; Melanoma: TRP-2, tirosinasa, Melan A/Mart-1, gp100, BAGE, GAGE, gangliósido GM2, Mama: Her2-neu, 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); Testículos: MAGE-1, HOM-Mel-40/SSX2, NY-ESO-1; Colorrectal: EGFR, CEA; Pulmón: MAGE D, EGFR; Ovario Her-2neu; Vejiga: carcinoma de células transicionales (TCC) (Jones *et al.*, 1997, Anticancer Res. 17: 685-687), Varios cánceres: Epha2, Epha4, PCDGF, HAAH, Mesothelin; EPCAM; NY-ESO-1, glicoproteína MUC1 y NIUC10 mucinas p5 (especialmente versiones mutadas), EGFR; Tumores varios: antígeno sérico asociado al cáncer (CASA) y antígeno de cáncer 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: 14611464), antígeno nuclear celular (PCNA) de cavernomas cerebrales (Notelet *et al.*, 1997 Surg. Neurol. 47: 364370), 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: 296300), 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 *et al.*, 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-R1701, 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, Proteinasa 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.

Preferentemente, el antígeno de cáncer/tumor o el epítomo de cáncer/tumor es un antígeno de cáncer/tumor recombinante o un epítomo de cáncer/tumor recombinante. Tal antígeno recombinante de cáncer/tumor o epítomo 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/epítomo. La introducción de mutaciones no altera tanto el antígeno de cáncer/tumor o el epítomo de cáncer/tumor como para que no pueda aplicarse universalmente a un sujeto mamífero, y preferentemente 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 epítomo de cáncer/tumor 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 epítomo nativo de cáncer/tumor", preferentemente 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 preferentemente al menos un 95 % y hasta un 98 % de identidad de secuencia. En algunos casos, el antígeno recombinante de cáncer/tumor o el epítomo recombinante de cáncer/tumor tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con su correspondiente antígeno nativo de cáncer/tumor o epítomo nativo de cáncer/tumor. 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 variar entre

especies de mamíferos o dentro de subtipos de una especie o entre cepas o serotipos virales. Algunos antígenos de cáncer/tumor no difieren 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 o el epítipo de cáncer/tumor recombinante final tenga un porcentaje de identidad con la secuencia de aminoácidos del antígeno de cáncer nativo como se ha expuesto anteriormente. Sin embargo, preferentemente, la secuencia de aminoácidos de un epítipo de un antígeno de cáncer/tumor como se describe en el presente documento no está mutada y, por tanto, es idéntica a la secuencia del epítipo de referencia.

Tal como se utiliza en el presente documento, "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 de cuello uterino (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 Occidental, fiebre amarilla.

Preferentemente, 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 de clase I y/o MHC de clase II. La frase "presentación del epítipo en el contexto de MHC de 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención 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 de clase I y MHC de clase II, y, por tanto, es útil en la vacunación y la inmunoterapia.

Preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para 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 utilizan en el presente documento 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención consiste preferentemente 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 utilizan en el presente documento 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención consiste preferentemente en aproximadamente 8-11 aminoácidos. También puede consistir en, por ejemplo, aproximadamente 8-15 aminoácidos o aproximadamente 6-100 aminoácidos.

Preferentemente, 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 a o 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.

5 También se prefiere que el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprenda al menos dos antígenos o epítipos 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.

10 Por tanto, un complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención que comprende al menos dos antígenos o epítipos 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

15 comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede comprender preferentemente un epítipo Ealpha- CD4+ y un epítipo gp100-CD8+.

Preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende al menos dos antígenos o epítipos antigénicos, donde los al menos dos antígenos o epítipos antigénicos comprenden o consisten en al menos dos, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más, epítipos CD4+ y/o al menos dos, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más, epítipos CD8+. Así, los al menos dos antígenos o epítipos antigénicos son preferentemente antígenos o epítipos antigénicos diferentes, en especial los al menos dos antígenos o epítipos antigénicos son diferentes entre sí, pero están relacionados con el mismo tipo de tumor. Una vacuna multiantigénica (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 comprendido por

20 la combinación para uso según la presente invención comprende particularmente al menos cuatro antígenos o epítipos antigénicos, en particular al menos dos epítipos CD8+ y al menos dos epítipos CD4+. Dicho complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención induce CTL CD8 multiepitópicas 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. Dicho complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención induce respuestas inmunitarias policlonales, multiepitópicas y de células T CD8+ y CD4+ polifuncionales y, por lo tanto, una eficaz actividad antitumoral.

35 Preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende al menos dos antígenos o epítipos antigénicos, más preferentemente el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende al menos tres antígenos o epítipos antigénicos, incluso más preferentemente el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende al menos cuatro antígenos o epítipos antigénicos, con particular preferencia el complejo comprendido por la combinación

40 para uso según la presente invención comprende al menos cinco antígenos o epítipos antigénicos y con total preferencia el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende al menos seis antígenos o epítipos antigénicos. Los antígenos o epítipos antigénicos comprendidos en el complejo pueden ser iguales o diferentes, preferentemente los antígenos o epítipos antigénicos comprendidos en el complejo son diferentes entre sí. Preferentemente, el complejo tal como se describe en el presente documento comprende al menos un epítipo

45 CD4+ y al menos un epítipo CD8+.

Preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende más de un epítipo CD4+, por ejemplo, dos o más epítipos CD4+ del mismo antígeno o de antígenos diferentes, y preferentemente ningún epítipo CD8+. También es preferente que el complejo comprendido por la combinación para

50 uso según la presente invención comprenda más de un epítipo CD8+, por ejemplo, dos o más epítipos CD8+ del mismo antígeno o de antígenos diferentes, y preferentemente ningún epítipo CD4+. Sin embargo, con total preferencia, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende (i) al menos un epítipo CD4+, por ejemplo, dos o más epítipos CD4+ del mismo antígeno o de antígenos diferentes y (ii) al menos un epítipo CD8+, por ejemplo, dos o más epítipos CD8+ del mismo antígeno o de antígenos diferentes.

55 Por ejemplo, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede comprender preferentemente un epítipo gp100-CD8+, un epítipo Ealpha-CD4+ y un epítipo adicional CD4+ y un epítipo adicional CD8+. Incluso más preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para 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 comprendido por la combinación para

60 uso según la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 14 o variantes de secuencia de la misma como se definió anteriormente:

ESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPRAKF ASFEAQGALA
 NIAVDKANLD VEQLESHNF EKLTEWTGS

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

Por ejemplo, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención preferentemente puede comprender un epítipo gp70- CD8⁺ y/o un epítipo gp70-CD4⁺. Incluso más preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 36 o variantes de secuencia de la misma como se definió anteriormente:

VTYHSPSYAYHQFERRAILNRLVQFIKDRI

SEQ ID NO: 36 (carga Mad8 que comprende un gp70-CD8⁺ y un epítipo gp70-CD4⁺).

Por ejemplo, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede comprender preferentemente al menos un epítipo de survivina, tal como un epítipo de survivina CD8⁺ y/o un epítipo de survivina CD4⁺. En especial, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede comprender un polipéptido o una proteína que comprende un epítipo survivina CD8⁺ y/o un epítipo de survivina CD4⁺. Más preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según 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 epítopos survivina CD8⁺ diferentes. Por ejemplo, dicho polipéptido o proteína comprendido en el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 37 o variantes de secuencia de la misma como se definió anteriormente:

NYRIATFKNWPFLDCAMEELTVSEFLKLDRQR

SEQ ID NO: 37 (carga Mad11 que comprende el epítipo 1 de survivina CD8⁺ y el epítipo 2 de survivina CD8⁺).

Por ejemplo, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede comprender preferentemente un epítipo de un neoantígeno. Incluso más preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 42 o variantes de secuencia de la misma como se definió anteriormente:

HLELASMTNMELMSSIV

SEQ ID NO: 38 (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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede comprender preferentemente más de uno, por ejemplo, dos o tres epítopos de neoantígenos. Incluso más preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede comprender un polipéptido o proteína que comprende más de uno, por ejemplo, dos o tres, epítopos 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 39 o variantes de secuencia de la misma como se definió anteriormente:

LFRAAQLAN DVVLQIMEH LELASMTNMELMSSIVVISASIIVFN LLELEG

SEQ ID NO: 39 (carga Mad12 que comprende el epítipo de un neoantígeno como se describe 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención es un péptido, polipéptido o una proteína. Ejemplos de antígenos o epítopos antigénicos de naturaleza peptídica, polipeptídica o proteica útiles en la invención incluyen antígenos de cáncer/tumor o epítopos antigénicos de los mismos, antígenos de alergia o epítopos antigénicos de los mismos, autoantígenos autoinmunes o epítopos antigénicos de los mismos, antígenos patógenos o epítopos antigénicos de los mismos y antígenos virales o epítopos antigénicos de los mismos, preferentemente 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 pseudorrabia, 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 11, virus de polio, virus adenoasociado 2, rotavirus, orbivirus, varicela, incluida varicela zoster, o antígenos o epítomos antigénicos de leishmania, tipanomas, amebas, bacterias, o pueden seleccionarse de epítomos o de variantes de los antígenos o epítomos antigénicos anteriores. Preferentemente, 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 Immun. 13:15). Sin embargo, un único complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención también puede comprender solo un subconjunto, es decir uno o más de dichos epítomos de glioma. En tal caso, los complejos, preferentemente diferentes, comprendidos por la combinación para uso según 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 comprende todos los epítomos de dicho glioma, pero distribuidos en los diferentes complejos.
- Además, un complejo comprendido por la combinación 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 en el presente documento.
- En particular, el complejo comprendido por la combinación para su uso según 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.
- Preferentemente, dichos epítomos se presentarán en la superficie celular en un contexto de MHC de clase I y/o MHC de clase II.
- Preferentemente, dichos epítomos lipídicos se presentarán en la superficie celular en un contexto CD1 (clúster de diferenciación 1).
- El complejo comprendido por la combinación para 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).
- El complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende al menos un antígeno o epítomo antigénico, preferentemente el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende más de un antígeno o epítomo antigénico, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más antígenos o epítomos antigénicos, más preferentemente el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende (al menos) dos o tres antígenos o epítomos antigénicos, incluso más preferentemente el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende (al menos) cuatro o cinco antígenos o epítomos antigénicos. Si el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende más de un antígeno o epítomo antigénico, se entiende que dicho antígeno o epítomo antigénico también

está en particular unido de forma covalente en el complejo comprendido por la combinación para 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 agonista peptídico de TLR.

- 5 Los diversos antígenos o epítipos antigénicos comprendidos en el complejo pueden ser iguales o diferentes. Preferentemente, los diversos antígenos o epítipos antigénicos comprendidos en el complejo son diferentes entre sí, proporcionando así un complejo multiantigénico y/o multiepítipo.

10 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 de forma consecutiva en el complejo comprendido por la combinación para uso según 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 agonista peptídico 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
15 todos los antígenos y/o epítipos antigénicos. Sin embargo, los antígenos y/o epítipos antigénicos se disponen de forma consecutiva 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 agonista peptídico de TLR.

20 Alternativamente, sin embargo, los diversos antígenos y/o epítipos antigénicos también se pueden disponer de cualquier otra manera en el complejo comprendido por la combinación para uso según 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
25 componente c).

Se entiende que varios antígenos o epítipos antigénicos diferentes relacionados con el mismo tipo de enfermedad, en particular con el mismo tipo de tumor, pueden estar ventajosamente comprendidos en un único complejo. Alternativamente, varios antígenos o epítipos antigénicos diferentes relacionados con el mismo tipo de enfermedad, en particular con el mismo tipo de tumor, pueden distribuirse en subconjuntos de diferentes antígenos o epítipos antigénicos, en particular subconjuntos que se complementan entre sí, en el contexto de un cierto tipo de enfermedad, por ejemplo, un tumor, comprendidos en diferentes complejos, 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.

35 Preferentemente, el complejo según la presente invención comprende al menos un epítipo tumoral, que es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo consistente en EpCAM, HER-2/neu, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, CEA, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART, IL13Ralpha2, CMV, EGFRvIII, EphA2, gp100, hTert, TRP-2, YKL-40, brevicin, neuroligina 4 y PTPRz1. Más preferentemente, el complejo según la presente invención comprende al menos un antígeno tumoral seleccionado del grupo consistente en EpCAM, HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, CEA, TGF β R2, p53, Ras, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART, IL13Ralpha2, CMV, EGFRvIII, EphA2, gp100, hTert, TRP-2, YKL-40, brevicin, neuroligina 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. También se prefiere que el complejo según la presente invención comprenda al menos
40 un epítipo tumoral de un antígeno seleccionado de los antígenos de glioma divulgados por Reardon, D.A., *et al.*, An update on vaccine therapy and other immunotherapeutic approaches for glioblastoma. Expert Rev Vaccines, 2013. 12(6): págs. 597-615.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "fragmento" de un antígeno comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos del antígeno, preferentemente al menos 15 aminoácidos consecutivos del antígeno, más preferentemente al menos 20 aminoácidos consecutivos del antígeno, incluso más preferentemente al 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 %, preferentemente al menos un 80 %, más
55 preferentemente al menos un 85 %, incluso más preferentemente 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(s) por el antígeno (fragmento), no está deteriorada ni abolida. Sin embargo, preferentemente, la secuencia de aminoácidos del (de los) epítipo(s), por ejemplo, comprendido(s) en el antígeno (fragmento) de cáncer/tumor como se describe en el presente documento, 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
65

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

5 Componente c) - agonista peptídico de TLR

En el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención, el agonista peptídico de TLR permite un aumento de la dirección de la vacuna hacia las células dendríticas junto con autoajustabilidad. El enlace físico de un agonista peptídico de TLR al CPP y el al menos un antígeno o epítipo antigénico en el complejo comprendido por la combinación para uso según 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).

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, un "agonista peptídico 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 agonista peptídico de TLR es un péptido, polipéptido o proteína como se ha definido anteriormente. Preferentemente, el agonista peptídico de TLR comprende de 10 a 150 aminoácidos, más preferentemente de 15 a 130 aminoácidos, incluso más preferentemente de 20 a 120 aminoácidos, con particular 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 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 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 modulins. TLR7 puede ser activado por imidazoquinolinas. TLR9 puede activarse mediante ADN CpG no metilado o complejos cromatina-IgG.

Preferentemente, el agonista peptídico de TLR comprendido en el complejo comprendido por la combinación para 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 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.

Sin embargo, TLR2, 4 y 5 se expresan constitutivamente en la superficie de las CD. Por consiguiente, preferentemente el agonista peptídico de TLR comprendido en el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención es un agonista peptídico de TLR2, TLR4 y/o TLR5. Incluso más preferentemente, el agonista peptídico de TLR es un agonista peptídico de TLR2 y/o de TLR4. De manera particularmente preferente, el agonista peptídico de TLR es un agonista peptídico de TLR4. Con total preferencia, el agonista peptídico de TLR es un agonista peptídico 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 fermentas*, 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-

arabinomanano 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):621-5. LPS, que se encuentra en la membrana externa de bacterias gramnegativas, es el ligando TLR4 más ampliamente estudiado. Agonistas peptídicos de TLR4 derivados de LPS adecuados se describen, por ejemplo, en el documento 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 agonistas peptídicos de TLR comprendidos en el complejo.

Así, ejemplos de agonistas peptídicos de TLR incluyen los agonistas lipopeptídicos 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 agonista peptídico de TLR comprendido en el complejo no sea un lipopéptido ni una lipoproteína, ni un glucopéptido ni una glucoproteína, más preferentemente, el agonista peptídico de TLR comprendido en el complejo es un péptido, polipéptido o proteína clásico tal como se definen en el presente documento.

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

Así, es particularmente preferente un agonista peptídico de TLR2 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según 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 agonista peptídico de TLR, comprendido en el complejo.

STVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE
SEQ ID NO: 15 (agonista peptídico de TLR2 Anaxa)

Una variante de secuencia funcional particularmente preferida del agonista peptídico TLR según la SEQ ID NO: 15 es el agonista peptídico TLR según la SEQ ID NO: 47:
STVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE
SEQ ID NO: 47

Por consiguiente, un agonista peptídico de TLR2 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 47 o una variante de secuencia del mismo como se ha descrito anteriormente es particularmente preferido como componente c), es decir, como el al menos un agonista peptídico de TLR, comprendido por el complejo.

Con respecto a TLR4, los agonistas peptídicos de TLR particularmente preferentes corresponden en particular 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 agonistas peptídicos 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 los documentos EP 1 913 954 B1, EP 2 476 440 A1, US 2009/0220532 A1 y WO 2011/101332 A1. De este modo, un agonista peptídico de TLR4 que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 40 o una variante de secuencia del mismo como se describió anteriormente es particularmente preferente como componente c), es decir, como el al menos un agonista peptídico de TLR comprendido en el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención.

NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQGQVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELQGLRP
GSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQST

SEQ ID NO: 40 (agonista peptídico 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 el documento US 2011/0236406 A1.

Además, también el agonista de TLR según la SEQ ID NO: 15 y el agonista de TLR según la SEQ ID NO: 47 pueden actuar como agonista de TLR4. Por consiguiente, se prefiere particularmente un agonista peptídico de TLR4 que comprenda o consista en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 15 o 47 o una variante de secuencia funcional del mismo como componente c), es decir, como el al menos un agonista peptídico de TLR, comprendido por el complejo.

El complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende al menos un agonista peptídico de TLR, preferentemente el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende más de un agonista peptídico de TLR, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más agonistas peptídicos de TLR, más preferentemente el complejo tal como se describe en el presente documento comprende (al menos) dos o tres agonistas peptídicos de TLR, incluso más preferentemente el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende (al menos) cuatro o cinco agonistas peptídicos de TLR. Si está comprendido más de un agonista peptídico de TLR en el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención, se entiende que dicho agonista peptídico de TLR en particular también está unido de forma covalente en el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención, por ejemplo, a otro agonista peptídico 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende un único agonista peptídico de TLR. En particular, en esta realización particularmente preferida, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende un único agonista peptídico de TLR y ningún otro componente con propiedades agonistas de TLR excepto el único agonista peptídico de TLR como se describe.

Los diversos agonistas peptídicos de TLR comprendidos en el complejo pueden ser iguales o diferentes. Preferentemente, los diversos agonistas peptídicos de TLR comprendidos en el complejo 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 epítipos antigénicos, o más agonistas peptídicos de TLR, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 agonistas de TLR se dispongan de forma consecutiva en el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención. Esto significa, en particular, que todos los agonistas peptídicos 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 agonistas peptídicos de TLR. Sin embargo, los agonistas peptídicos de TLR dispuestos de forma consecutiva de esta 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 b), es decir al menos un antígeno o epítipo antigénico.

Alternativamente, sin embargo, los diversos agonistas peptídicos de TLR también pueden disponerse de cualquier otra manera en el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención, por ejemplo con el componente a) y/o el componente b) dispuestos entre dos o más agonistas peptídicos de TLR, es decir, donde uno o más agonistas peptídicos de TLR están entre el componente a) y el componente b) (o viceversa) y, opcionalmente, uno o más agonistas peptídicos de TLR en el otro extremo respectivo del componente a) y/o del componente b).

Se entiende que varios agonistas peptídicos de TLR diferentes que activan los mismos o diferentes receptores TLR pueden estar comprendidos ventajosamente en un único complejo. Alternativamente, se pueden distribuir varios agonistas peptídicos de TLR diferentes que activan los mismos o diferentes receptores TLR en subconjuntos de diferentes agonistas peptídicos de TLR que activan los mismos o diferentes receptores TLR, comprendidos en diferentes complejos, 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

En el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención, los componentes a), b) y c) están enlazados de forma covalente, es decir, el enlace entre dos de los tres componentes a), b) y c) del complejo es un enlace covalente. Preferentemente, dos de los tres componentes a), b) y c) del complejo están unidos de forma covalente entre sí (es decir, el "primer" y el "segundo" componente), y el tercer componente de los tres componentes a), b) y c) está unido de forma covalente al primer componente de los tres componentes a), b) y c) o al segundo componente de los tres componentes a), b) y c). Así, preferentemente, se forma una molécula lineal. Sin embargo, también es concebible que cada uno de los tres componentes a), b) y c) esté enlazado de forma covalente 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención también puede denominarse "compuesto", en particular puede denominarse "molécula".

Preferentemente, en el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención, los componentes a), b) y c) están unidos de forma covalente 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 sean biológicamente inactivos. Se hace referencia al conocimiento del experto en la materia 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 químio-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 encuentre solo una o varias veces en los componentes a), b) y/o c), grupo funcional que se reticulará con el otro de los componentes a), b) y c). Como ejemplo, se puede usar el grupo tiol de cisteína cuando solo un residuo de cisteína está presente en un cierto componente a), b) o c) del complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención. Además, por ejemplo, si un determinado componente a), b) o c) no contiene residuos de lisina, un reactivo de reticulación específico para aminos primarios 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 de 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 de 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) preferentemente tiene un residuo de cisteína. Preferentemente, se debe evitar cualquier segundo residuo de cisteína y, opcionalmente, se puede reemplazar cuando aparecen en el componente respectivo comprendido en el complejo. Cuando un residuo de 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 químico 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, págs. 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-dinitrobenzoceno. 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 de m-maleimidobenzil-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 para mejorar su 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 reticulantes escindibles bien conocidos. El uso de un agente de reticulación escindible permite que el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o epítopo antigénico y el al menos un agonista peptídico de TLR comprendidos en el complejo 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 expuestos 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 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 fotoreactivos, por ejemplo arilazida, diazirina y otros reactivos de reticulación heterobifuncionales químicos fotoreactivos (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 comprendido por la combinación para uso según 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-dihidroxi-butano, bis-maleimidohexano, 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-[succinimidoxycarbonilo]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 dodecaoxanonatriacantano azida, NHS-fosfina, 3-(2-piridilditio)propionilhidrazida, 2-piridilditio-tetraoxatetradecano-N-hidroxisuccinimida, 2-piridilditio-tetraoxaoctatriacontano-N-

hidroxisuccinimida, N-(p-maleimidofenil)isocianato, 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 -maleimidocaproiloxi)sulfosuccinimida, éster N-(γ -maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida, éster N-(κ -maleimidooundecanoiloxi)sulfosuccinimida, Sulfo-NHS-LC-diazirina, sulfosuccinimidil 6-(3'-[2-piridilditio]propionamido)hexanoato, éster m-maleimidobenzoil-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 comprendido por la combinación para 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 unirse 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, 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), Alternativamente, son preferentes los enlaces éster o éter.

Además, en particular cuando los componentes a unirse 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 agonista peptídico 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 preferentemente 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).

El complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede comprender opcionalmente un espaciador o enlazador, que son grupos no inmunológicos, preferentemente 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 epítipos antigénicos consecutivos y/o unen agonistas peptídicos 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 preferentemente 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención o para diseñar un enlazador a emplear en el complejo.

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 preferentemente en 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 policationicos, 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 preferentemente al menos un 40 % e incluso más preferentemente 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. 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 comprendido por la combinación para uso según la presente 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 agonistas peptídicos de TLR, será claro para el experto en la materia que cada uno de los antígenos o epítopos antigénicos y/o cada uno de los agonistas peptídicos de TLR comprendidos en el complejo 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención comprende varios antígenos o epítopos antigénicos o cuando el complejo comprende varios agonistas peptídicos de TLR, también es posible que algunos antígenos o epítopos antigénicos y/o algunos agonistas peptídicos de TLR comprendidos en el complejo estén directamente unidos entre sí y algunos otros antígenos o epítopos antigénicos y/o algunos otros agonistas peptídicos de TLR estén unidos a través de espaciadores o enlazadores tales como un espaciador peptídico consistente en unos pocos aminoácidos.

Por ejemplo, dos antígenos o epítopos antigénicos sucesivos o dos agonistas peptídicos de TLR sucesivos comprendidos en el complejo están unidos entre sí por espaciadores consistentes en las regiones flanqueantes naturales de dichos antígenos o epítopos antigénicos o de dichos agonistas peptídicos de TLR, respectivamente. Por ejemplo, el espaciador usado para unir un primer antígeno/epítipo antigénico o un primer agonista peptídico de TLR a un segundo antígeno/epítipo antigénico o a un segundo péptido agonista de TLR, respectivamente, puede tener hasta aproximadamente 8 aminoácidos, correspondientes a hasta aproximadamente 4 aminoácidos de la región flanqueante N-terminal o C-terminal del primer antígeno/epítipo antigénico o del primer agonista peptídico 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 agonista peptídico de TLR. En una ilustración del complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención, el espaciador utilizado para unir un primer antígeno/epítipo antigénico o un primer agonista peptídico de TLR ("antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1") a un segundo epítipo ("antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2") consta de aproximadamente 8 aminoácidos correspondientes a cualquier combinación posible que oscile entre: 0 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1 y 8 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2, hasta 8 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1 y 0 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2, es decir, incluyendo 1 aminoácido flanqueante del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1 y 7 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2, 2 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1 y 6 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2, 3 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1 y 5 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2, 4 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1 y 4 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2, 5 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1 y 3 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2, 6 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1 y 2 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2, 7 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1 y 1 aminoácido flanqueante del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2, 8 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1 y 0 aminoácidos flanqueantes del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2. Se entenderá que el total de 8 aminoácidos que constituyen un espaciador que une dos antígenos/epítopos/agonistas peptídicos 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 del complejo en aquella situación donde un espaciador tiene menos o más de 8 aminoácidos.

En otra ilustración particular del complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención, el espaciador utilizado para unir un primer antígeno/epítipo antigénico o un primer agonista peptídico de TLR ("antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1") a un segundo antígeno/epítipo antigénico o a un segundo agonista

peptídico de TLR, respectivamente, ("antígeno/epítipo/agonista peptídico 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/agonista peptídico de TLR 1 o del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2. También se puede disponer un espaciador como se describe anteriormente en la parte C-terminal del último antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR comprendido en el complejo.

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, enlaces peptídicos estables (incluyendo enlaces peptídicos entre aminoácidos de una proteína de fusión) o por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas.

Preferentemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico comprendido en el complejo, así como cualquier espaciador o enlazador opcional comprendido en el complejo, son de naturaleza peptídica. En especial, todos los componentes del complejo comprendido por la combinación para 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 agonista peptídico de TLR y cualquier enlazador o separador peptídico opcional están unidos en el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención mediante un enlace peptídico. Con total preferencia, el complejo comprendido por la combinación para 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 según las SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 45 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: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 45; 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: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 45 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 las SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 45; con particular preferencia, un complejo que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según las SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 45 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: 31, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 45 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: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 45.

SEQ ID NO: 26:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYP VTYSSPEDGI
RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKS
AKFKQLLQHY REVAAAKSSE NDRLRLLLKE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV
PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFELTE WTGS

SEQ ID NO: 27:

MHHHHHHSTV HEILCKLSLE GDHSTPPSAY GSVKPYTNFD AEKRYKNRVA SRKSRAKFKQ
LLQHYREVAA AKSSENDRLR LLLKESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVGV GALKVPRNQD
WLGVPRAKFA SFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESINF EKLTEWTGS

SEQ ID NO: 28:

ES 2 977 541 T3

MHHHHHHKRYKNRVA SRKSRKFKQ LLQHYREVAA AKSSENDRLR LLLKESLKIS
QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPRAKF ASFEAQGALA
NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGSS TVHEILCKLS LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE

SEQ ID NO: 29:

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

SEQ ID NO: 30:

MHHHHHHREV AAKSSENDR LRLLLKESLK ISQAVHAAHA EINEAGREVV GVGALKVPRN
QDWLGVPRA KASFEAQGA LANIAVDKAN LDVEQLESII NFEKLTWTG SSTVHEILCK
LSLEGDHSTP PSAYGSVKPY TNFDAE

SEQ ID NO: 31:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYP VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQTSTRY KNRVASRKS AKFKQLLQHY
REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPRA AKFASFEAQG
ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTWT GS

SEQ ID NO: 32:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYP VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQTSTREV AAKSSENDR LRLLLKESLK
ISQAVHAAHA EINEAGREVV GVGALKVPRN QDWLGVPRA KASFEAQGA LANIAVDKAN
LDVEQLESII NFEKLTWTG S

SEQ ID NO: 41:

KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLVKTYHSPSYAYHQFERRAILNRLV
QFIKDRISVVQALVTSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTN FDAE

SEQ ID NO: 42:

KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLVNYRIATFKNWPFLDCAMEELT
VSEFLKLDQRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 43:

KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLVHLELASMTNMELMSSIVSTVHEI
LCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 44:

RKKRRQRRRRVKRISQAVHAAHAEINEAGRVRKRVPRNQDWLRVKRASFEAQGALANIAVD
KARVKRSIINFELRVKRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 45:

KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVA AAKSSENDRLRLLLKLFRAAQLANDVVLQIMEHLELA
SMTNMELMSSIVVISASIIVFNLLELEGSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

Disposición de los componentes a), b) y c) en el complejo

- 5 Los componentes a), b) y c) pueden estar dispuestos en el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención de cualquier manera.

En particular, cuando el complejo comprende más de un péptido de penetración celular y/o más de un antígeno o epítipo antigénico y/o más de un agonista peptídico 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 agonista peptídico de TLR (componente c)) puede interrumpir un tramo de péptidos de penetración celular dispuestos de forma consecutiva 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 agonista peptídico 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 agonista peptídico 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 agonistas peptídicos de TLR dispuestos de forma consecutiva y/o los agonistas peptídicos 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención de manera consecutiva y/o que el antígeno o epítipo antigénico de más se disponga en el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención de manera consecutiva y/o que el agonista peptídico de TLR de más se disponga en el complejo comprendido por la combinación para uso según 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 agonistas peptídicos 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 de forma consecutiva de tal manera pueden estar unidas entre sí, por ejemplo, mediante un espaciador o un 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 de forma covalente 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención, los componentes a), b) y c) pueden estar unidos de forma covalente a través de un enlazador o un espaciador como se describe en el presente documento 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 comprendido por la combinación para uso según 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.

Preferentemente, los tres componentes a), b) y c) están unidos vía enlace cadena principal/cadena principal, resultando, en particular, en una cadena principal del complejo 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 agonistas peptídicos 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 agonistas peptídicos de TLR constituyen la cadena principal del complejo, opcionalmente junto con otros componentes, por ejemplo, enlazador(es), espaciador(es). 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 agonista peptídico de TLR);
- (β) componente c) (al menos un agonista peptídico de TLR) - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico);
- (γ) componente a) (péptido de penetración celular) - componente c) (al menos un agonista peptídico de TLR) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico);
- (δ) componente c) (al menos un agonista peptídico de TLR) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - componente a) (péptido de penetración celular);
- (ε) componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - componente a) (péptido de penetración celular) - componente c) (al menos un agonista peptídico de TLR); o
- (ζ) componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - componente c) (al menos un agonista peptídico 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 agonista peptídico de TLR. Por consiguiente, 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.

Incluso más preferentemente, 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 agonista peptídico 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 comprendido por la combinación para 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 → C-terminal de la cadena principal de dicho complejo en el orden:

- (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:

- (α1) componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR2;
- (α2) componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR2, uno o más agonistas peptídicos de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR4 y uno o más agonistas peptídicos de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR5;
- (α3) componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR2 y uno o más agonistas peptídicos de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR4; o
- (α4) componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR2 y uno o más agonistas peptídicos de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR5.

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

- (α5) uno o más agonistas peptídicos de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR4 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR2;
- (α6) uno o más agonistas peptídicos de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR5 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más

- agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 péptidos agonistas TLR2; o
- (α7) uno o más agonistas peptídicos de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR4 y uno o más agonistas peptídicos de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR5 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos 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 agonistas peptídicos de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR4 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico);
- (β2) uno o más agonistas peptídicos de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR4, uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR2 y uno o más agonistas peptídicos de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR5 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico);
- (β3) uno o más agonistas peptídicos de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR4 y uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR2 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico); o
- (β4) uno o más agonistas peptídicos de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR4 y uno o más agonistas peptídicos de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR5 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico).

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

- (β5) uno o más agonistas peptídicos de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR4 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR2;
- (β6) uno o más agonistas peptídicos de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR4 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR5; o
- (β7) uno o más agonistas peptídicos de TLR4, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR4 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos de TLR2 y uno o más agonistas peptídicos de TLR5, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 agonistas peptídicos 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 comprendido por la combinación para uso según 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 o un espaciador:

- (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 agonista peptídico 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 las siguientes disposiciones:

- (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 agonista peptídico de TLR está unida de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un 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 peptídico de TLR está unida de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un 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 el enlace cadena lateral/cadena lateral al componente a), es decir, la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR está unida de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral del péptido de penetración celular;

(iv) el componente c) puede unirse, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el enlace cadena principal/cadena lateral al componente b), es decir, la cadena principal del al menos un agonista peptídico de TLR está unida de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un 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 el enlace cadena lateral/cadena principal al componente b), es decir, la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR está unida de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un 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 el enlace cadena lateral/cadena lateral al componente b), es decir, la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR está unida de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un 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 el 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 agonista peptídico de TLR está unida de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un 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 el 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 agonista peptídico de TLR está unida de forma covalente, 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 el 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 agonista peptídico de TLR está unida de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral de un enlazador o un espaciador dispuesto entre el componente a) y el componente b).

Por ejemplo, los componentes b) y c) están unidos vía el 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 o un espaciador:

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

(4) agonista peptídico 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 agonista peptídico 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 agonista peptídico de TLR (c).

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

(xv) el componente a) 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 péptido de penetración celular está unida de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR;

(xvi) el componente a) puede estar unido, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, vía el 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 de forma covalente, 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);
(xvii) el componente a) 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 b) y el componente c), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está unida de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena principal de un enlazador o un espaciador dispuesto entre el

componente b) y el componente c); o
(xviii) el componente a) 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 b) y el componente c), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está de forma covalente unida, opcionalmente a través de un espaciador o enlazador, a la cadena lateral de un enlazador o un espaciador dispuesto entre el componente b) y el componente c).

Por ejemplo, los componentes a) y c) están unidos vía el enlace 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 o un espaciador:

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

(6) agonista peptídico de TLR (c) - péptido de penetración celular (a).

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 agonista peptídico de TLR (c) o, si está presente, con un componente adicional, tal como un espaciador o enlazador, que puede estar dispuesto, por ejemplo, entre el péptido de penetración celular (a) y el agonista peptídico de TLR (c). Esto incluye las siguientes disposiciones:

(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 de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral del péptido de penetración celular;

(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 de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena principal del péptido de penetración celular;

(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 de forma covalente, 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 de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR;

(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 de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena principal del al menos un agonista peptídico de TLR;

(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 de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral del al menos un agonista peptídico 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 de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral de un enlazador o un 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 de forma covalente, 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 de forma covalente, opcionalmente mediante un espaciador o un enlazador, a la cadena lateral de un enlazador o un espaciador dispuesto entre el componente a) y el componente c).

- 5 Alternativamente, también es concebible que, en el complejo comprendido por la combinación para uso según 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.

10 **Combinaciones preferentes de un modulador de puntos de control inmunitarios preferido y un complejo preferido que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico**

- 15 Como se ha descrito anteriormente, una combinación preferida para su uso según la presente invención comprende un modulador de puntos de control inmunitarios preferido tal como se describe en el presente documento. Además, una combinación preferida para su uso según la presente invención comprende un complejo preferido tal como se describe en el presente documento que comprende un péptido de penetración celular (preferido), al menos un antígeno o epítipo antigénico (preferido) y al menos un agonista peptídico de TLR (preferido).

- 20 Una combinación más preferida para su uso según la presente invención comprende (i) un modulador de puntos de control inmunitarios preferido tal como se describe en el presente documento y (ii) un complejo preferido tal como se describe en el presente documento que comprende un péptido de penetración celular (preferido), al menos un antígeno o epítipo antigénico (preferido) y al menos un agonista peptídico de TLR (preferido). A continuación, se describen realizaciones preferidas de una combinación preferida para su uso según la presente invención.

- 25 En una combinación preferida para su uso según la presente invención, el complejo es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante donde

- 30 a) el péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13), la SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14), la SEQ ID NO: 8 (CPP5 /Z15), o la SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z1 8), o variantes de secuencia de las mismas como se describe en el presente documento sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido;
b) el al menos un antígeno o epítipo antigénico es un péptido, polipéptido o proteína y, preferentemente, comprende o consiste en al menos un epítipo de cáncer o epítipo de tumor; y
35 c) el agonista peptídico de TLR es un agonista peptídico de TLR2 y/o un agonista peptídico de TLR4.

- También se prefiere en la combinación para uso según la presente invención que el modulador de puntos de control inmunitarios sea un modulador de CD40, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO, preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO o un activador de CD40, más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-1 y/o IDO e incluso más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4 y/o PD-1.

- 45 También se prefiere en la combinación para uso según la presente invención que el modulador de puntos de control inmunitarios sea un modulador de CD40, LAG3, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO, preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de LAG3, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO o un activador de CD40, más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de LAG3, CTLA- 4, PD-L1, PD-1 y/o IDO e incluso más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de LAG3, CTLA-4 y/o PD-1.

- 50 Por ejemplo, en una combinación preferida para su uso según la presente invención

- el complejo es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante donde
 - 55 a) el péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13), la SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14), la SEQ ID NO: 8 (CPP5 /Z15), o la SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18), o variantes de secuencia de las mismas como se describe en el presente documento sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido;
 - b) el al menos un antígeno o epítipo antigénico es un péptido, polipéptido o proteína y, preferentemente, comprende o consiste en al menos un epítipo de cáncer o epítipo de tumor; y
 - 60 c) el agonista peptídico de TLR es un agonista peptídico de TLR2 y/o un agonista peptídico de TLR4; y
- el modulador de puntos de control inmunitarios es un modulador de la vía CD40, de la vía CTLA-4 y/o de la vía PD-1, en particular el modulador de puntos de control inmunitarios es un activador de CD40 o un inhibidor de CD40, CTLA-4, PD -L1, PD-L2 y/o PD-1, más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-L2 y/o PD-1, e incluso más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4 y/o PD-1.

Por ejemplo, en una combinación preferida para su uso según la presente invención

- el complejo es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante donde

- a) el péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13), la SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14), la SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15), o la SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18), o variantes de secuencia de las mismas como se describe en el presente documento sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido;
- b) el al menos un antígeno o epítipo antigénico es un péptido, polipéptido o proteína y, preferentemente, comprende o consiste en al menos un epítipo de cáncer o epítipo de tumor; y
- c) el agonista peptídico de TLR es un agonista peptídico de TLR2 y/o un agonista peptídico de TLR4; y

el modulador de puntos de control inmunitarios es un modulador de la vía CD40, de la vía CTLA-4, de la vía LAG3 y/o de la vía PD-1, en particular el modulador de puntos de control inmunitarios es un activador de CD40 o un inhibidor de CD40, LAG3, CTLA-4, PD-L1, PD-L2 y/o PD-1, más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de LAG3, CTLA-4, PD-L1, PD-L2 y/o PD-1, e incluso más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de LAG3, CTLA-4 y/o PD-1.

En una combinación preferida para su uso como se describe en el presente documento, en particular en una combinación preferida para su uso tal como describe anteriormente, se prefiere el uso de más de un modulador de puntos de control inmunitarios, por ejemplo, un inhibidor de punto de control, en particular, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos, por ejemplo, inhibidores de punto de control, preferentemente 2, 3, 4 o 5 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos, por ejemplo, inhibidores de punto de control, por ejemplo, inhibidores de puntos de control, más preferentemente 2, 3 o 4 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos, por ejemplo, inhibidores de puntos de control, aún más preferentemente 2 o 3 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos, por ejemplo, inhibidores de puntos de control, y más preferentemente 2 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos, por ejemplo, inhibidores de puntos de control.

Por lo tanto, se prefiere que al menos (i) un inhibidor de la vía CTLA-4, en particular un inhibidor de CTLA-4 y (ii) un inhibidor de la vía PD-1, en particular un inhibidor de PD-1, se utilizan PD-L1 o PD-L2; preferentemente se usan al menos (i) un inhibidor de CTLA-4 y (ii) un inhibidor de PD-1.

Uso en medicina

La combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento es para uso en medicina.

Tal combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento es capaz de iniciar o mejorar la eficacia de los moduladores de punto de control. Además, una combinación tal como se describe en el presente documento puede simultáneamente (i) estimular la inmunidad mediada por células T citotóxicas multiepitópicas, (ii) inducir células Th y (iii) promover la memoria inmunológica, generando así una inmunidad (antitumoral) potente y duradera. La memoria inmunológica es esencial para proteger contra la recaída, en particular contra la recaída tumoral. En conjunto, la presente invención proporciona así una combinación como se describe en el presente documento que es capaz de iniciar, permitir, potenciar o mejorar una respuesta inmunitaria, en particular que permite, potencia o mejora la respuesta del sujeto o del tumor a los moduladores de puntos de control.

La combinación para uso según la presente invención puede ser útil en una variedad de enfermedades. Preferentemente, la combinación tal como se describe en el presente documento es para uso (para la preparación de un fármaco) para la prevención, tratamiento o estabilización de una enfermedad o trastorno, tal como aquellos que pueden tratarse mediante inmunoterapia, incluyendo cánceres, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunitarios, enfermedades hematológicas y rechazos de trasplantes. Por consiguiente, se prefiere una combinación tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, tratamiento o estabilización de una enfermedad o trastorno, tales como aquellos que pueden tratarse mediante inmunoterapia, incluidos cánceres, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunitarios, enfermedades hematológicas y rechazos de trasplantes.

En el contexto de la presente invención, se prefiere particularmente que la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento se utiliza en la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

El término "enfermedad" tal como se usa en el contexto de la presente invención pretende ser generalmente sinónimo, y se usa indistintamente con, los términos "trastorno" y "condición" (como en condición médica), en el sentido de que

todos reflejan una condición anormal del cuerpo humano o animal o de una de sus partes que perjudica el funcionamiento normal, se manifiesta típicamente mediante signos y síntomas distintivos y hace que el ser humano o animal tenga una duración o calidad de vida reducida.

- 5 Enfermedades preferidas a tratar y/o prevenir mediante el uso de la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios tal como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como descritos en el presente documento incluyen cáncer, trastornos hematológicos, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunitarios y rechazos de trasplantes. De este modo, se prefiere el tratamiento y/o la prevención del cáncer y
- 10 enfermedades infecciosas y se prefiere más el tratamiento y/o la prevención del cáncer. Para el cáncer, se prefiere una neoplasia maligna del cerebro o una neoplasia maligna de tejido linfoide, hematopoyético y relacionado y es más preferido el glioblastoma.

- 15 Preferentemente, la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios tal como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento puede utilizarse para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejoría de cáncer o enfermedades tumorales, incluyendo enfermedades causadas por apoptosis defectuosa, preferentemente seleccionadas de neurinoma acústico, carcinoma anal, astrocitoma, basalioma, síndrome de Behcet, cáncer de vejiga, blastomas, cáncer de huesos,
- 20 metástasis cerebral, tumores cerebrales, cáncer cerebral (glioblastomas), cáncer de mama (carcinoma de mama), linfoma de Burkitt, carcinoides, cáncer de cuello uterino, carcinoma de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de cuerpo del útero, craneofaringeomas, síndrome CUP, carcinoma de endometrio, cáncer de vesícula biliar, tumores genitales, incluyendo cánceres del tracto genitourinario, glioblastoma, gliomas, tumores de cabeza/cuello, hepatomas, linfoma histiocítico, síndromes o linfomas de Hodgkin y linfomas no Hodgkin, tumores de hipófisis, cáncer intestinal, incluidos tumores del intestino delgado y tumores gastrointestinales, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, carcinomas de riñón,
- 25 cáncer laríngeo o cáncer de laringe, leucemia, incluida leucemia mieloide aguda (AML), eritroleucemia, leucemia linfoide aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia linfocítica crónica (CLL), tumor del páncreas, cáncer de hígado, metástasis hepáticas, carcinomas de pulmón (= cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas pulmonares de células pequeñas y carcinomas pulmonares de células no pequeñas, y adenocarcinoma de pulmón, linfomas, cáncer linfático, melanomas malignos, carcinomas de mama (= cáncer de mama), meduloblastomas, melanomas, meningiomas, micosis fungoide, enfermedades neoplásicas neurinoma, cáncer de esófago, carcinoma de esófago (= cáncer de esófago), oligodendroglioma, cáncer de ovario (= carcinoma de ovario), carcinoma de ovario, carcinoma de páncreas (= cáncer de páncreas), cáncer de pene, cáncer de pene, cáncer de faringe, tumor de hipófisis, plasmocitoma, cáncer de próstata (= tumores de próstata), carcinoma de recto, tumores de recto, cáncer de riñón,
- 30 carcinomas renales, retinoblastoma, sarcomas, enfermedad de Schneeberger, cáncer de piel, por ejemplo, melanoma o carcinoma no melanocítico, por ejemplo, melanoma o cáncer de piel no melanoma, incluidos carcinomas de células basales y de células escamosas, así como psoriasis, pénfigo vulgar, tumores de tejidos blandos, espinolioma, cáncer de estómago, cáncer de testículos, cáncer de garganta, timoma, carcinoma de tiroides, cáncer de lengua, cáncer de uretra, cáncer de útero, cáncer de vagina, diversos tumores inducidos por virus como, por ejemplo, carcinomas inducidos por el virus del papiloma (por ejemplo, carcinoma de cuello uterino = cáncer de cuello uterino), adenocarcinomas, tumores inducidos por virus del herpes (por ejemplo, linfoma de Burkitt, linfoma de células B inducido por EBV, carcinoma de cuello uterino), tumores inducidos por hepatitis B (carcinomas hepatocelulares), linfomas inducidos por HTLV-1 y HTLV-2, cáncer de vulva, afecciones o afectación de verrugas. En el presente contexto, los términos "terapia" y "terapéutico" significan preferentemente tener al menos algún efecto fisiológico
- 45 mínimo al ser administrado a un cuerpo vivo. Por ejemplo, un efecto fisiológico tras la administración de un compuesto antitumoral "terapéutico" puede ser la inhibición del crecimiento del tumor, o la disminución del tamaño del tumor, o la prevención de la reaparición del tumor. Preferentemente, en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad neoplásica, se consideraría terapéuticamente eficaz un compuesto que inhiba el crecimiento de un tumor o disminuya el tamaño del tumor o prevenga la reaparición del tumor. Por lo tanto, el término "fármaco antitumoral" significa preferentemente cualquier agente terapéutico que tenga efecto terapéutico contra un tumor, una enfermedad neoplásica o un cáncer.
- 50

- Otros ejemplos preferidos de cánceres a tratar con la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios tal como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento incluyen cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de esófago,
- 55 cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de riñón, melanoma, carcinoma de intestino, carcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, leucemia mieloide crónica, carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, carcinoma de endometrio, leucemia mieloide, carcinoma de células escamosas de pulmón, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, tumor de vejiga, leucemia promielocítica, carcinoma de pulmón de células no pequeñas y sarcoma. Más preferentemente, la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento se usa para tratar el cáncer colorrectal.
- 60

- 65 El cáncer puede ser un tumor sólido, cáncer de sangre o cáncer linfático. El cáncer puede ser benigno o metastásico.

Preferentemente, el cáncer a prevenir y/o tratar es un glioma, más preferentemente glioblastoma multiforme (GBM) altamente invasivo. Los gliomas son la forma más frecuente de tumores cerebrales primarios en adultos, siendo el glioblastoma multiforme (GBM) el de peor pronóstico. Este tumor es conocido por su comportamiento altamente invasivo y agresivo. En particular, la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento puede utilizarse junto con las modalidades existentes para el glioma, más específicamente el GBM altamente 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.

Además, la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento puede utilizarse para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejorada enfermedades infecciosas, preferentemente enfermedades infecciosas virales, retrovirales, bacterianas o protozoológicas. Tales enfermedades infecciosas se seleccionan típicamente entre SIDA, ántrax, encefalitis japonesa, enfermedades infecciosas bacterianas tales como aborto espontáneo (inflamación de la próstata), ántrax, apendicitis, borreliosis, botulismo, *Campylobacter*, *Chlamydia trachomatis* (inflamación de la uretra, conjuntivitis), cólera, difteria, donovanosis, epiglotitis, tifus, gangrena gaseosa, gonorrea, fiebre del conejo, *Helicobacter pylori*, tos ferina, bubón climático, osteomielitis, enfermedad del legionario, varicela, condiloma acuminado, citomegalovirus (CMV), dengue, meningoencefalitis estival temprana (ESME), virus del Ébola, resfriados, quinta enfermedad, fiebre aftosa, herpes simple tipo I, herpes simple tipo II, herpes zóster, VHS, enfermedades infecciosas causadas por parásitos, protozoos u hongos, como amebiasis, bilharziosis, enfermedad de Chagas, Equinococo, tenia del pescado, intoxicación por pescado (Ciguatera), tenia del zorro, pie de atleta, tenia canina, candidosis, manchas de hongos, sarna, leishmaniosis cutánea, lamblisis (giardiasis), piojos, oncocercosis (ceguera de los ríos), enfermedades fúngicas, tenia bovina, esquistosomiasis, tenia porcina, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis (enfermedad del sueño), leishmaniosis visceral, dermatitis del pañal o tenia miniatura, eritema infeccioso, influenza, sarcoma de Kaposi, fiebre de Lassa, leishmaniasis, lepra, listeriosis, borreliosis de Lyme, malaria, infección por el virus de Marburgo, sarampión, meningitis, incluida meningitis bacteriana, molusco contagioso, mononucleosis, paperas, *Mycoplasma hominis*, sepsis neonatal (corioamnionitis), noma, infección por el virus de Norwalk, otitis media, paratífus, fiebre glandular de Pfeiffer, peste, neumonía, polio (poliomielitis, cojera infantil), pseudocrup, rabia, síndrome de Reiter, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, salmonella paratífus, salmonella tifus, SARS, escarlatina, culebrilla, hepatitis, viruela, chancro blando, sífilis, tétanos, fiebre de los tres días, tripper, enfermedad tsutsugamushi, tuberculosis, tifus, vaginitis (colpitis), enfermedades virales causadas por citomegalovirus (CMV), virus ortopox variola, virus ortopox alastrim, virus parapox ovis, virus del molusco contagioso, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus del herpes B, virus varicela zóster, virus de la pseudorrabia, virus de la citomegalia humana, virus del herpes humano 6, virus del herpes humano 7, virus de Epstein-Barr, virus del herpes humano 8, virus de la hepatitis B, virus chikungunya, virus O'nyong'nyong, rubivirus, virus de la hepatitis C, virus GB C, 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, SARS, virus corona asociado al SARS, virus corona humano 229E, virus corona humano Oc43, torovirus, virus linfotrópico de células T humanas tipo I, virus linfotrópico de células T humanas tipo II, VIH (SIDA), es decir, virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 o virus de inmunodeficiencia humana tipo 2, virus de la influenza, virus de 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 flebotomo, virus de Toscana, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus Hazara, virus Khasan, virus Hantaan, Virus de Seúl, virus de Prospect Hill, virus Puumala, virus de Dobrava Belgrado, virus de Tula, virus sin nombre, virus de Marburgo del Lago Victoria, virus del Ébola de Zaire, virus del Ébola de Sudán, virus del Ébola de Costa de Marfil, virus de la influenza A, virus de la influenza B, virus de la influenza C, virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus respiratorio sincitial, metaneumovirus humano, estomatitis vesicular, virus Indiana, virus de la rabia, virus Mokola, virus Duvenhage, lisavirus del murciélago europeo 1 + 2, lisavirus del murciélago australiano, adenovirus A-F, virus del papiloma humano, virus del condiloma 6, virus del condiloma 11, virus del polio, virus adenoasociado 2, rotavirus u orbivirus, varicela incluida Varicella zoster y parásitos de la malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*), enfermedades infecciosas virales tales como SIDA, enfermedades infecciosas causadas por condiloma acuminata, verrugas huecas, dengue, fiebre de los tres días, virus del Ébola, resfriado, meningoencefalitis estival temprana (FSME), gripe, culebrilla, hepatitis, herpes simple tipo I, herpes simple tipo II, herpes zóster, influenza, encefalitis japonesa, fiebre de Lassa, virus de Marburgo, verrugas, fiebre del Nilo Occidental, fiebre amarilla.

Otros ejemplos preferidos de enfermedades infecciosas incluyen enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos multicelulares. Estos incluyen, por ejemplo, amebiasis, ántrax, úlcera de Buruli (*Mycobacterium ulcerans*), diarrea asociada a calicivirus, diarrea por *Campylobacter*, cáncer de cuello uterino (virus del papiloma humano), enfermedades genitales asociadas a *Chlamydia trachomatis*, cólera, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, 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 y enfermedades invasivas por *Haemophilus influenzae* B, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, diarrea por hepatitis E, úlceras genitales por herpes simple tipo 2, VIH/SIDA, anquilostomiasis, gripe,

encefalitis japonesa, fiebre de Lassa, leishmaniasis, leptospirosis, cáncer de hígado (hepatitis B), cáncer de hígado (hepatitis C), enfermedad de Lyme, malaria, fiebre hemorrágica de Marburgo, sarampión, paperas, cáncer de nasofaringe (virus de Epstein-Barr), meningitis por *Neisseria meningitidis*, neumonía asociada a parainfluenza, tos ferina, peste, poliomielitis, rabia, neumonía por virus respiratorio sincitial (VRS), fiebre del Valle del Rift, diarrea por rotavirus, rubéola, esquistosomiasis, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), shigelosis, viruela, enfermedades asociadas a *Staphylococcus aureus*, cáncer de estómago (*Helicobacter pylori*), *Streptococcus pneumoniae* y enfermedades invasivas, tétanos, encefalitis transmitida por garrapatas, tracoma, tuberculosis, tularemia, fiebre tifoidea, enfermedad asociada al virus del Nilo Occidental, fiebre amarilla.

Además, la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento se puede usar para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejora de trastornos autoinmunes, por ejemplo enfermedades autoinmunes del SNC, enfermedades autoinflamatorias, enfermedad celíaca, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico. Normalmente, las enfermedades autoinmunes surgen de una respuesta inmune anormal del cuerpo contra sustancias y tejidos normalmente presentes en el cuerpo (autoinmunidad). Esto puede limitarse a determinados órganos (por ejemplo, en la tiroiditis autoinmune) o puede afectar a un tejido particular en diferentes lugares (por ejemplo, la enfermedad de Goodpasture, que puede afectar la membrana basal tanto del pulmón como del riñón). Las enfermedades autoinmunes pueden clasificarse según el tipo correspondiente de hipersensibilidad: tipo I (es decir, urticaria inducida por suero autólogo), tipo II, tipo III o tipo IV.

Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen síndrome de Blau, penfigoide ampoloso, cáncer, enfermedad de Castleman, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, osteomielitis multifocal crónica recurrente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de Cogan, enfermedad de aglutininas frías, deficiencia del componente 2 del complemento, dermatitis de contacto, arteritis craneal, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, síndrome de Cushing, enfermedad de Dercum, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, esclerosis sistémica cutánea difusa, síndrome de Dressler, lupus, lupus discoide eritematoso, eccema, encefalomiелitis aguda diseminada (ADEM), enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (también enfermedad de Lou Gehrig; enfermedad de la neurona motora), espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, síndrome antisintetasa, dermatitis atópica, anemia aplásica autoinmune, miocardiopatía autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmune, neuropatía periférica autoinmune, pancreatitis autoinmune, síndrome poliendocrino autoinmune, dermatitis autoinmune por progesterona, púrpura trombocitopénica autoinmune, urticaria autoinmune, uveítis autoinmune, enfermedad de Balo/esclerosis concéntrica de Balo, enfermedad de Behcet, enfermedad de Berger enfermedad de Bickerstaff, encefalitis de Bickerstaff, endometriosis, artritis relacionada con entesitis, gastroenteritis eosinofílica, epidermólisis ampollosa adquirida, eritroblastosis fetal, síndrome de Evan, fibrodisplasia osificante, alveolitis fibrosante (o fibrosis pulmonar idiopática), gastritis, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, encefalopatía de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, penfigoide gestacional, hidradenitis supurativa, hipogammaglobulinemia, púrpura trombocitopénica idiopática (púrpura trombocitopénica autoinmune), nefropatía por IgA, penfigoide cicatricial ocular, miositis por cuerpos de inclusión, artritis reumatoide, fiebre reumática inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante, sarcoidosis, reumatismo palindrómico, cistitis intersticial, esquizofrenia idiopática juvenil, PANDAS (artritis pediátrica también conocida como artritis reumatoide autoinmune juvenil), síndrome de Schmidt, enfermedad neuropsiquiátrica de Kawasaki, otra forma de APS, síndrome de Schnitzler, síndrome miasténico cerebeloso paraneoplásico, enfermedad leucocitoclástica del suero, liquen plano, síndrome de Sjögren, liquen escleroso, Parsonage-Turner, enfermedad de IgA lineal, enfermedad de Still, pénfigo vulgar, hepatitis lupoides, hepatitis autoinmune, síndrome de la persona rígida, anemia perniciosa, endocarditis bacteriana subaguda (SBE), síndrome POEMS, lupus eritematoso, síndrome de Sweet, oftalmía simpática, enfermedad de Meniere, lupus sistémico, cirrosis biliar primaria, síndrome de Miller-Fisher, arteritis de Takayasu, colangitis, neuropatía inflamatoria progresiva, enfermedad de Mucha-Habermann, psoriasis, artritis psoriásica, pioderma gangrenoso, esclerosis múltiple, aplasia pura de glóbulos rojos, encefalitis de Rasmussen, miastenia gravis, mielitis transversa, fenómeno de Raynaud, colitis microscópica, colitis ulcerosa, miositis, enfermedad inflamatoria intestinal idiopática (IBD), neuromielitis óptica, enfermedad de Devic y neuromiotonía.

Además, la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento se puede usar para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejora de trastornos hematológicos, que son típicamente trastornos que afectan principalmente a la sangre. Por tanto, se prefieren las neoplasias malignas hematológicas.

Ejemplos de enfermedades hematológicas incluyen trastornos mieloides, incluyendo hemoglobinopatías (anomalía congénita de la molécula de hemoglobina o de la velocidad de síntesis de hemoglobina), por ejemplo, enfermedad de células falciformes, talasemia, metahemoglobinemia; anemias (falta de glóbulos rojos o hemoglobina), por ejemplo, anemia ferropénica, anemia megaloblástica, incluida la deficiencia de vitamina B12, anemia perniciosa y deficiencia de folato, anemias hemolíticas (destrucción de glóbulos rojos), incluidos trastornos genéticos de la membrana de los glóbulos rojos, como esferocitosis hereditaria, eliptocitosis hereditaria y anemia diseritropoyética congénita, trastornos

genéticos del metabolismo de los glóbulos rojos como la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la deficiencia de piruvato quinasa, anemia hemolítica mediada por inmunidad (prueba de Coombs directa positiva), como la anemia hemolítica autoinmune, incluida la anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes (como el lupus eritematoso sistémico idiopático (SLE) y el síndrome de Evans (anticuerpos antiplaquetarios y anticuerpos hemolíticos)) y anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos fríos (como el síndrome de hemaglutinina fría idiopática, mononucleosis infecciosa y hemoglobinuria paroxística por frío), anemia hemolítica aloinmune, incluida la enfermedad hemolítica del recién nacido (HDN) (como enfermedad Rh (Rh D), enfermedad hemolítica ABO del recién nacido, enfermedad hemolítica Anti-Kell del recién nacido, enfermedad hemolítica Rhesus C del recién nacido, enfermedad hemolítica Rhesus E del recién nacido y otras incompatibilidades de grupos sanguíneos (RhC, Rhe, Kid, Duffy, MN, P y otros)), anemia hemolítica inmunomediada inducida por fármacos, incluida penicilina (dosis altas) y metildopa, hemoglobinopatías (es decir, hemoglobina inestable o cristalina), hemoglobinuria paroxística nocturna (trastorno clonal adquirido poco frecuente de las proteínas de la superficie de los glóbulos rojos), daño físico directo a los glóbulos rojos, incluida la anemia hemolítica microangiopática y secundaria a válvulas cardíacas artificiales, anemia aplásica como la anemia de Fanconi, anemia de Diamond-Blackfan (aplasia hereditaria pura de glóbulos rojos) y aplasia adquirida pura de glóbulos rojos; disminución del número de células, por ejemplo, síndrome mielodisplásico, mielofibrosis, neutropenia (disminución del número de neutrófilos), agranulocitosis, trombastenia de Glanzmann y trombocitopenia (disminución del número de plaquetas), incluida la púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y la trombocitopenia inducida por heparina (HIT); trastornos mieloproliferativos (aumento del número de células), por ejemplo, policitemia vera (aumento del número de células en general), eritrocitosis (aumento del número de glóbulos rojos), leucocitosis (aumento del número de glóbulos blancos), trombocitosis (aumento del número de plaquetas) y trastornos mieloproliferativos; coagulopatías (trastornos del sangrado y de la coagulación), por ejemplo, trombocitosis, trombosis recurrente, coagulación intravascular diseminada, trastornos de las proteínas de la coagulación, incluida la hemofilia como la hemofilia A, la hemofilia B (también conocida como enfermedad de Christmas) y la hemofilia C, la enfermedad de Von Willebrand, la coagulación intravascular diseminada, la deficiencia de proteína S y el síndrome antifosfolípido y trastornos de las plaquetas que incluyen trombocitopenia, trombastenia de Glanzmann y síndrome de Wiskott-Aldrich. Además, los ejemplos de enfermedades hematológicas también incluyen neoplasias malignas hematológicas, por ejemplo, linfomas que incluyen la enfermedad de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin, como el linfoma de Burkitt, el linfoma anaplásico de células grandes, el linfoma esplénico de la zona marginal, el linfoma hepatoesplénico de células T y el linfoma angioinmunoblástico de células T (AITL), mielomas como el mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström y plasmacitoma, leucemias como leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena aguda (AML), mielofibrosis idiopática crónica (MF), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL), leucemia prolinfocítica de células B (B-PLL), leucemia neutrofílica crónica (CNL), leucemia de células pilosas (HCL), leucemia de linfocitos granulares grandes de células T (T-LGL) y leucemia agresiva de células NK. Además, los ejemplos de enfermedades hematológicas también incluyen enfermedades hematológicas diversas que incluyen hemocromatosis, asplenia, hiperesplenismo tal como enfermedad de Gaucher, gammapatía monoclonal de significado indeterminado, linfocitosis hemofagocítica y síndrome de Tempi. Además, los ejemplos de enfermedades hematológicas también incluyen cambios hematológicos secundarios a trastornos no hematológicos que incluyen anemia de enfermedades crónicas, mononucleosis infecciosa, SIDA, malaria y leishmaniasis.

Además, la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento se puede usar para (la preparación de un medicamento para) la profilaxis, el tratamiento y/o la mejora del rechazo de trasplantes, incluyendo, por ejemplo, la reacción injerto contra huésped. El rechazo de un trasplante incluye el rechazo hiperagudo, el rechazo agudo y el rechazo crónico de un trasplante. Ejemplos de rechazo de trasplante incluyen reacción de rechazo del trasplante de piel, riñón, corazón, pulmón, páncreas, hígado, glóbulos, médula ósea, córnea, extremidad amputada accidentalmente, en particular dedos, mano, pie, cara, nariz, hueso, válvula cardíaca, vaso sanguíneo o intestino.

En general, "combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento" significa que la terapia con el modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento se combina con la terapia con el complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento. En otras palabras, incluso si un componente (el modulador de puntos de control o el complejo) no se administra, por ejemplo, el mismo día que el otro componente (el otro modulador de puntos de control o complejo), sus programas de tratamiento normalmente están entrelazados. Esto significa que "una combinación" en el contexto de la presente invención no incluye en particular el inicio de una terapia con un componente (el modulador de puntos de control o el complejo) después de que la terapia con el otro componente (el otro modulador de puntos de control o el complejo) haya terminado. Por tanto, una terapia "terminada" significa en particular que el componente activo ya no ejerce su efecto, es decir, una "terapia" puede terminarse en particular varios minutos, horas o días después de la última administración del componente activo, dependiendo de cuánto tiempo el componente activo ejerce sus efectos. En términos más generales, un programa de tratamiento "entrelazado" del modulador de puntos de control y el complejo (y, por tanto, una combinación del modulador de puntos de control y el complejo) significa que

(i) no se completa cada administración del modulador de puntos de control (y, por tanto, la terapia completa con modulador de puntos de control) durante más de una semana (preferentemente durante más de 3 días, más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de un día) antes de que comience la primera administración del complejo (y, por tanto, la terapia completa con el complejo); o bien

(ii) no se completa cada administración del complejo (y, por tanto, la terapia completa con el complejo) durante más de una semana (preferentemente durante más de 3 días, más preferentemente durante más de 2 días, incluso más preferentemente durante más de un día) antes de que comience la primera administración del modulador de puntos de control (y, por tanto, la terapia completa con el modulador de puntos de control).

Por ejemplo, en la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento para su uso según la presente invención, un componente (el modulador de puntos de control o el complejo) se puede administrar una vez a la semana y el otro componente (el otro modulador de puntos de control o complejo) se puede administrar una vez al mes. Para lograr en este ejemplo "una combinación" en el sentido de la presente invención, el componente administrado mensualmente debe administrarse al menos una vez en la misma semana, en la que también se administra el otro componente administrado semanalmente.

Como se ha descrito anteriormente, la administración del modulador de puntos de control inmunitarios y/o del complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención puede requerir múltiples administraciones sucesivas, por ejemplo, múltiples inyecciones. Así, la administración puede repetirse al menos dos veces, por ejemplo, una vez como inyecciones de inmunización primaria y, posteriormente, como inyecciones de refuerzo.

En particular, el modulador de puntos de control inmunitarios y/o el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención se pueden administrar de forma repetida o continua. El modulador de puntos de control inmunitarios y/o el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención se pueden administrar repetida o continuamente durante un periodo 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. Por ejemplo, el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se puede administrar dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, una vez a la semana, cada dos semanas, cada tres semanas, una vez al mes o cada dos meses. Por ejemplo, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención se puede administrar dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, una vez a la semana, cada dos semanas, cada tres semanas, una vez al mes o cada dos meses. Preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención se puede administrar repetidamente, por ejemplo, una vez a la semana o (una vez) cada dos semanas.

En la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento para su uso según la presente invención, el modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo se administran preferentemente aproximadamente al mismo tiempo.

"Aproximadamente al mismo tiempo", tal como se utiliza en el presente documento, significa en particular la administración simultánea o la administración del complejo directamente después de la administración del modulador de puntos de control inmunitarios o la administración del punto de control inmunitario directamente después de la administración del complejo. El experto en la materia entiende que "inmediatamente después" incluye el tiempo necesario para preparar la segunda administración, en particular el tiempo necesario para exponer y desinfectar el lugar para la segunda administración, así como la preparación adecuada del "dispositivo de administración" (por ejemplo, jeringa, bomba). La administración simultánea también incluye si los periodos de administración del modulador de puntos de control y del complejo se superponen o si, por ejemplo, un componente (modulador de puntos de control o complejo) se administra durante un periodo de tiempo más largo, tal como 30 min, 1 h, 2 h o incluso más, por ejemplo, mediante infusión, y el otro componente (modulador de puntos de control o complejo) se administra en algún momento durante dicho periodo largo. Se prefiere especialmente la administración del modulador de puntos de control inmunitarios y del complejo aproximadamente al mismo tiempo si se utilizan diferentes vías de administración y/o diferentes sitios de administración.

También se prefiere en la combinación del modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y del complejo que comprende un péptido de penetración celular, al menos un antígeno o epítipo antigénico y al menos un agonista peptídico de TLR como se describe en el presente documento para su uso según la presente invención que el modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo se administren consecutivamente. Por ejemplo, el modulador de puntos de control inmunitarios se administra preferentemente antes del complejo. También se prefiere que el modulador de puntos de control inmunitarios se administre después del complejo.

En la administración consecutiva, el tiempo entre la administración del primer componente (modulador de puntos de control o complejo) y la administración del segundo componente (el otro modulador de puntos de control y el complejo)

es preferentemente no más de una semana, más preferentemente no más de 3 días, incluso más preferentemente no más de 2 días y más preferentemente no más de 24 h. Se prefiere particularmente que el modulador de puntos de control y el complejo se administren el mismo día con el tiempo entre la administración del primer componente (el modulador de puntos de control del complejo) y la administración del segundo componente (el otro del modulador de puntos de control y el complejo) siendo preferentemente no más de 6 horas, más preferentemente no más de 3 horas, incluso más preferentemente no más de 2 horas y más preferentemente no más de 1 h.

Preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención y el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, es la cantidad que es suficiente para aliviar los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando y/o para la profilaxis de los síntomas de la enfermedad o afección que se está previniendo. En otras palabras, una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad del complejo y/o del modulador de puntos de control que es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva de una enfermedad o trastorno, es decir, una cantidad del complejo y/o del modulador de punto de control, que provoca la respuesta biológica o medicinal pretendida en un tejido, sistema, animal o humano. El término también incluye la cantidad del complejo y/o del modulador de puntos de control inmunitarios suficiente para reducir la progresión de la enfermedad, en particular para reducir o inhibir el crecimiento del tumor o la infección y provocar de ese modo la respuesta pretendida, en particular dicha respuesta podría ser una respuesta inmune dirigida contra los antígenos o epítopos antigénicos comprendidos en el complejo (es decir, una "cantidad eficaz para la inhibición"). Al mismo tiempo, sin embargo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es, de preferencia, lo suficientemente pequeña como para evitar efectos secundarios graves, es decir, para permitir una relación razonable entre ventaja y riesgo. La determinación de estos límites suele depender de un juicio médico sensato. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" del complejo y/o del modulador de puntos de control variará además en relación con la afección particular a tratar y también con la edad y el estado físico del paciente a tratar, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la actividad de los componentes específicos (modulador de puntos de control y complejo), 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 experiencia del médico tratante.

La dosis administrada, como dosis única o múltiple, a un individuo variará, por tanto, dependiendo de una variedad de factores, incluyendo propiedades farmacocinéticas, condiciones y características del sujeto (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), extensión de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia del tratamiento y efecto deseado.

Preferentemente, para el tratamiento del cáncer, la dosis terapéuticamente eficaz del complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención es de aproximadamente 0,001 mg a 10 mg, preferentemente de aproximadamente 0,01 mg a 5 mg, más preferentemente 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, preferentemente de 1 μ mol a 1 mmol por inyección. También se prefiere que la dosis terapéuticamente eficaz del complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención sea (por kg de peso corporal), en particular para el tratamiento del cáncer, de aproximadamente 0,01 mg/kg a 100 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,05 mg/kg a 50 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 25 mg/kg, incluso más preferentemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a 10 mg/kg y más preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a 5 mg/kg.

Preferentemente, la dosis terapéuticamente eficaz del modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención es (por kg de peso corporal), en particular para el tratamiento del cáncer, de aproximadamente 0,01 mg/kg a 100 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,05 mg/kg a 50 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 25 mg/kg, incluso más preferentemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a 15 mg/kg y más preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a 10 mg/kg.

El complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención y el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se pueden administrar mediante diversas vías de administración, por ejemplo, sistémica o localmente. Las vías para administración sistémica en general incluyen, por ejemplo, vías transdérmicas, orales y parenterales, que incluyen vías de administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica e intraperitoneal y/o vías de administración intranasal. Las vías de administración local en general incluyen, por ejemplo, vías de administración tópica, pero también la administración directamente en el lugar de la afección, tal como la administración intratumoral.

Preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención y el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se administran mediante una vía de administración parenteral. Más preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención y el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se administran por vía intravenosa, intratumoral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intranasal o intranodal. Aún más preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención y el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se administran por vía intravenosa y/o subcutánea. También es

más preferido que el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención y el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se administren por vía intradérmica y/o subcutánea.

5 Preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención y el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se administran a través de la misma vía de administración, preferentemente a través de la misma vía parenteral de administración, más preferentemente por vía intravenosa o subcutánea.

10 Sin embargo, es más preferido que el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención y el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se administren a través de distintas vías de administración, preferentemente a través de distintas vías de administración parenteral, más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se administra por vía intravenosa y el complejo comprendido por
15 la combinación para uso según la presente invención se administra por vía intratumoral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intranasal o intranodal, preferentemente el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención se administra por vía subcutánea. Aún más preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se administra por vía intravenosa y/o el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención se administra por vía
20 subcutánea o intradérmica.

El complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención y el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se pueden proporcionar en la misma composición o en composiciones distintas.

25 Preferentemente, el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención y el modulador de puntos de control inmunitarios comprendido por la combinación para uso según la presente invención se proporcionan en composiciones distintas. De este modo se pueden utilizar otros componentes diferentes, por ejemplo, pueden utilizarse diferentes vehículos para el complejo y para el modulador de punto de control. Además, el complejo
30 y el modulador de puntos de control inmunitarios se pueden administrar mediante diferentes vías de administración y las dosis (en particular la relación de las dosis) se pueden ajustar en función de las necesidades reales.

Sin embargo, también se prefiere que el modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo se proporcionen en la misma composición. Una composición de este tipo que comprende tanto el modulador de puntos de control
35 inmunitarios como el complejo se describe con más detalle a continuación ("composición según la presente invención").

Con independencia de si una composición comprende solo el modulador de puntos de control inmunitarios (y no el complejo), solo el complejo (y no el modulador de punto de control) o ambos, dicha composición puede ser una
40 composición farmacéutica y/o una composición de vacuna.

En particular, una composición tal, que comprende solo el modulador de puntos de control inmunitarios (y no el complejo), solo el complejo (y no el modulador de punto de control) o ambos, es preferentemente una composición (farmacéutica) que opcionalmente comprende un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable, o cualquier
45 excipiente, tampón, estabilizador u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia.

Como ingrediente adicional, la composición (farmacéutica) puede comprender en particular un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la presente invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable normalmente incluye la base líquida o no líquida de la composición (farmacéutica). Si la composición (farmacéutica) se proporciona en forma líquida, el vehículo normalmente será agua libre de pirógenos; solución salina isotónica o soluciones tamponadas (acuosas), por ejemplo, soluciones tamponadas con fosfato o citrato. En particular, para la inyección de la composición (farmacéutica), se puede usar agua o preferentemente un tampón, más preferentemente un tampón acuoso, que contenga una sal de sodio, preferentemente al menos 30 mM de una sal de sodio, una sal de calcio, preferentemente al menos 0,05 mM de una sal de calcio, y opcionalmente una sal de potasio, preferentemente
55 al menos 1 mM de una sal de potasio. Según una realización preferida, las sales de sodio, calcio y, opcionalmente, potasio pueden presentarse en forma de sus halogenuros, por ejemplo, cloruros, yoduros o bromuros, en forma de sus hidróxidos, carbonatos, hidrogeno carbonatos o sulfatos. Ejemplos de sales de sodio incluyen, por ejemplo, NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, ejemplos de sales de potasio opcionales incluyen, por ejemplo, KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄ y ejemplos de sales de calcio incluyen, por ejemplo, CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. Además, en el tampón pueden estar contenidos aniones orgánicos de los cationes mencionados anteriormente. Según una realización más preferida, el tampón adecuado para propósitos de inyección, tal como se define 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 además del cloruros. CaCl₂ también se puede sustituir por otra sal como KCl. Normalmente, las sales en el 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
65

hipotónico con respecto al medio de referencia específico, es decir, el tampón puede tener un contenido en sales mayor, idéntico o menor con respecto al medio de referencia específico, donde preferentemente pueden utilizarse concentraciones de las sales mencionadas anteriormente que no provoquen daños en las células debido a la ósmosis u otros efectos de concentración. Los medios de referencia son, por ejemplo, líquidos que se producen en métodos "in vivo", tales 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. Dichos tampones o líquidos comunes son conocidos por el experto en la materia. Se prefieren particularmente como base líquida solución salina (NaCl al 0,9%) y solución de Ringer-Lactato.

Preferentemente, la composición (farmacéutica), que comprende el modulador de puntos de control inmunitarios y/o el complejo como se describe en el presente documento, comprende además arginina, tal como L-arginina.

Sin embargo, también se pueden usar una o más cargas o diluyentes o compuestos encapsulantes sólidos o líquidos compatibles para la composición (farmacéutica), que son adecuados para la administración a un sujeto a tratar. El término "compatible" tal como se utiliza en el presente documento significa que estos constituyentes de la composición (farmacéutica) son capaces de mezclarse con el complejo según la presente invención como se definió anteriormente de tal manera que no se produzca ninguna interacción que reduciría sustancialmente la eficacia farmacéutica de la composición (farmacéutica) en condiciones de uso típicas. Los vehículos, cargas y diluyentes farmacéuticamente aceptables deben, por supuesto, tener una pureza suficientemente alta y una toxicidad suficientemente baja para que resulten adecuados para su administración a un sujeto a tratar. Algunos ejemplos de compuestos que pueden usarse como vehículos, cargas o constituyentes de los mismos farmacéuticamente aceptables son azúcares, tales como, por ejemplo, lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como por ejemplo almidón de maíz o almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa, acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; sebo; deslizantes sólidos tales como, por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, como por ejemplo aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles tales como, por ejemplo, polipropilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido alginico.

Como se ha descrito anteriormente, la composición (farmacéutica) se puede administrar por vía oral, parenteral, mediante aerosol para inhalación, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal o mediante un depósito implantado. El término parenteral tal como se utiliza en el presente documento incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardial, intraarterial y sublingual.

Preferentemente, la composición (farmacéutica) se puede administrar mediante inyección parenteral, más preferentemente mediante inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardial, intraarterial y sublingual o mediante técnicas de infusión. Las formas inyectables estériles de las composiciones (farmacéuticas) pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosas. Estas suspensiones se pueden formular según técnicas conocidas en la técnica 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 no tóxico aceptable parenteralmente, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluidos monoglicéridos 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 oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol 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. También se pueden usar otros tensioactivos comúnmente usados, 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 para los fines de formulación de la composición (farmacéutica).

Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el lugar de la afección, el ingrediente activo estará preferentemente en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tenga pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia son capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario. Tanto si se trata de un polipéptido, péptido o molécula de ácido nucleico u otro compuesto farmacéuticamente útil según la presente invención que se vaya a administrar a un individuo, la administración es preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio al individuo. La cantidad real administrada, así como la velocidad y el tiempo de administración dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando.

La composición (farmacéutica) como se describe en el presente documento también se puede administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye cápsulas, tabletas, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los vehículos comúnmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. Normalmente también se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsulas, 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 de carga transportadora inventiva como se define anteriormente, se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

La composición (farmacéutica) también se puede administrar por vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica, por ejemplo, incluidas enfermedades de la piel o de cualquier otro tejido epitelial accesible. Se preparan fácilmente formulaciones tópicas adecuadas para cada una de estas áreas u órganos. Para aplicaciones tópicas, la composición (farmacéutica) se puede formular en una pomada adecuada, que contenga la composición inmunoestimulante de la invención, particularmente sus componentes como se definen anteriormente, suspendidos o disueltos en uno o más vehículos. Los vehículos para administración tópica incluyen aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. De manera alternativa, la composición (farmacéutica) se puede formular en una loción o crema adecuada. En el contexto de la presente invención, los vehículos adecuados incluyen aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

En este contexto, la prescripción de tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación cuando se utiliza la composición (farmacéutica) anterior suelen ser responsabilidad de los médicos generales y otros médicos, y normalmente tiene en cuenta el trastorno a tratar, la condición del paciente individual, el lugar de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los profesionales médicos. Se pueden encontrar ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16ª edición, Osol, A. (ed), 1980.

Por consiguiente, la composición (farmacéutica) normalmente comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de los componentes de la composición (farmacéutica), en particular del complejo y/o del modulador de punto de control. La composición (farmacéutica) se puede utilizar para fines médicos humanos y también para fines médicos veterinarios, preferentemente para fines médicos humanos, como composición (farmacéutica) en general o como vacuna.

Las composiciones (farmacéuticas), en particular composiciones de vacunas o formulaciones según la invención, se pueden administrar como una formulación farmacéutica que puede contener el complejo como se describe en el presente documento y/o el modulador de puntos de control como se describe en el presente documento en cualquier forma descrita en el presente documento.

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

En el contexto de la presente invención, se puede medir la "eficacia" de un tratamiento en función de los cambios en el curso de una enfermedad en respuesta a un uso según 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 sin 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 realizarse mediante el espectro de patrones clínicos de respuesta antitumoral para agentes inmunoterapéuticos a través de nuevos criterios de respuesta inmune relacionados (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. Cancer Inst. 2010, 102(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 de patógenos multifuncionales. La evaluación preclínica puede incluir la resistencia a la infección después de la exposición a un patógeno infeccioso. El tratamiento de una enfermedad infecciosa puede medirse 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 composiciones de vacunas o formulaciones según la invención también se pueden administrar como una formulación farmacéutica que puede contener células presentadoras de antígeno cargadas con el complejo como se describe en el presente documento en cualquier forma descrita en el presente documento.

La vacuna y/o la composición según la presente invención también se pueden formular como composiciones

(farmacéuticas) y dosificaciones unitarias de las mismas, en particular junto con un adyuvante, material inmunomodulador, vehículo, diluyente o excipiente empleado convencionalmente como se ha descrito anteriormente y a continuación, y en dicha forma se puede emplear como sólidos, tales como comprimidos o cápsulas rellenas, o líquidos tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires o cápsulas rellenas con los mismos, todos para uso oral, o en forma de soluciones inyectables estériles para uso parenteral (incluyendo subcutáneo e intradérmico) mediante inyección o infusión continua.

En el contexto de la presente invención, en particular en el contexto de una composición (farmacéutica) y vacunas según la presente invención, las composiciones inyectables se basan típicamente en solución salina estéril inyectable o solución salina tamponada con fosfato u otros vehículos inyectables conocidos en la técnica. Dichas composiciones (farmacéuticas) y formas de dosificación unitaria de las mismas pueden comprender ingredientes en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y dichas formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del principio activo proporcional al intervalo de dosificación diaria previsto que se va a emplear.

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 policitídílico (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 de aminoalquilglucosamida (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).

Las composiciones, en particular composiciones farmacéuticas y vacunas, según la presente invención pueden ser formulaciones líquidas que incluyen suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes y elixires. Las composiciones también pueden formularse como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos que incluyen agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes. Los agentes de suspensión incluyen jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas. Los agentes emulsionantes incluyen lecitina, monooleato de sorbitán y acacia. Los conservantes incluyen p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico. Los agentes dispersantes o humectantes incluyen poli(etilenglicol), glicerol, albúmina de suero bovino, Tween®, Span®.

Las composiciones, en particular las composiciones farmacéuticas y vacunas según la presente invención, también pueden formularse como una preparación de depósito, que puede administrarse mediante implantación o inyección intramuscular.

Las composiciones, en particular las composiciones farmacéuticas y vacunas según la presente invención, también pueden ser composiciones sólidas, que pueden estar en forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional. Por ejemplo, los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales que incluyen agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, desintegrantes y agentes humectantes. Los agentes aglutinantes incluyen jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón y polivinilpirrolidona. Las cargas incluyen lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato cálcico y sorbitol. Los lubricantes incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol y sílice. Los desintegrantes incluyen almidón de patata y glicolato sódico de almidón. Los agentes humectantes incluyen lauril sulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse según métodos bien conocidos en la técnica.

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

Además, las composiciones, en particular las composiciones farmacéuticas y vacunas según la presente invención, pueden adaptarse para la administración por administración repetida.

Otros materiales, así como técnicas de procesamiento de formulaciones, que son útiles en el contexto de las composiciones, en particular las composiciones farmacéuticas y vacunas según la presente invención, o en el contexto de su preparación se describen en la Parte 5 de la obra de Remington "The Science and Practice of Pharmacy", 22ª Edición, 2012, University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Kit según la presente invención

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un kit, en particular un kit de partes, que comprende

- (i) un modulador de puntos de control inmunitarios y
- (ii) un complejo que comprende:

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

donde los componentes a) - c) que componen el complejo están unidos de forma covalente.

- 10 En particular, tal kit según la presente invención comprende (i) el modulador de puntos de control inmunitarios como se describe anteriormente (en el contexto de la combinación para uso según la presente invención) y (ii) el complejo como se describe anteriormente (en el contexto de la combinación para uso según la presente invención). En otras palabras, las realizaciones preferidas del modulador de puntos de control inmunitarios como se ha descrito anteriormente (en el contexto de la combinación para uso según la presente invención) también se prefieren en el kit
- 15 según la presente invención. Por consiguiente, en el kit según la presente invención también se prefieren realizaciones preferidas del complejo descrito anteriormente (en el contexto de la combinación para uso según la presente invención).

- 20 Los diversos componentes del kit se pueden empaquetar en uno o más recipientes. Los componentes anteriores pueden proporcionarse en forma liofilizada o seca o disueltos en un tampón adecuado. Por ejemplo, el kit puede comprender una composición (farmacéutica) que comprende el modulador de puntos de control inmunitarios como se describe anteriormente y una composición (farmacéutica) que comprende el complejo como se describe anteriormente, por ejemplo, con cada composición en un recipiente separado. El kit también puede comprender una composición (farmacéutica) que comprende tanto el modulador de puntos de control inmunitarios como el complejo como se ha
- 25 descrito anteriormente.

- 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 mencionados anteriormente y soluciones de lavado.

- 30 Además, el kit de partes según la presente invención puede contener opcionalmente instrucciones de uso. Preferentemente, el kit comprende además un prospecto o folleto de instrucciones para tratar una enfermedad tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, el cáncer, mediante el uso de una combinación del modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo.

- 35 Un kit de este tipo puede ser preferentemente para uso en medicina como se describe en el presente documento, en particular para uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer como se describe en el presente documento.

- 40 Además, la presente invención también proporciona un kit de vacunación para tratar, prevenir y/o estabilizar una enfermedad, por ejemplo, un cáncer o una enfermedad infecciosa, que comprende la composición farmacéutica que comprende el modulador de puntos de control inmunitarios como se describe en el presente documento y la composición farmacéutica, en particular la vacuna, que comprende el complejo como se describe en el presente documento (donde las composiciones farmacéuticas pueden ser iguales o diferentes) e instrucciones para uso de dicha composición farmacéutica o de dicha vacuna.

45 **Composición según la presente invención**

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona una composición que comprende

- 50 (i) un modulador de puntos de control inmunitarios y
- (ii) un complejo que comprende:
- a) un péptido de penetración celular;
 - b) al menos un antígeno o epítipo antigénico; y
 - 55 c) al menos un agonista peptídico de TLR,

donde los componentes a) - c) que componen el complejo están unidos de forma covalente.

- 60 En particular, dicha composición según la presente invención comprende (i) el modulador de puntos de control inmunitarios como se describe anteriormente (en el contexto de la combinación para uso según la presente invención) y (ii) el complejo como se describe anteriormente (en el contexto de la combinación para uso según la presente invención). En otras palabras, las realizaciones preferidas del modulador de puntos de control inmunitarios como se ha descrito anteriormente (en el contexto de la combinación para uso según la presente invención) también se prefieren en la composición según la presente invención. Por consiguiente, en la composición según la presente invención
- 65 también se prefieren realizaciones preferidas del complejo descrito anteriormente (en el contexto de la combinación para uso según la presente invención).

Además, anteriormente se describe una composición que comprende el modulador de puntos de control inmunitarios como se ha descrito anteriormente y el complejo como se ha descrito anteriormente y realizaciones preferidas de dicha composición (en el contexto de la combinación para uso según la presente invención). Se entiende que la misma descripción, en particular las mismas realizaciones preferidas descritas anteriormente para la composición, son de aplicación, por tanto, a la composición descrita en este caso.

Por consiguiente, la composición comprende preferentemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos preferidos de dicho vehículo farmacéuticamente aceptable son los descritos anteriormente.

También se prefiere que la composición comprenda al menos dos complejos diferentes. Además, una composición preferida comprende al menos dos moduladores de puntos de control inmunitarios diferentes.

Tal composición puede ser preferentemente para uso en medicina como se describe en el presente documento, en particular para uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer como se describe en el presente documento.

Además, se prefiere que la composición sea una vacuna.

Tal como se utiliza 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 en el presente documento típicamente conduce o apoya una respuesta inmune adaptativa en el paciente a tratar y el agonista peptídico de TLR del complejo como se define en el presente documento puede conducir a o apoyar una respuesta inmune.

La vacuna también puede comprender un portador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable como se define a continuación para la composición farmacéutica de la invención. En el contexto específico de la vacuna, la selección de un vehículo farmacéuticamente aceptable viene determinada, en principio, por la manera en que se administra la vacuna inventiva. La vacuna inventiva puede administrarse, por ejemplo, sistémica o localmente como se describe anteriormente. Más preferentemente, las vacunas pueden administrarse por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea o intramuscular. Por tanto, la vacuna se formula preferentemente en forma líquida (o a veces en forma sólida). La cantidad adecuada de vacuna a administrar puede determinarse mediante experimentos de rutina con modelos animales. Dichos modelos incluyen modelos de conejo, oveja, ratón, rata, perro y primates no humanos. Las formas de dosis unitarias preferidas para 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. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración tópica incluyen aquellos adecuados para su uso en lociones, cremas y geles. Si la vacuna inventiva se administra vía oral, las tabletas y cápsulas son la forma de dosis unitaria preferida. Vehículos farmacéuticamente aceptables para la preparación de formas de dosis unitarias que pueden usarse para la administración oral son bien conocidos en el estado de la técnica. La selección de estos 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 materia puede realizar sin dificultad.

La vacuna puede contener adicionalmente una o más sustancias auxiliares para aumentar aún más su inmunogenicidad. De este modo se consigue preferentemente un efecto sinérgico del complejo según la invención, tal como se ha definido anteriormente, y de una sustancia auxiliar que, en caso dado, puede estar contenida en la vacuna de la invención, tal como se ha descrito anteriormente. Dependiendo de los diversos tipos de sustancias auxiliares, a este respecto pueden tenerse en cuenta distintos mecanismos. Una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas son, por ejemplo, compuestos que permiten la maduración de las células dendríticas (DC), por ejemplo, lipopolisacáridos o TNF-alfa. 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) o citoquinas, como GM-CSF, que permiten una respuesta inmune producida por el adyuvante inmunoestimulante según la invención para su potenciación y/o para influenciarla de forma selectiva. Sustancias auxiliares especialmente preferidas son citoquinas, como monocinas, linfocinas, interleucinas o quimiocinas, que promueven aún más la respuesta inmune innata, como 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 son emulsionantes, tales como, por ejemplo, Tween®; agentes humectantes, por ejemplo, laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes, vehículos farmacéuticos; agentes formadores de tabletas; estabilizadores; antioxidantes; conservantes.

La vacuna inventiva 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 la vacuna, 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 preferentemente en forma de CpG-ARN, más preferentemente en forma de CpG-ARN monocatenario (CpG-ARNss). El CpG-ácido nucleico contiene preferentemente 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.

Preferentemente, la composición (farmacéutica), en particular la vacuna, como se describe anteriormente, es para uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos que incluyen, por ejemplo, cánceres, trastornos hematológicos, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunitarios y rechazos de trasplantes, siendo preferente el cáncer.

También se prefiere que la composición (farmacéutica), en particular la vacuna, sea para uso en el tratamiento de un sujeto, preferentemente un sujeto mamífero, y más preferentemente un sujeto humano, que padece una enfermedad o trastorno, en particular trastorno que puede tratarse mediante inmunoterapia, como cánceres, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunitarios y rechazos de trasplantes.

Molécula de ácido nucleico

En otro aspecto, la invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica el modulador de puntos de control inmunitarios según la presente invención como se describe anteriormente, donde el modulador de puntos de control inmunitarios es un (poli)péptido o una proteína, y/o que codifica el complejo según la presente invención como se ha descrito anteriormente, donde el complejo es un (poli)péptido o una proteína, en particular un (poli)péptido de fusión o una proteína de fusión. Más preferentemente, el ácido nucleico (molécula) codifica al menos un complejo ejemplificado como se describe en el presente documento o una variante de secuencia funcional del mismo. Por consiguiente, el ácido nucleico (molécula) comprende más preferentemente un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las SEQ ID NO: 26 - 32, o 41 - 45 o una secuencia de aminoácidos que comparte 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 - 32, o 41 - 45.

Ejemplos de moléculas de ácido nucleico y/o polinucleótidos incluyen, por ejemplo, un polinucleótido recombinante, un vector, un oligonucleótido, una molécula de ARN tal como un ARNr, un ARNm, un ARNm_i, un ARNsi, o un ARNt, o una molécula de ADN, tal como un ADNc.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, preferentemente a una molécula de ácido nucleico recombinante, es decir, una molécula de ácido nucleico que no se encuentra 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. 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, por ejemplo, a un complejo deseado según la presente invención como se describe anteriormente y/o una secuencia correspondiente, por ejemplo, a un modulador de puntos de control inmunitarios deseado según la presente invención como se describe anteriormente. 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 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. Preferentemente, 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. Preferentemente, un vector en el contexto de la presente solicitud es un vector plasmídico.

En particular, la presente invención proporciona un kit que comprende

- (i) una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un modulador de puntos de control inmunitarios, donde el modulador de puntos de control inmunitarios es un (poli)péptido o una proteína; y
- (ii) una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un complejo, comprendiendo el

complejo:

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

donde el complejo es un (poli)péptido o una proteína, en particular un (poli)péptido de fusión o una proteína de fusión.

En un kit de este tipo según la presente invención, los moduladores de puntos de control inmunitarios preferidos son los que se describen en el presente documento y los complejos preferidos son los que se describen en el presente documento.

Además, preferentemente, dicho kit también comprende un prospecto o folleto, por ejemplo, con instrucciones para expresar el modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo y/o para tratar el cáncer mediante el uso de una combinación del modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo.

Un kit de este tipo es preferiblemente para su uso en medicina, por ejemplo, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

Como se ha descrito anteriormente, la(s) molécula(s) de ácido nucleico en el kit se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en un vector como se describe anteriormente, tal como un vector de expresión; una molécula de ARN tal como un ARNr, un ARNm, un ARNmi, un ARNsi o un ARNt; o una molécula de ADN, tal como un ADNc.

En el kit según la presente invención, el modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo pueden estar codificados por la misma molécula de ácido nucleico o, preferiblemente, por moléculas de ácido nucleico distintas.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende

- (i) un polinucleótido que codifica un modulador de puntos de control inmunitarios, donde el modulador de puntos de control inmunitarios es un (poli)péptido o una proteína; y
- (ii) un polinucleótido que codifica un complejo, comprendiendo el complejo
 - a) un péptido de penetración celular
 - b) al menos un antígeno o epítipo antigénico; y
 - c) al menos un agonista peptídico TLR,

donde el complejo es un (poli)péptido o una proteína, en particular un (poli)péptido de fusión o una proteína de fusión.

En dicha molécula de ácido nucleico según la presente invención, los moduladores de puntos de control inmunitarios preferidos son los que se describen en el presente documento y los complejos preferidos son los que se describen en el presente documento. Además, la molécula de ácido nucleico se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un vector como se describe anteriormente, tal como un vector de expresión; una molécula de ARN tal como un ARNr, un ARNm, un ARNmi, un ARNsi o un ARNt; o una molécula de ADN, tal como un ADNc. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede ser un vector de expresión o una molécula de ARN, por ejemplo, una molécula de ARNm, que codifica el complejo y el inhibidor de puntos de control inmunitarios de forma bistrónica.

Además, la presente invención también proporciona una composición que comprende

- (i) una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un modulador de puntos de control inmunitarios, donde el modulador de puntos de control inmunitarios es un (poli)péptido o una proteína; y
- (ii) una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un complejo, comprendiendo el complejo:
 - a) un péptido de penetración celular;
 - b) al menos un antígeno o epítipo antigénico; y
 - c) al menos un agonista peptídico de TLR,

donde el complejo es un (poli)péptido o una proteína, en particular un (poli)péptido de fusión o una proteína de fusión.

En dicha composición según la presente invención, los moduladores de puntos de control inmunitarios preferidos son los que se describen en el presente documento y los complejos preferidos son los que se describen en el presente documento. Además, la(s) molécula(s) de ácido nucleico se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en un vector como se describe anteriormente, tal como un vector de expresión; una molécula de ARN tal como un ARNr, un ARNm, un ARNmi, un ARNsi o un ARNt; o una molécula de ADN, tal como un ADNc.

La composición también puede comprender componentes adicionales, por ejemplo, los descritos anteriormente para

una composición (farmacéutica) según la presente invención que comprende el complejo y/o el inhibidor de puntos de control como se describe en el presente documento.

Método y terapia de combinación

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para tratar a un sujeto, preferentemente un sujeto mamífero, y más preferentemente un sujeto humano, que padece una enfermedad o trastorno, en particular un trastorno que puede tratarse mediante inmunoterapia, tal como cánceres, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunes y rechazos de trasplantes, que comprende administrar al sujeto

- (i) un modulador de puntos de control inmunitarios y
- (ii) un complejo que comprende:

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

donde los componentes a) - c) comprendidos por el complejo están unidos de forma covalente.

En particular, la presente descripción proporciona un método para tratar el cáncer o iniciar, mejorar o prolongar una respuesta antitumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto

- (i) un modulador de puntos de control inmunitarios y
- (ii) un complejo que comprende:

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

donde los componentes a) - c) comprendidos por el complejo están unidos de forma covalente.

En términos más generales, la presente invención se puede aplicar a cualquier sujeto que padezca cualquier enfermedad o trastorno, dependiendo de la especificidad en particular del al menos un antígeno o epítipo antigénico comprendido por el complejo comprendido por la combinación para uso según la presente invención. En particular, el efecto terapéutico del complejo puede ser provocar una respuesta inmune dirigida contra dichos antígenos o epítipos antigénicos, en particular una respuesta que depende de células T helper CD4+ y/o células T citotóxicas CD8+ y/o que está restringida por moléculas de MHC de clase I y/o moléculas de MHC de clase II y el efecto terapéutico del modulador de puntos de control puede ser permitir o potenciar tal efecto del complejo.

Preferentemente, los sujetos según la invención son sujetos que padecen un cáncer, por ejemplo, un cáncer de cerebro, colon, cabeza o cuello, o un cáncer de cuello uterino. Más preferentemente, los sujetos según la invención son sujetos que padecen un cáncer cerebral que incluye glioma.

También se prefiere que los sujetos según la invención hayan sido sometidos a una extirpación quirúrgica de un tumor.

Alternativamente, los sujetos según la invención pueden ser preferentemente sujetos que padecen una enfermedad infecciosa.

En un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona una terapia de combinación para prevenir y/o tratar el cáncer, donde la terapia de combinación comprende la administración de

- (i) un modulador de puntos de control inmunitarios y
- (ii) un complejo que comprende:

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

donde los componentes a) - c) comprendidos por el complejo están unidos de forma covalente.

Las realizaciones preferidas de dicha terapia de combinación son realizaciones preferidas del complejo como se describe anteriormente, realizaciones del modulador de puntos de control como se describe anteriormente y/o, más en general, realizaciones preferidas de la combinación para uso según la presente invención. El kit según la presente invención y la composición (farmacéutica), en particular la vacuna, según la presente invención se pueden utilizar en la terapia de combinación. Los sujetos a tratar con dicha terapia de combinación son los mismos que se describen en el presente documento y las enfermedades a prevenir y/o tratar son las mismas que se describen en el presente

documento, en el contexto de la combinación para uso según la presente invención.

Breve descripción de las figuras

5 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, el crecimiento tumoral (A) y la tasa de supervivencia (B) de 7 ratones por grupo (media \pm SEM). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo. Se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + Isotipo" y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" dos veces (d5 y d13) por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 μ g de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 5, 9 y 13 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1". Para el control, se administraron i.p. 200 μ g de isotipo 2A3 en cada uno de los días 5, 9 y 13 a ratones de los grupos "isotipo" e "isotipo Z13Mad5Anaxa+". El tamaño del tumor se midió con un calibrador; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.
- Figura 2: muestra, para el Ejemplo 2, el crecimiento tumoral de 8 ratones por grupo (media \pm SEM). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo. Se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + Isotipo" y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" dos veces (d5 y d13) por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 μ g de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 5, 9 y 13 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1". Para el control, se administraron i.p. 200 μ g de isotipo 2A3 en cada uno de los días 5, 9 y 13 a ratones de los grupos "isotipo" e "isotipo Z13Mad5Anaxa+". El tamaño del tumor se midió con un calibrador.
- Figura 3: muestra, para el Ejemplo 2, el porcentaje de células positivas para multímeros (en % de células T CD8) en el sitio del tumor (células infiltrantes de tumores, TIL) para los diferentes grupos experimentales (A) y una correlación de células positivas para multímeros (en % de células T CD8) en el sitio del tumor (TIL) con el tamaño del tumor (B); **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.
- Figura 4: muestra, para el Ejemplo 2, el porcentaje de MDSC granulocíticas (en % de células CD45+CD11b+) para los diferentes grupos experimentales en bazo (A) y TIL (B); *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.
- Figura 5: muestra, para el Ejemplo 2, la correlación de MDSC granulocíticas (en % de células CD45+CD11b+) con el tamaño del tumor para los diferentes grupos experimentales en bazo (A) y TIL (B).
- Figura 6: muestra, para el Ejemplo 3, el crecimiento tumoral de ratones tratados con anti-PD1 y Z13Mad5Anaxa en distintos protocolos de tratamiento. (A) Ratones tratados con anti-PD1 y Z13Mad5Anaxa según el protocolo del Ejemplo 1. (B) Crecimiento tumoral de ratones tratados con anti-PD1 solo después de finalizar la vacunación con Z13Mad5Anaxa. ****, $p < 0,0001$.
- Figura 7: muestra, para el Ejemplo 4, el porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEKL en sangre (A) y el porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEKL en BIL (B). La Figura 7C muestra un resumen del porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEKL en sangre y BIL. Se implantaron intracranalmente a ratones C57BL/6 5×10^5 células tumorales GI261-Quad el día 0. Después de la implantación del tumor, se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + Isotipo" y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" los días 7 y 21 por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 μ g de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 7, 10, 14, 17 y 21 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1". Para el control, se administraron i.p. 200 μ g del isotipo mAB 2A3 en cada uno de los días 7, 10, 14, 17 y 21 a ratones de los grupos "isotipo" e "isotipo Z13Mad5Anaxa+". Se cuantificaron células T CD8 específicas de SIINFEKL en sangre y en leucocitos infiltrantes del cerebro (BIL) el día 28 mediante tinción multimérica (5-8 ratones por grupo); *, $p < 0,05$.
- Figura 8: muestra, para el Ejemplo, 4 el porcentaje de células productoras de IFN- γ (% de células T CD8) en BIL (A) y un resumen de células productoras de IFN- γ y/o TNF α (% de células T CD8) en BIL (B) después de estimulación con péptidos SIINFEKL durante 6 h; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.
- Figura 9: muestra, para el Ejemplo 5, la tasa de supervivencia de los ratones. Se implantaron intracranalmente a ratones C57BL/6 5×10^5 células tumorales GI261-Quad el día 0. Después de la implantación del tumor, se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + Isotipo" y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" los días 7, 21 y 35 por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 μ g de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 7, 10, 14, 17 y 21 a ratones del grupo "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1". Para el control, se administraron i.p. 200 μ g del isotipo mAB 2A3 en cada uno de los días 7, 10, 14, 17 y 21 a ratones de los grupos "isotipo" e "isotipo Z13Mad5Anaxa+". En los días 7 y 21, cuando se administraron tanto Z13Mad5Anaxa como el anticuerpo, el anticuerpo se administró i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad5Anaxa. Los ratones se pesaron diariamente y se

sacrificaron cuando la pérdida de peso fue superior al 15 %; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Figura 10: muestra, para el Ejemplo 6, el número de metástasis. Se implantaron vía i.v. a ratones C57BL/6 con 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA el día 0. Después de la implantación del tumor, se vacunaron ratones del grupo "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" ("Vacuna + anti-PD1") los días 0 y 10 por inyección subcutánea de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 µg de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 0, 3 y 7 a ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" ("Vacuna + anti-PD1") y "anti-PD1". Para el control, se administraron i.p. 200 µg del isotipo mAB 2A3 en cada uno de los días 0, 3 y 7 a ratones del grupo "isotipo". Los ratones fueron sacrificados el día 17 y se recuperaron los pulmones. Se contó el número de focos de metástasis en cada pulmón. **, $p < 0,01$ (prueba T no pareada).

Figura 11: muestra, para el Ejemplo 7, el crecimiento tumoral en el modelo de tumor EG7. Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 (5-6 ratones por grupo) 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, se vacunaron ratones del grupo "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 ip" los días 5 y 13 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 100 µg de anticuerpo anti-CTLA4 en cada uno de los días 5 y 13 a ratones de los grupos "aCTLA4 ip" y "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 ip". En el grupo "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 ip" el anticuerpo se administró i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad5Anaxa. Para el control, se administraron i.p. 100 µg del isotipo mAB MPC-11 en cada uno de los días 5 y 13 a ratones del grupo "control". El tamaño del tumor se midió con un calibrador. (A) Resumen de todos los grupos experimentales. (B) Crecimiento tumoral en cada ratón del grupo de control. (C) Crecimiento tumoral en cada ratón del grupo anti-CTLA4 solo. (D) Crecimiento tumoral en cada ratón del grupo Z13Mad5Anaxa + aCTLA4. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Figura 12: muestra, para el Ejemplo 8, el efecto de la vía de administración sobre el crecimiento tumoral en el modelo de tumor EG7. Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 (5-6 ratones por grupo) 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 ip" y "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 sc" en los días 5 y 13 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 100 µg de anticuerpo anti-CTLA4 en cada uno de los días 5 y 13 a ratones del grupo "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 ip" justo después de la administración s.c. de Z13Mad5Anaxa. En el grupo "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 sc" en cada uno de los días 5 y 13 se administraron s.c. 100 µg de anticuerpo anti-CTLA4 en el mismo sitio que Z13Mad5Anaxa 1 h después de la inyección de Z13Mad5Anaxa. Para el control, se administraron i.p. 100 µg del isotipo mAB MPC-11 en cada uno de los días 5 y 13 a ratones del grupo "control". El tamaño del tumor se midió con un calibrador. (A) Resumen de todos los grupos experimentales. (B) Crecimiento tumoral en cada ratón del grupo de control. (C) Crecimiento tumoral en cada ratón del grupo Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 sc. (D) Crecimiento tumoral en cada ratón del grupo Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 ip. **, $p < 0,01$.

Figura 13: muestra, para el Ejemplo 9, el efecto de una combinación de un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR y un inhibidor de CTLA4 en el modelo de tumor CT26. Se implantaron s.c. a ratones BALB/c (5 a 6 ratones por grupo) 2×10^5 células tumorales CT26 en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, se vacunaron ratones del grupo "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4" los días 3 y 9 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad8Anaxa en el flanco derecho y se administraron i.p. en cada uno de los días 3, 6 y 9 (en los días 3 y 9 justo después de la administración sc de Z13Mad8Anaxa). En el grupo de control, se administraron i.p. 100 µg del isotipo mAB MPC-11 en cada uno de los días 3, 6 y 9 a ratones del grupo "control". El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

Figura 14: muestra, para el Ejemplo 10, el efecto de una combinación de un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR, un inhibidor de PD1 y un inhibidor de CTLA4. Se implantaron s.c. a ratones BALB/c (5 a 6 ratones por grupo) 2×10^5 células tumorales CT26 en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4" y "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4/aPD1" en los días 3 y 9 por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad8Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 µg de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 3, 6 y 9 a ratones de los grupos "aCTLA4/aPD1" y "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4/aPD1". Se administraron i.p. 100 µg de anticuerpo anti-CTLA4 en cada uno de los días 3, 6 y 9 a los grupos "aCTLA4/aPD1", "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4" y "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4/aPD1". En los días 3 y 9, cuando se administraron Z13Mad8Anaxa y anticuerpos, los anticuerpos se administraron i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad8Anaxa. En el grupo de control, se administraron i.p. 100 µg de isotipo mAB MPC-11 y 200 µg de isotipo 2A3 en cada uno de los días 3, 6 y 9 a ratones del grupo "control". El tamaño del tumor se midió con un calibrador. (A) Resumen de todos los grupos experimentales. (B) Crecimiento tumoral en cada ratón del grupo de control. (C) Crecimiento tumoral en cada ratón del grupo Z13Mad8Anaxa + aCTLA4. (D) Crecimiento tumoral en cada ratón del grupo aCTLA4/aPD1. (E) Crecimiento tumoral en cada ratón del grupo Z13Mad8Anaxa + aCTLA4/aPD1.

- Figura 15: muestra, para el Ejemplo 11, el efecto de una combinación de un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR, un agonista de CD40. Se vacunaron ratones C57BL/6 (4 ratones por grupo) los días 0, 14, 28 y 42 por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron s.c. 100 µg de anticuerpo anti-CD40 en los días 0 y los días 0 y 14 a ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + aCD40 en vac1" y "Z13Mad5Anaxa + aCD40 en vac1 y vac2" respectivamente. (A) El porcentaje de células positivas para multímeros (en % de células T CD8) para los diferentes grupos experimentales. (B) El porcentaje de células positivas para KLRG1 entre las células positivas para multímeros. Todos los grupos son significativamente diferentes en comparación con el grupo de control sin tratamiento previo. *, $p < 0,05$.
- Figura 16: muestra, para el Ejemplo 11, (A) la cantidad de células T CD8 específicas de SIINFEKL que producen IFN-γ (ensayo de Elispot) y (B) los resultados de una tinción intracelular de esplenocitos para IFN-γ, CD107 y TNFα para células T CD8 específicas de SIINFEKL.
- Figura 17: muestra, para el Ejemplo 11, los gráficos FACS de la tinción intracelular de esplenocitos para IFN-γ, CD107 y TNFα.
- Figura 18: muestra, para el Ejemplo 12, el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media ± SEM); *, $p < 0,05$ EDZ13Mad5 versus grupo de control (prueba de Anova de 2 vías). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 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 EDZ13Mad5, 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 19: muestra, para el Ejemplo 12, las curvas de crecimiento tumoral individuales (7 ratones individuales por grupo). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 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 EDZ13Mad5, 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 20: muestra, para el Ejemplo 12, A) la curva de supervivencia de 7 ratones por grupo; *, $p < 0,05$ para EDZ13Mad5 versus grupo de 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).
- Figura 21: muestra, para el Ejemplo 13, el efecto de los complejos con diferentes CPP en la respuesta inmune. Se vacunaron ratones C57BL/6 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 ratones sin tratamiento previo en cada punto de tiempo, excepto después de Vac2 para los ratones vacunados con Z18Mad5Anaxa.
- Figura 22: muestra, para el Ejemplo 14, 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). Se vacunaron ratones C57BL/6 cinco veces (Wk0, Wk2, Wk4, Wk6 y Wk8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa. Nueve días después de la 5ª vacunación, se sacrificaron los ratones, se recuperaron los órganos y se realizó la tinción multimérica.
- Figura 23: muestra, para el Ejemplo 14, el efecto de los complejos con diferentes CPP en las células T del bazo (respuesta de células T CD8 (A) y respuesta de células T CD4 (B)). Se vacunaron ratones C57BL/6 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 del bazo estimuladas con el péptido OVACD4).
- Figura 24: muestra, para el Ejemplo 14, el efecto de los complejos con diferentes CPP en la función efectora de las células T CD8. Se vacunaron ratones C57BL/6 cinco veces (Wk0, Wk2, Wk4, Wk6 y Wk8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa. Nueve días después de la 5ª vacunación, se realizó la tinción intracelular en células de bazo estimuladas con el péptido SIINFEKL OVACD8.
- Figura 25: muestra, para el Ejemplo 15, el efecto de los complejos con diferentes CPP en el crecimiento tumoral (A) y las tasas de supervivencia (B). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) por inyección s.c. de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa en el flanco derecho. (A) Crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media ± SEM); *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,0001$ (prueba 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 26: muestra, para el Ejemplo 16, el efecto de los complejos con diferentes CPP en la respuesta inmune. Se vacunaron ratones C57BL/6 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 27: muestra, para el Ejemplo 17, el efecto de EDAZ14Mad5 en el crecimiento tumoral (A) y las tasas de supervivencia (B). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) por inyección s.c. 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 28: muestra, para el Ejemplo 18, el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 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. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.
- Figura 29: muestra, para el Ejemplo 18, las curvas de crecimiento tumoral individuales (7 ratones individuales por grupo). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 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) s.c. en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.
- Figura 30: muestra, para el Ejemplo 18, la curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 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).
- Figura 31: muestra, para el Ejemplo 19, el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 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, EDAZ13Mad5, 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 Anova de 2 vías el día 23).
- Figura 32: muestra, para el Ejemplo 19, las curvas de crecimiento tumoral individuales (7 ratones individuales por grupo). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 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, EDAZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa, Z13Mad5EDA o Z13Mad5 y MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho.
- Figura 33: muestra, para el Ejemplo 19, 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 de rango logarítmico).
- 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 i.c. a ratones C57BL/6 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y d21) por inyección s.c. 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 el d28 mediante tinción multimérica (7-16 ratones por grupo).
- Figura 35: muestra, para el Ejemplo 20, la secreción de citoquinas. En resumen, se implantaron i.c. a ratones C57BL/6, 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y d21) por inyección s.c. 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 el péptido SIINFEKL en presencia de Brefeldin A antes de la tinción intracelular para citoquinas. % de células T CD8 que secretan citoquinas (7-16 ratones por grupo).
- Figura 36: muestra, para el Ejemplo 21, la cuantificación de células T CD8 específicas de SIINFEKL en ratones sin tratamiento previo. En resumen, se vacunaron ratones C57BL/6 una vez (día 0) por inyección s.c. 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 37: muestra, para el Ejemplo 22, el crecimiento tumoral (A) y la tasa de supervivencia (B) de 7 ratones por grupo (media \pm SEM). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 2×10^5 células tumorales MC-38 en el flanco

izquierdo. Se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad12Anaxa" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1" 3 veces (d3, d10 y d17) por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad12Anaxa en la base de la cola. Se administraron i.p. 200 µg de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 6, 10, 13, 17, 20, 24, 27 y 31 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1". El tamaño del tumor se midió con un calibrador. Para cada curva de crecimiento tumoral se indica el número de ratones sin tumores de cada grupo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

Figura 38: muestra, para el Ejemplo 22, curvas de crecimiento tumoral individuales de 7 ratones por grupo. Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 2×10^5 células tumorales MC-38 en el flanco izquierdo. Se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad12Anaxa" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1" 3 veces (d3, d10 y d17) por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad12Anaxa en la base de la cola. Se administraron i.p. 200 µg de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 6, 10, 13, 17, 20, 24, 27 y 31 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1". El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

Figura 39: muestra, para el Ejemplo 23, el crecimiento tumoral (A) y la tasa de supervivencia (B) de 13 a 14 ratones por grupo (media \pm SEM). Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 2×10^5 células tumorales MC-38 en el dorso. Se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad12Anaxa" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1" 3 veces (d3, d10 y d17) por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad12Anaxa en la base de la cola. Se administraron i.p. 200 µg de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 6, 10, 13, 17, 20, 24 y 27 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1". El tamaño del tumor se midió con un calibrador. Para cada curva de crecimiento tumoral se indica el número de ratones sin tumores de cada grupo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ****, p<0,0001.

Figura 40: muestra, para el Ejemplo 23, curvas de crecimiento de tumores individuales de 13 a 14 ratones por grupo. Se implantaron s.c. a ratones C57BU6 con 2×10^5 células tumorales MC-38 en el dorso. Se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad12Anaxa" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1" 3 veces (d3, d10 y d17) por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad12Anaxa en la base de la cola. Se administraron i.p. 200 µg de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 6, 10, 13, 17, 20, 24 y 27 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1". El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

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 aquí descritas. 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: efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre el crecimiento tumoral y la tasa de supervivencia

Para evaluar los efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR en el tratamiento del cáncer, se usó el modelo tumoral E.G7. E.G7 es un transfectante OVA derivado de la línea celular de timoma EL4.

Con este fin, se proporcionó "Z13Mad5Anaxa", que es un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR tal como se describe en el presente documento. En concreto, "Z13Mad5Anaxa" es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", la carga antigénica "MADS" que comprende epítetos OVA-CD4+, gp100-CD8+, Ealpha-CD4+ y OVA-CD8+ y el agonista peptídico de TLR "Anaxa". A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de Z13Mad5Anaxa con el péptido de penetración celular "Z13" subrayado y el agonista peptídico de TLR "Anaxa" en cursiva:

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

Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 (siete ratones por grupo) 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + Isotipo"

y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" en los días 5 y 13 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 µg del anticuerpo anti-PD1 RMP1-14 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) en cada uno de los días 5, 9 y 13 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1". Para el control, se administraron i.p. 200 µg del isotipo mAB 2A3 en cada uno de los días 5, 9 y 13 a ratones de los grupos "isotipo" e "isotipo Z13Mad5Anaxa+". En los días 5 y 13, cuando se administraron tanto Z13Mad5Anaxa como anticuerpo, el anticuerpo se administró i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad5Anaxa. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

Como se muestra en la Figura 1, el tratamiento con el inhibidor de PD1 solo o con Z13Mad5Anaxa solo dio como resultado una reducción significativa del volumen del tumor (Fig. 1A) y una mayor supervivencia (Fig. 1B) en comparación con el grupo de control ("isotipo"). Sin embargo, la combinación de ambos, el inhibidor de PD1 y Z13Mad5Anaxa, produjo la mejora más pronunciada, a saber, una fuerte disminución del volumen del tumor y un fuerte aumento de las tasas de supervivencia. Estos datos muestran que la combinación de ambos, la terapia anti-PD1 y la vacunación con Z13Mad5Anaxa es más eficaz que la terapia anti-PD1 sola o la vacunación con Z13Mad5Anaxa sola. Por tanto, estos resultados indican un efecto sinérgico de la terapia anti-PD1 y la vacunación con Z13Mad5Anaxa.

Ejemplo 2: efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre el análisis de células T en el sitio tumoral E.G7 y sobre las MDSC

Para evaluar los efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre el análisis de las células T en el sitio del tumor y sobre las MDSC (células supresoras derivadas de mieloides), el experimento anterior (Ejemplo 1) se repitió con 8 ratones por grupo y el día 22, los ratones fueron sacrificados y se realizó tinción FACS para monitorizar la respuesta inmune específica de OVA y el microambiente tumoral en el bazo y los TIL (linfocitos infiltrantes de tumores).

La Figura 2 muestra el crecimiento tumoral en los grupos experimentales (mismo método experimental que en el Ejemplo 1). De nuevo, el tratamiento con el inhibidor de PD1 solo o con Z13Mad5Anaxa solo dio como resultado una reducción significativa del volumen del tumor (Fig. 2) en comparación con el grupo de control ("isotipo"). Sin embargo, la combinación de ambos, el inhibidor de PD1 y Z13Mad5Anaxa, produjo la mejora más pronunciada, a saber, una fuerte disminución del volumen del tumor y un fuerte aumento de las tasas de supervivencia. Por consiguiente, estos datos están en consonancia con los resultados del Ejemplo 1 (véase la Fig. 1A). Por lo tanto, los datos confirman que una combinación de ambos, la terapia anti-PD1 y la vacunación con Z13Mad5Anaxa es más eficaz que la terapia anti-PD1 sola o la vacunación con Z13Mad5Anaxa sola e indican un efecto sinérgico de la terapia anti-PD1 y la vacunación Z13Mad5Anaxa.

La Figura 3 muestra el porcentaje de células positivas para multímeros (en % de células T CD8) en el sitio del tumor (TIL) para los diferentes grupos experimentales (Fig. 3A) y una correlación de células positivas para multímeros (en % de Células T CD8) entre los TIL con tamaño de tumor (Fig. 3B). Estos datos muestran que las células T específicas de antígeno se acumulan en el sitio del tumor en ratones vacunados. El porcentaje más bajo de células positivas para multímeros se encontró en ratones de control y en ratones que fueron tratados solo con anti-PD1 (grupo "anti-PD1"). En ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa, el porcentaje de células positivas para multímeros aumentó significativamente, observándose el aumento más fuerte y pronunciado en ratones tratados con Z13Mad5Anaxa y anti-PD1. Además, se observó una correlación inversa significativa entre el porcentaje de células positivas para multímeros (en % de células T CD8) y el tamaño del tumor, es decir, cuanto mayor es el porcentaje de células positivas para multímeros (en % de células T CD8), menor el tumor.

La Figura 4 muestra el porcentaje de MDSC granulocíticas (en % de células CD45+CD11b+) para los diferentes grupos experimentales en bazo (Fig. 4A) y TIL (Fig. 4B). El mayor porcentaje de MDSC granulocíticas (en % de células CD45+CD11b+) se observó para el grupo de control ("isotipo") en la periferia (bazo) y en el sitio del tumor (TIE). Se observaron porcentajes significativamente más bajos de MDSC granulocíticas (en % de células CD45+CD11b+) en todos los demás grupos experimentales, con la disminución más acusada y pronunciada de MDSC granulocíticas observada en ratones tratados con Z13Mad5Anaxa y anti-PD1. La Figura 5 muestra una correlación significativa entre el porcentaje de MDSC granulocíticas (en % de células CD45+CD11b+) y el tamaño del tumor para los diferentes grupos experimentales en bazo (Fig. 5A) y TIL (Fig. 5B).

Tomados en conjunto, los presentes datos de células T y MDSC respaldan firmemente el efecto sinérgico de una combinación de terapia anti-PD1 y vacunación con Z13Mad5Anaxa observado para el crecimiento tumoral y la tasa de supervivencia.

Ejemplo 3: efecto del régimen de tratamiento con una combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre el crecimiento tumoral

Para evaluar los efectos del régimen de tratamiento con una combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR en el tratamiento

del cáncer, se usó de nuevo el modelo tumoral E.G7.

En un primer grupo experimental "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1", el inhibidor de PD1 y Z13Mad5Anaxa se administraron como se describe en el Ejemplo 1. En resumen, se implantaron ratones C57BL/6 (seis-siete ratones por grupo) s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, los ratones fueron vacunados los días 5 y 13 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 µg del anticuerpo anti-PD1 RMP1-14 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) en cada uno de los días 5, 9 y 13. En el grupo de control respectivo, se administraron i.p. 200 µg del isotipo mAB 2A3 en cada uno de los días 5, 9 y 13. En los días 5 y 13, cuando se administraron tanto Z13Mad5Anaxa como anticuerpo, el anticuerpo se administró i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad5Anaxa.

En un segundo grupo experimental "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" se administraron el inhibidor de PD1 y Z13Mad5Anaxa de la siguiente manera: se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 (seis-siete ratones por grupo) 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, los ratones fueron vacunados los días 5 y 13 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho, como en el primer grupo experimental. Sin embargo, a diferencia del primer grupo experimental, en el segundo grupo experimental se administraron i.p. 200 µg del anticuerpo anti-PD1 RMP1-14 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) en cada uno de los días 17 y 20. En otras palabras, el tratamiento anti-PD1 comenzó solo después del final del tratamiento con Z13Mad5Anaxa. En el grupo de control respectivo, se administraron i.p. 200 µg del isotipo mAB 2A3 en cada uno de los días 17 y 20.

Los resultados se muestran en la Figura 6, con la Fig. 6A mostrando el crecimiento del tumor en el primer grupo experimental (protocolo según el Ejemplo 1) y el grupo de control respectivo y la Fig. 6B mostrando el crecimiento del tumor en el segundo grupo experimental (el tratamiento anti-PD1 solo se inició después de finalizar el tratamiento con Z13Mad5Anaxa) y el grupo de control respectivo. Como puede deducirse de la Figura 6, el último protocolo de tratamiento, en el que el tratamiento anti-PD1 solo se inició después de finalizar el tratamiento con Z13Mad5Anaxa, dio como resultado una ligera mejora (crecimiento tumoral ligeramente disminuido, véase la Figura 6B), mientras que la "combinación verdadera" de anti-PD1 y Z13Mad5Anaxa (protocolo como en el Ejemplo 1, véase la figura 6A) dio como resultado una mejora considerablemente mayor, es decir, una disminución muy pronunciada del crecimiento del tumor.

Estos datos respaldan aún más el efecto sinérgico de una combinación de terapia anti-PD1 y vacunación con Z13Mad5Anaxa observado en los Ejemplos anteriores, ya que el efecto fue mucho menor cuando la terapia anti-PD1 solo se inició después de finalizar la vacunación con Z13Mad5Anaxa.

Ejemplo 4: efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre el análisis de células T en el sitio del tumor en un modelo de glioblastoma

Para investigar los efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR en un modelo de tumor diferente (distinto del modelo E.G7 usado en los Ejemplos 1 - 3), se utilizó un modelo de glioblastoma murino. Así, se realizó el análisis de células T en el sitio del tumor en ratones portadores de tumores GL261-Quad vacunados dos veces (semana 1 y semana 3 después de la implantación del tumor) con la vacuna Z13Mad5Anaxa y tratados o no con anti-PD1. En la semana 4, se analizaron la sangre y los leucocitos infiltrantes del cerebro (BIL).

En particular, se implantaron intracranalmente a ratones C57BL/6 5×10^5 células tumorales GL261-Quad el día 0. Después de la implantación del tumor, los ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + Isotipo" y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" fueron vacunados los días 7 y 21 por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 µg del anticuerpo anti-PD1 RMP1-14 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) en cada uno de los días 7, 10, 14, 17 y 21 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1". Para el control, se administraron i.p. 200 µg del isotipo mAB 2A3 en cada uno de los días 7, 10, 14, 17 y 21 a ratones de los grupos "isotipo" e "isotipo Z13Mad5Anaxa+". En los días 7 y 21, cuando se administraron tanto Z13Mad5Anaxa como anticuerpo, el anticuerpo se administró i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad5Anaxa. Se cuantificaron las células T CD8 específicas de SIINFEKL en sangre y en leucocitos infiltrantes del cerebro (BIL) el día 28 mediante tinción multimérica (5-8 ratones por grupo).

Los resultados se muestran en la Figura 7 con el porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEKL en sangre mostrado en la Fig. 7A y el porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEKL en BIL mostrado en la Fig. 7B. La Figura 7C muestra un resumen del porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEKL en sangre y BIL. Como se observó anteriormente, se cuantificó una baja frecuencia de células T CD8 específicas de SIINFEKL en sangre. Sin embargo, se observó un mayor porcentaje de células T CD8 específicas de SIINFEKL en la sangre de ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa tratados o no con anti-PD1. En todos los grupos hubo una acumulación sensiblemente mayor de células T CD8 específicas de SIINFEKL en los BIL que en la sangre. Es importante destacar que la terapia anti-PD1 fue capaz de aumentar la frecuencia de células T CD8 específicas al 42 % sin vacunación e incluso al 61 % cuando se combinó con la vacunación con Z13Mad5Anaxa, lo que sugiere de nuevo un efecto sinérgico de la

vacunación y la terapia anti-PD1.

Además, también se evaluó el porcentaje de células productoras de citoquinas. Para ello, se tiñeron citoquinas intracelulares tras una reestimulación con el péptido SIINFEKL durante 6 horas en presencia de Brefeldin A (GolgiPlug, BD Biosciences) con mAb para IFN- γ (XMGI.2), factor de necrosis tumoral (MP6-XT22) y controles de isotipo correspondientes (BD Biosciences).

Los resultados se muestran en la Figura 8 con el porcentaje de células productoras de IFN- γ (% de células T CD8) mostrado en la Figura 8A y un resumen de células productoras de IFN- γ y/o TNF α (% de células T CD8) mostrado en la Figura 8B. Estos datos muestran que la vacunación con Z13Mad5Anaxa solo y el tratamiento con anti-PD1 solo dan como resultado un mayor porcentaje de células productoras de citoquinas, en particular IFN- γ . Sin embargo, el mayor aumento en el porcentaje de células productoras de citoquinas, en particular IFN- γ , se observó claramente en animales tratados con una combinación de Z13Mad5Anaxa y anti-PD1.

En conjunto, las respuestas inmunes de células T CD8 específicas de SIINFEKL más fuertes en los cerebros de ratones portadores de tumores con una potente función efectora se observaron claramente en animales tratados con una combinación de Z13Mad5Anaxa y anti-PD1. Estos hallazgos también indican un efecto sinérgico de Z13Mad5Anaxa y anti-PD1 en el modelo de glioblastoma.

Ejemplo 5: efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre la supervivencia en un modelo de glioblastoma

A continuación, se evaluó la tasa de supervivencia de ratones tratados con una combinación de anti-PD1 y Z13Mad5Anaxa en el modelo de glioblastoma en un experimento independiente.

Con este fin, se implantaron intracranealmente a ratones C57BL/6 5×10^5 células tumorales GI261-Quad el día 0. Después de la implantación del tumor, los ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + Isotipo" y "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" fueron vacunados los días 7, 21 y 35 por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 μ g del anticuerpo anti-PD1 RMP1-14 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) en cada uno de los días 7, 10, 14, 17 y 21 a ratones del grupo "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1". Para el control, se administraron i.p. 200 μ g del isotipo mAB 2A3 en cada uno de los días 7, 10, 14, 17 y 21 a ratones de los grupos "isotipo" e "isotipo Z13Mad5Anaxa+". En los días 7 y 21, cuando se administraron tanto Z13Mad5Anaxa como anticuerpo, el anticuerpo se administró i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad5Anaxa. Los ratones se pesaron diariamente y se sacrificaron cuando la pérdida de peso fue superior al 15%.

Los resultados se muestran en la Figura 9. Estos resultados muestran que la vacunación terapéutica con Z13Mad5Anaxa solo es más eficaz que el grupo de control, con una diferencia de 10 días en la mediana de supervivencia. Una vez más, los efectos, es decir, el aumento de la tasa de supervivencia, son mayores en el caso de la combinación de anti-PD1 y Z13Mad5Anaxa. En particular, la terapia combinada anti-PD1/Z13Mad5Anaxa es capaz de controlar el crecimiento del glioblastoma.

En conjunto, la terapia combinada anti-PD1 aumentó el efecto de la vacunación con Z13Mad5Anaxa. Como se muestra en el Ejemplo 4, una combinación de Z13Mad5Anaxa y anti-PD1 fue capaz de promover la secreción más intensa de citoquinas por parte de las células T CD8 específicas de antígeno en el cerebro.

Ejemplo 6: efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre el número de metástasis en un modelo de metástasis pulmonar

En este experimento, la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR se investigó de nuevo en un modelo de tumor diferente (distinto del modelo E.G7 usado en los Ejemplos 1 - 3) y el modelo de glioblastoma usado en los Ejemplos 4 y 5).

Con este fin, se implantaron i.v. a ratones C57BL/6 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA el día 0. Después de la implantación del tumor, los ratones del grupo "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" ("Vacuna + anti-PD1") fueron vacunados en los días 0 y 10 por inyección subcutánea de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 μ g del anticuerpo anti-PD1 RMP1-14 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) en cada uno de los días 0, 3 y 7 a ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + anti-PD1" ("Vacuna + anti-PD1") y "anti-PD1". Para el control, se administraron i.p. 200 μ g del isotipo mAB 2A3 en cada uno de los días 0, 3 y 7 a ratones del grupo "isotipo". El día 0, cuando se administraron tanto Z13Mad5Anaxa como anticuerpo, el anticuerpo se administró i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad5Anaxa. Los ratones fueron sacrificados el día 17 y se recuperaron los pulmones. Se contó el número de focos de metástasis para cada pulmón. **, $p < 0,01$ (prueba T no pareada).

Los resultados se muestran en la Figura 10. El tratamiento combinado con anti-PD1 y Z13Mad5Anaxa solo, pero no el tratamiento con anti-PD1 solo, produjo una disminución significativa en el número de metástasis. Por consiguiente,

el tratamiento combinado con anti-PD1 y Z13Mad5Anaxa fue muy eficaz para inhibir el crecimiento de metástasis de melanoma en el pulmón.

Ejemplo 7: efectos de la combinación de un inhibidor de CTLA4 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre el crecimiento tumoral en el modelo EG7

Para evaluar los efectos de una combinación de un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR con un inhibidor de puntos de control diferente, se usó un inhibidor de CTLA4 en el presente experimento.

Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 (5-6 ratones por grupo) 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, los ratones del grupo "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 ip" fueron vacunados los días 5 y 13 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 100 µg de anticuerpo anti-CTLA4 9D9 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) en cada uno de los días 5 y 13 a ratones de los grupos "aCTLA4 ip" y "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 ip". En el grupo "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 ip" el anticuerpo se administró i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad5Anaxa. Para el control, se administraron i.p. 100 µg de isotipo mAB MPC-11 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) en cada uno de los días 5 y 13 a ratones del grupo "control". El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

Como se muestra en la Figura 11, el tratamiento con el inhibidor de CTLA4 solo no produjo ningún efecto sobre el crecimiento del tumor en comparación con el grupo de control. Sin embargo, la combinación de ambos, el inhibidor CTLA4 y Z13Mad5Anaxa, resultó en una disminución significativa del volumen del tumor. Estos datos muestran que una combinación de la terapia anti-CTLA4 y la vacunación con Z13Mad5Anaxa fue eficaz para disminuir el crecimiento tumoral, mientras que la terapia anti-CTLA4 sola no produjo ningún efecto.

Ejemplo 8: efectos de la vía de administración del modulador de puntos de control inmunitarios sobre el crecimiento tumoral

Para evaluar los efectos de la vía de administración del modulador de puntos de control inmunitarios en una terapia de combinación de un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR con un modulador del punto de control, se usó el modelo de tumor EG7.

Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 (5-6 ratones por grupo) 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, los ratones de los grupos "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 ip" y "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 sc" fueron vacunados en los días 5 y 13 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 100 µg de anticuerpo anti-CTLA4. en cada uno de los días 5 y 13 a ratones del grupo "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 ip" justo después de la administración s.c. de Z13Mad5Anaxa. En el grupo "Z13Mad5Anaxa + aCTLA4 sc" en cada uno de los días 5 y 13 se administraron 100 µg de anticuerpo anti-CTLA4 s.c. en el mismo sitio que Z13Mad5Anaxa 1 h después de la inyección de Z13Mad5Anaxa. Para el control, se administraron i.p. 100 µg del isotipo mAB MPC-11 en cada uno de los días 5 y 13 a ratones del grupo "control". El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

Como se muestra en la Figura 12, el efecto más pronunciado de la terapia de combinación de un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR con un modulador de puntos de control en la disminución del crecimiento tumoral se logró cuando el modulador de puntos de control se administró por vía intraperitoneal. La administración subcutánea del modulador de puntos de control también resultó en una disminución del crecimiento tumoral; sin embargo, el efecto fue menos pronunciado que después de la administración i.p.

Ejemplo 9: efectos de la combinación de un inhibidor de CTLA4 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre el crecimiento tumoral en un modelo de carcinoma de colon CT26

En este experimento, la combinación de un inhibidor de CTLA4 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR se investigó en un modelo de tumor diferente (distinto del modelo E.G7 usado en los Ejemplos 7 y 8).

Para ello se utilizó el modelo de carcinoma de colon CT26 murino y se diseñó otro complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR ("Z13Mad8Anaxa"). Z13Mad8Anaxa difiere de Z13Mad5Anaxa (descrito en el Ejemplo 1) 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 epítomos CD8 y CD4 de la glicoproteína 70 y el agonista peptídico de TLR "Anaxa". A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de Z13Mad8Anaxa con el péptido de penetración celular "Z13" subrayado y el agonista peptídico de TLR "Anaxa" en cursiva:

KRYKNRVASR KSRKFKQLL QHYREVAAK SSENDRLRLLLK VTYHSPSYVY HQFERRAILN

RLVQFIKDRI SVVQALVLT S TVHEILCKLS LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE

(SEQ ID NO: 33)

Se implantaron sc. a ratones BALB/c (siete ratones por grupo) 2×10^5 células tumorales CT26 en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, los ratones del grupo "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4" fueron vacunados los días 3 y 9 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad8Anaxa en el flanco derecho y se administraron i.p. 100 µg del anticuerpo anti-CTLA4 9D9 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) a cada uno de los días 3, 6 y 9 (en los días 3 y 9 justo después de la administración s.c. de Z13Mad8Anaxa). En el grupo de control, se administraron i.p. 100 µg del isotipo mAB MPC-11 en cada uno de los días 3, 6 y 9 a ratones del grupo "control". El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

Los resultados se muestran en la Figura 13. Estos datos muestran que una combinación de un inhibidor de CTLA4 con un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR es capaz de controlar el crecimiento tumoral también en el modelo de tumor de cáncer de colon CT26.

Ejemplo 10: efectos de la combinación de un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR con dos moduladores de puntos de control inmunitarios diferentes sobre el crecimiento tumoral

En este experimento se evaluaron los efectos de una combinación de un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR con dos moduladores de puntos de control inmunitarios diferentes, a saber, un inhibidor de PD1 y un inhibidor de CTLA4. El objetivo de este experimento era determinar si una combinación que incluyera, además del complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR, dos moduladores de puntos de control diferentes era aún más eficaz que una combinación con un único modulador de puntos de control.

Debe tenerse cuidado en la selección de un modelo de tumor apropiado para evitar "efectos suelo" y "efectos techo", ya que el efecto, por ejemplo, la disminución del volumen del tumor, en la combinación con un modulador de punto de control, aún debe poder mejorarse, por ejemplo, mediante una disminución aún mayor del volumen del tumor. Por lo tanto, se eligió el modelo de carcinoma de colon CT26.

Se implantaron s.c. a ratones BALB/c (5 a 6 ratones por grupo) 2×10^5 células tumorales CT26 en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, los ratones de los grupos "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4" y "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4/aPD1" fueron vacunados en los días 3 y 9 por inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad8Anaxa en el flanco derecho. Se administraron i.p. 200 µg del anticuerpo anti-PD1 RMP1-14 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) en cada uno de los días 3, 6 y 9 a ratones de los grupos "aCTLA4/aPD1" y "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4/aPD1". Se administraron i.p. 100 µg del anticuerpo anti-CTLA4 [nombre del Ab, ¿proveedor?] en cada uno de los días 3, 6 y 9 a los grupos "aCTLA4/aPD1", "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4" y "Z13Mad8Anaxa + aCTLA4/aPD1". En los días 3 y 9, cuando se administraron Z13Mad8Anaxa y anticuerpos, los anticuerpos se administraron i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad8Anaxa. En el grupo de control, se administraron i.p. 100 µg del isotipo mAB MPC-11 en cada uno de los días 3, 6 y 9 a ratones del grupo "control". El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

Los resultados se muestran en la Figura 14. Como se muestra en el Ejemplo 9, el tratamiento con una combinación de Z13Mad8Anaxa con un inhibidor de CTLA4 (pero sin otro modulador de punto de control) dio como resultado una disminución en el crecimiento del tumor. De manera similar, el tratamiento con una combinación de moduladores de puntos de control (anti-CTLA4 y anti-PD1), pero sin Z13Mad8Anaxa, también resultó en una disminución del crecimiento tumoral. Sin embargo, la combinación de los tres, los dos moduladores de puntos de control distintos y Z13Mad8Anaxa, dio como resultado la mejora más pronunciada, a saber, una fuerte disminución del volumen del tumor. Por tanto, los datos muestran que una combinación de los tres, terapia anti-PD1, terapia anti-CTLA4 y vacunación con Z13Mad5Anaxa, es más eficaz que una combinación de solo dos componentes. Estos resultados indican un efecto sinérgico de la terapia anti-PD1, la terapia anti-CTLA4 y la vacunación con Z13Mad5Anaxa.

Ejemplo 11: inmunogenicidad de la combinación de un agonista de CD40 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR

Para evaluar el potencial de una combinación de un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR de nuevo con un modulador de puntos de control diferente, en el presente experimento se usó un anticuerpo agonista dirigido a CD40.

Con este fin, se vacunaron ratones C57BL/6 sin tratamiento previo (4 ratones por grupo) en los días 0, 14, 28 y 42 (semanas 0, 2, 4 y 6) por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se administraron s.c. 100 µg de anticuerpo anti-CD40 FGK45 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) el día 0 a ratones del grupo

"Z13Mad5Anaxa + aCD40 at vac1" y los días 0 y 14 a ratones del grupo "Z13Mad5Anaxa + aCD40 at vac1 y vac2" (los mismos días que la primera y segunda vacunación). El anticuerpo anti-CD40 se administró s.c. en el mismo sitio que Z13Mad5Anaxa 1 h después de la inyección de Z13Mad5Anaxa. Los ratones se desangraron los días 21, 35 y 49 (semanas 3, 5 y 7) y se evaluó el bazo en la semana 7. Se realizó tinción multimérica en las células sanguíneas. Además, también se evaluó el porcentaje de células productoras de citoquinas en el bazo. Para ello, se tñieron las citoquinas intracelulares tras una reestimulación con el péptido SIINFEKL durante 6 horas en presencia de Brefeldin A (GolgiPlug, BD Biosciences) con mAb para IFN- γ (XMG1.2), factor de necrosis tumoral (MP6-XT22), CD107a (1 D4B) y controles de isotipo correspondientes (BD Biosciences).

La Figura 15 muestra el porcentaje de células positivas para multímeros (en % de células T CD8) para los diferentes grupos experimentales (Fig. 15A) y el porcentaje de células positivas para KLRG1 entre las células positivas para multímeros (Fig. 15B). Todos los grupos son significativamente diferentes en comparación con el grupo de control sin tratamiento previo, lo que confirma la inmunogenicidad de Z13Mad5Anaxa. Sin embargo, los grupos tratados adicionalmente con un anticuerpo anti-CD40 mostraron aún más células positivas para multímeros y células positivas para KLRG1, lo que fue más pronunciado en el grupo que recibió dos tratamientos con anti-CD40. Estos resultados indican un efecto sinérgico de la combinación de un agonista de CD40 y Z13Mad5Anaxa sobre la inmunogenicidad.

Estos datos están respaldados por los resultados mostrados en las Figuras 16 y 17 relativos a la función efectora de las células T CD8 específicas de OVA, que muestran el mayor aumento de células productoras de citoquinas, cuando la vacunación con Z13Mad5Anaxa se combinó con el tratamiento con el anticuerpo agonista anti-CD40.

Ejemplo 12: eficacia de un complejo que tiene un agonista de TLR diferente sobre el crecimiento tumoral en un modelo tumoral de referencia EG.7-OVA

El objetivo de este estudio era investigar el efecto de un complejo como se describe en el presente documento que tiene un agonista de TLR diferente, concretamente "EDA" en lugar de "Z13", sobre el crecimiento y la supervivencia del tumor. En el presente estudio, el complejo es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", una proteína "MAD5", que consta de diferentes epítopos CD8+ y CD4+ de diversos antígenos, y el agonista peptídico de TLR4 "EDA". Por consiguiente, se diseñaron una proteína fusionada con el péptido EDA en la posición N-terminal y diferentes proteínas conjugadas de control sin Z13 o EDA o ambos.

Es decir, se diseñaron las siguientes construcciones, mediante las cuales en la secuencia de aminoácidos el péptido de penetración celular "Z13" se muestra subrayada y el agonista peptídico de TLR "EDA" se muestra en cursiva.

EDAZ13Mad5

Secuencia:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYP VTYSSPEDGI
RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKSR
AKFKQLLQHY REVAAAKSSE NDLRLLLKE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV
PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFEKLTE WTGS
[SEQ ID NO: 26]

Peso molecular 25.057 Da

Características:

- 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 TLR4-expressing cells and induces cytotoxic T cell responses *in vivo*. J Immunol, 2007. 178(2): págs. 748-56)
- Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol al 10 %, DTT 2 mM, L-Arginina 1 M, pH 8
- Nivel de endotoxinas: < 0,01 EU/ug

Mad5

Secuencia:

MHHHHHHE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA
QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFEKLTE WTGS
[SEQ ID NO: 14]

Peso molecular: 10.154,6 Da

Características:

- La carga Mad5 contiene epítomos 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
- Nivel de endotoxinas: 0,069 EU/mg

EDAMad5

Secuencia

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYSR VTYSSPEDGI
 RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTE SLKISQAVHA
 AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE
 SIINFEKLTE WTGS
 [SEQ ID NO: 34]

Peso molecular: 20.017 Da

Características:

- La carga Mad5 contiene epítomos OVACD4, gp100CD8, EalphaCD4 y OVACD8
- Contiene agonista de EDA TLR
- 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 endotoxinas: 1,8 EU/mg

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 s.c. a ratones C57BL/6 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 (véanse los Ejemplos 1 y 2 para la descripción del constructo): EDZ13Mad5, EDAMad5, Mad5 o Mad5 y MPIA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

La Fig. 18 muestra el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); *, $p < 0,05$ EDZ13Mad5 versus grupo de control (prueba Anova de 2 vías). La Figura 19 muestra curvas de crecimiento tumoral individuales (7 ratones individuales por grupo). La Figura 20A muestra la curva de supervivencia de 7 ratones por grupo; *, $p < 0,05$ EDZ13Mad5 versus grupo de control (prueba de rango logarítmico). La Figura 20B muestra la curva de progresión libre de tumor de 7 ratones por grupo; *, $p < 0,05$ EDZ13Mad5 versus grupo de control (prueba de rango logarítmico).

Los resultados demuestran que, en un entorno terapéutico, EDZ13Mad5 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 EDZ13Mad5 es una vacuna altamente potente para controlar el crecimiento tumoral en un entorno terapéutico.

Ejemplo 13: 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención, se empleó la proteína de fusión Z13Mad5Anaxa descrita anteriormente.

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 varios antígenos, y el agonista peptídico de TLR2 "Anaxa". Así, se diseñaron además los siguientes constructos:

Z14Mad5Anaxa

Secuencia:

MHHHHHHKRY KNRVASRKS AKFKQLLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV
 VGVGALKVPR NQDWLGVPFR AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTWET
 GSSTVHEILC KLSLEGDHST PPSAYGSVKP YTNFDAE
 (SEQ ID NO: 29)

Z18Mad5Anaxa

5 Secuencia:

MHHHHHHHREV AAKSSSENDER LRLLLKESLK ISQAVHAAHA EINEAGREVV GVGALKVPRN
 QDWLGVPFRFA KFASFEAQGA LANIAVDKAN LDVEQLESII NFEKLTWETG SSTVHEILCK
 LSLEGDHSTP PSAYGSVKPY TNFDAE
 (SEQ ID NO: 30)

10 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 s.c. (semana0, semana2, semana4, semana6 y semana8). Los ratones se desangraron 7 días después de la 2ª, 3ª, 4ª y 5ª vacunaciones y se realizó la tinción multimérica (un experimento con 4 ratones por grupo).

15 Los resultados se muestran en la Figura 21. Todos los grupos vacunados con Z13Mad5Anaxa, Z14Mad5Anaxa o Z18Mad5Anaxa mostraron un mayor porcentaje de células multiméricas positivas en comparación con el grupo de control (excepto la segunda vacunación con Z18Mad5Anaxa). Estos resultados indican que los complejos según la presente invención que tienen diferentes péptidos de penetración celular pueden provocar una respuesta inmune a diferentes dosis.

Ejemplo 14: comparación de respuestas inmunes de células T con complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular

25 Para investigar las respuestas inmunes de las células T CD8 con más detalle, se asignaron ratones C57BL/6 a tres grupos diferentes (3 - 4 ratones por grupo): sin tratamiento previo, 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 o Z14Mad5Anaxa como se describe anteriormente. Nueve días después de la 5ª 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).

30 Los resultados se muestran en la Figura 22. Los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa o 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.

35 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 (SEQ ID NO: 35) nueve días después de la 5ª vacunación para cuantificar las células productoras de IFN-γ.

40 Los resultados se muestran en la Figura 23A. Los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa mostraron un aumento 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).

45 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 de bazo estimuladas con el péptido OVACD4 (SEQ ID NO: 36) nueve días después de la 5ª vacunación para cuantificar las células productoras de IFN-γ.

50 Los resultados se muestran en la Figura 23B. 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 el péptido SIINFEKL OVACD8 (SEQ ID NO: 35) para identificar células CD107a⁺IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺. Los resultados se muestran en la Figura 24. Los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa o con Z14Mad5Anaxa mostraron un aumento similar en células CD107a⁺IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺.

Ejemplo 15: comparación del efecto de complejos con diferentes péptidos de penetración celular 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 s.c. a ratones C57BL/6 3x10⁵ células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se asignaron a tres grupos diferentes (sin tratamiento previo, Z13Mad5Anaxa y Z14Mad5Anaxa). Los ratones fueron vacunados dos veces el d5 y el d13 después de la implantación tumoral por inyección s.c. de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa en el flanco derecho.

Los resultados se muestran en la Figura 25. La vacunación con Z13Mad5Anaxa o con Z14Mad5Anaxa produjo una disminución significativa de los volúmenes tumorales en comparación con los ratones de control (Figura 25 A), así como un aumento significativo de las tasas de supervivencia en comparación con los ratones de control (Figura 25 B). Esos resultados indican que ambos complejos, Z13Mad5Anaxa y Z14Mad5Anaxa, pueden disminuir significativamente el crecimiento tumoral y prolongar significativamente la supervivencia.

Ejemplo 16: 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 comprendido por la combinación para uso según la presente invención usando un complejo con el agonista de TLR "EDA". Por tanto, se utilizó la proteína de fusión EDAZ13Mad5 descrita anteriormente.

Además, se diseñaron más proteínas 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 agonista peptídico de TLR4 "EDA". Así, se diseñaron además los siguientes constructos:

EDAZ14Mad5

Secuencia:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYSR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKS R AKFKQLLQHY
REVA AA KESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVP RF AKFASFEAQG
ALANIAVDKA NLDVEQLES I INFEKLTEWT GS
(SEQ ID NO: 31)

EDAZ18Mad5

Secuencia:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYSR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTREV AA AKSSEND R LRLLLKESLK
ISQAVHAAHA EINEAGREVV GVGALKVPRN QDWLGVP RF A K FASFEAQGA LANIAVDKAN
LDVEQLESII NFEKLTEWTG S
(SEQ ID NO: 32)

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 semana4) 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 26. Todos los grupos vacunados con EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5 o EDAZ18Mad5 mostraron un mayor porcentaje de células multiméricas positivas en comparación con el grupo de control. Estos resultados indican que los complejos según la presente invención con diferentes péptidos de penetración celular pueden provocar una respuesta inmune a diferentes dosis.

Ejemplo 17: 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 (véanse el Ejemplo 12 y las Figuras 18 - 20 para el efecto de EDAZ13Mad5 en el mismo modelo).

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

Los resultados se muestran en la Figura 27. De manera similar a EDAZ13Mad5 (véanse el Ejemplo 12 y las Figuras 18 - 20), la vacunación con EDAZ14Mad5 resultó en una disminución significativa de los volúmenes tumorales en comparación con los ratones de control (Figura 27 A), así como en un aumento significativo de las tasas de supervivencia en comparación con los ratones de control (Figura 27 B). Esos resultados indican que EDAZ14Mad5 puede disminuir significativamente el crecimiento tumoral y prolongar significativamente la supervivencia, de manera similar a EDAZ13Mad5 (véanse el Ejemplo 12 y las Figuras 18 - 20).

Ejemplo 18: eficacia superior del constructo de fusión Z13Mad5Anaxa en comparación con Z13Mad5 y un agonista de TLR administrado por separado

Para investigar el efecto del agonista de TLR conjugado "Anaxa" en Z13Mad5Anaxa (SEQ ID NO: 28) sobre el control del crecimiento tumoral, se usó un modelo tumoral de referencia, a saber, la implantación s.c. de células de timoma EG.7-OVA. Para la comparación, se utilizaron el constructo "AnaxaZ13Mad5" (SEQ ID NO: 27; con agonista N-terminal de TLR "Anaxa" y carga antigénica C-terminal "Mad5") y el constructo "Z13Mad5" (SEQ ID NO: 46; sin agonista de TLR), este último administrado en combinación con un agonista de TLR separado (Pam3CSK4).

Se implantaron ratones C57BL/6 s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo. Después de la implantación del tumor, los tres grupos de 7 ratones cada uno fueron vacunados s.c. en el flanco derecho los días 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). El tamaño del tumor se midió con un calibrador. Los resultados se muestran en las Fig. 28-30.

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 Pam3CSK4 con Z13Mad5Anaxa y AnaxaZ13Mad5 muestra 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.

Ejemplo 19: efecto terapéutico sobre el crecimiento tumoral - comparación de constructos con diferentes agonistas de TLR

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 (SEQ ID NO: 26) y Z13Mad5Anaxa (SEQ ID NO: 28), en el control del crecimiento tumoral. Para ello, se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 3×10^5 células de timoma EG.7-OVA en el flanco izquierdo como se describió anteriormente. Los ratones (7 ratones individuales por grupo) fueron vacunados s.c. en el flanco derecho los días 5 y 13 con 2 nmol de EDAZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa o coinyección de Z13Mad5+MPLA (equimolar a EDA).

Los resultados se muestran en las Figuras 31, 32 y 33. En este entorno experimental, Z13Mad5Anaxa (SEQ ID NO: 28), EDAZ13Mad5 (SEQ ID NO: 26) y Z13Mad5 (SEQ ID NO: 46) + 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 20: 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 según la presente invención se eligió el modelo de glioblastoma. A saber, se administró Z13Mad5Anaxa (SEQ ID NO: 28) a un grupo de ratones, mientras que Z13Mad5 (SEQ ID NO: 46) y

Anaxa (SEQ ID NO: 15) se administraron (ambos juntos) a otro grupo de ratones.

Se realizó el análisis de células T en el sitio del tumor en ratones GI261-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). En resumen, se implantaron i.c. (intracranalmente) a ratones C57BL/6 5×10^5 células tumorales tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (el d7 y d21 después de la implantación) por inyección s.c. 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 34. 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. 34A). De manera similar, se observó una acumulación más fuerte de células T CD8 específicas de SIINFEKL en los BIL de los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa en comparación con los ratones vacunados con Z13Mad5 y Anaxa por separado (Fig. 34B, $p = 0,0539$).

A continuación, se evaluó la secreción de citoquinas. Para ello, se implantaron i.c. a ratones C57BL/6 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y d21) por inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. Los BIL se aislaron y se cultivaron durante 6 h con BMDC maduras cargadas o no con el péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 35) en presencia de Brefeldin A antes de la tinción intracelular para citoquinas.

Los resultados se muestran en la Figura 35. En general, se observó un alto nivel de secreción de citoquinas en las células T CD8 infiltrantes del cerebro de los 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 administradas 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 citoquinas por las células T CD8 específicas de antígeno en el cerebro.

Ejemplo 21: eficacia superior del constructo de fusión Z13Mad5Anaxa en comparación con Z13Mad5 y Anaxa en ratones sin tratamiento previo

A continuación, se investigó la eficacia de un complejo según la presente invención en ratones sin tratamiento previo. A saber, se administró Z13Mad5Anaxa (SEQ ID NO: 28) a un grupo de ratones, mientras que Z13Mad5 (SEQ ID NO: 46) 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 (semana 0) por inyección s.c. 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 SIINFEKL en sangre mediante tinción multimérica (4 - 8 ratones por grupo).

Los resultados se muestran en la Figura 36. Se observó un porcentaje significativamente mayor de células T CD8 específicas de SIINFEKL en la sangre de los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa en comparación con los ratones vacunados con Z13Mad5 y Anaxa por separado (Fig. 36).

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 SIINFEKL más fuerte en la periferia.

Ejemplo 22: efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre el crecimiento tumoral y la tasa de supervivencia en un modelo de carcinoma de colon

Para investigar los efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR en el tratamiento del cáncer colorrectal, se usó el modelo tumoral MC-38. MC-38 es una línea celular de carcinoma de colon.

Con este fin, se proporcionó "Z13Mad12Anaxa", que es un complejo que comprende un péptido de penetración celular "Z13", la carga antigénica "MAD12" que comprende tres neoantígenos identificados por Yadav *et al.* Nature. 27 de

noviembre de 2014 27;515(7528):572-6 de la línea celular tumoral MC-38, y el agonista peptídico de TLR "Anaxa". A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de Z13Mad12Anaxa:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLKLFRAAQLANDVVLQIMEHLELA
SMTNMELMSSIVVISASIIVFNLLELEGSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

5

(SEQ ID NO: 45)

Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 (siete ratones por grupo, hembras, 7 semanas de edad) $n = 2 \times 10^5$ células tumorales MC-38 en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, los ratones de los grupos "Z13Mad12Anaxa" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1" fueron vacunados en los días 3, 10 y 17 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad12Anaxa en la base de la cola. Se administraron i.p. 200 µg del anticuerpo anti-PD1 RMP1-14 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) en cada uno de los días 6, 10, 13, 17, 20, 24, 27 y 31 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1". En los días 10 y 17, cuando se administraron tanto Z13Mad12Anaxa como el anticuerpo anti-PD1 al grupo "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1", el anticuerpo se administró i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad12Anaxa. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

Como se muestra en las Figuras 37 y 38, el tratamiento con el inhibidor de PD1 solo o con Z13Mad12Anaxa solo produjo una reducción significativa del volumen del tumor (Fig. 37A) y una mayor supervivencia (Fig. 37B), en comparación con el grupo de control. Sin embargo, la combinación de ambos, el inhibidor de PD1 y Z13Mad12Anaxa, produjo la mejoría más pronunciada, es decir, una fuerte disminución del volumen del tumor y un fuerte aumento de las tasas de supervivencia. Estos datos muestran que la combinación de ambos, la terapia anti-PD1 y la vacunación con Z13Mad12Anaxa es más eficaz que la terapia anti-PD1 sola o la vacunación Z13Mad12Anaxa sola. Además, en el grupo de control todos los ratones mostraron tumores (0/7 ratones sin tumores), mientras que en el grupo Z13Mad12Anaxa se encontraron 2/7 ratones sin tumores y en el grupo anti-PD1 3/7 ratones sin tumores. Curiosamente, en el grupo "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1" solo un ratón mostró tumores, es decir, 6/7 ratones estaban libres de tumores. Esto supone más que la suma de ratones sin tumores en el grupo Z13Mad12Anaxa (2/7) y en el grupo anti-PD1 (3/7). En conjunto, estos resultados indican un fuerte efecto sinérgico de la combinación de terapia anti-PD1 y vacunación con Z13Mad12Anaxa.

Ejemplo 23: efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre el crecimiento tumoral y la tasa de supervivencia en el modelo de carcinoma de colon

En el Ejemplo 23, se sometieron más animales a la prueba experimental del Ejemplo 22 con el fin de ampliar los tamaños de grupo de los diferentes grupos experimentales del Ejemplo 22. Por tanto, los resultados experimentales "incluyen" los resultados de los animales del Ejemplo 22 y de los animales adicionales.

En resumen, se utilizó el modelo de tumor MC-38 para evaluar los efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR en el tratamiento del cáncer. MC-38 es una línea celular de carcinoma de colon.

Se proporcionó "Z13Mad12Anaxa", que es un complejo que comprende un péptido de penetración celular "Z13", la carga antigénica "MAD12" que comprende tres neoantígenos identificados por Yadav *et al.* Nature. 27 de noviembre de 2014; 515 (7528): 572-6 de la línea celular tumoral MC-38 y el agonista peptídico de TLR "Anaxa". A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de Z13Mad12Anaxa:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLKLFRAAQLANDVVLQIMEHLELA
SMTNMELMSSIVVISASIIVFNLLELEGSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE
(SEQ ID NO: 45)

Se implantaron s.c. a ratones C57BL/6 (trece a catorce ratones por grupo, hembras, 7 semanas de edad) 2×10^5 células tumorales MC-38 en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, los ratones de los grupos "Z13Mad12Anaxa" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1" fueron vacunados los días 3, 10 y 17 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad12Anaxa en la base de la cola. Se administraron i.p. 200 µg del anticuerpo anti-PD1 RMP1-14 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE. UU.) en cada uno de los días 6, 10, 13, 1, 7, 20, 24 y 27 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1". En los días 10 y 17, cuando se administraron tanto Z13Mad12Anaxa como anticuerpo, el anticuerpo se administró i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad12Anaxa. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

Como se muestra en las Figuras 39 y 40, el tratamiento con el inhibidor de PD1 solo o con Z13Mad12Anaxa solo produjo una reducción significativa del volumen del tumor (Fig. 39A) y una mayor supervivencia (Fig. 39B), en comparación con el grupo de control. Sin embargo, la combinación de ambos, el inhibidor de PD1 y Z13Mad12Anaxa, produjo la mejoría más pronunciada, es decir, una fuerte disminución del volumen del tumor y un fuerte aumento de

las tasas de supervivencia. Es de destacar que en el grupo "Z13Mad12Anaxa + aPD1" solo tres ratones desarrollaron tumores (mientras que 10 ratones permanecieron sin tumores), mientras que en el grupo "aPD1" y en el grupo "Z13Mad12Anaxa" ocho y diez ratones, respectivamente, desarrollaron tumores. En el grupo de control todos los ratones desarrollaron tumores.

Estos datos muestran que una combinación de terapia anti-PD1 y vacunación con Z13Mad12Anaxa es más eficaz que la terapia anti-PD1 sola o la vacunación con Z13Mad12Anaxa sola. Por tanto, estos resultados indican un efecto sinérgico de la terapia anti-PD1 y la vacunación con Z13Mad12Anaxa.

10 TABLA DE SECUENCIAS Y NÚMEROS DE SEQ ID (LISTA DE SECUENCIAS)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|---|--|
| SEQ ID NO: 1 | RQIKIYFQNRMRKWK | CPP: Penetratina |
| SEQ ID NO: 2 | YGRKKRRQRRR | CPP: TAT mínima |
| SEQ ID NO: 3 | MMDPNSTSEVDKFTDPYQVPFVQAFDQATRV YQDLGGPSQAPLPCVLWPVLPELPQGQLTAY HVSTAPTGSWFSAQPAPENAYQAYAAPQLFP VSDITQNNQTNQAGGEAPQPGDNSTVQTAA AVVFACPGANQGQQLADIGVPQPAPVAAPAR RTRKPQQPESLEECDSELEIKRYKNRVASRKCRK FKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLKQMCPSL DVDSIIPRTPDVLHEDLLNF | Secuencia aminoacídica de ZEBRA (secuencia natural del virus Epstein - Barr (EBV)) (YP_401673) |
| SEQ ID NO: 4 | KRYKNRVASRKCRKFKQLLQHYREVAAAKSSE NDRLRLLLKQMC | CPP1 (Z11) |
| SEQ ID NO: 5 | KRYKNRVASRKCRKFKQLLQHYREVAAAKSSE NDRLRLLLK | CPP2 (Z12) |
| SEQ ID NO: 6 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSE NDRLRLLLK | CPP3 (Z13) |
| SEQ ID NO: 7 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAK | CPP4 (Z14) |
| SEQ ID NO: 8 | KRYKNRVASRKSRAKFK | CPP5 (Z15) |
| SEQ ID NO: 9 | QHYREVAAAKSSEND | CPP6 (Z16) |
| SEQ ID NO: 10 | QLLQHYREVAAAK | CPP7 (Z17) |
| SEQ ID NO: 11 | REVAAAKSSENDRLRLLLK | CPP8 (Z18) |
| SEQ ID NO: 12 | KRYKNRVA | CPP9 (Z19) |
| SEQ ID NO: 13 | VASRKSRAKFK | CPP10 (Z20) |
| SEQ ID NO: 14 | ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGVAL KVPRNQDWLGVPFRAKFASFEAQGALA NIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTETWGS | Carga MAD5 |
| SEQ ID NO: 15 | STVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | Agonista peptídico de TLR2 Anaxa |
| SEQ ID NO: 16 | DDDK | Diana enteroquinasa |
| SEQ ID NO: 17 | IEDGR | Sitio diana de factor Xa |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|--|-----------------------------|
| 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 | MHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIA WESPQGQVSRYRVTYSSPEDGIRELPAP DGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDD MESQPLIGIQSTKRYKNRVASRKSRAKFKQ LLQHYREVAAA KSENDRLRLLLKESLKISQ AVHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRN QDWLGVPFRAKFAFASFEAQGALANIAVDK ANLDVEQLESIINFEKLTWTGS | EDAZ13Mad5 |
| SEQ ID NO: 27 | MHHHHHHHSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSA YGSVKPYTNFDAEKRYKNRVASRKSRAKF KQLLQHYREVAAA KSENDRLRLLLKESLKI SQAVHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPR NQDWLGVPFRAKFAFASFEAQGALANIAVD KANLDVEQLESIINFEKLTWTGS | AnaxaZ13Mad5 |
| SEQ ID NO: 28 | MHHHHHHKRYKNRVASRKSRAKFKQLL QHYREVAAA KSENDRLRLLLKESLKISQA VHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRNQD WLGVPFRAKFAFASFEAQGALANIAVDKANL DVEQLESIINFEKLTWTGSSTVHEILCKLSL EGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | Z13Mad5Anaxa |
| SEQ ID NO: 29 | MHHHHHHKRYKNRVASRKSRAKFKQLL QHYREVAAA KESLKISQAVHAAHAEINE AGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPFRA KFAFASFEAQGALANIAVDKANLDVEQLESI INFEKLTWTGSSTVHEILCKLSLEGDHST PPSAYGSVKPYTNFDAE | Z14Mad5Anaxa |
| SEQ ID NO: 30 | MHHHHHHREVAAA KSENDRLRLLLKES LKISQAVHAAHAEINEAGREVVGVGALKV PRNQDWLGVPFRAKFAFASFEAQGALANIA VDKANLDVEQLESIINFEKLTWTGSSTVH EILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDA E | Z18Mad5Anaxa |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|--|-------------------------|
| SEQ ID NO: 31 | MHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIA WESPQGQVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAP DGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDD MESQPLIGIQSTKRYKNRVASRKSRAKFKQ LLQHYREVAAAKESLKISQAVHAAHAEIN EAGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPFRA KFASFEAQGALANIAVDKANLDVEQLESII NFEKLTEWTGS | EDAZ14Mad5 |
| SEQ ID NO: 32 | MHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIA WESPQGQVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAP DGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDD MESQPLIGIQSTREVAANKSENDRRLRL KESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGVGA LKVPRNQDWLGVPFRAKFASFEAQGALA NIAVDKANLDVEQLESIIINFEKLTEWTGS | EDAZ18Mad5 |
| SEQ ID NO: 33 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSEN DRLRLLLKVITYHSPSYVYHQFERRAILNRLVQFIK DRISVVQALVLTSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAY GSVKPYTN FDAE | Z13Mad8Anaxa |
| SEQ ID NO: 34 | MHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESP QGQVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAEL QGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQSTESL KISQAVHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRNQ DWLGVPFRAKFASFEAQGALANIAVDKANLDVE QLE SIINFEKLE WTGS | EDAMad5 |
| SEQ ID NO: 35 | SIINFEKL | Péptido SIINFEKL OVACD8 |
| SEQ ID NO: 36 | VTYHSPSYAYHQFERRAILNRLVQFIKDRI | Mad8 |
| SEQ ID NO: 37 | NYRIATFKNWPFLDCAMEELTVSEFLKLDQR | Mad11 |
| SEQ ID NO: 38 | HLELASMTNMELMSSIV | Mad9 |
| SEQ ID NO: 39 | LFRAAQQLANDVVLQIMEHLELASMTNMELMSSI VVISASIVFNLELEG | Mad 12 |
| SEQ ID NO: 40 | NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQGQVSRVRY TYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELQGLRPGSEY TVSVVALHDDMESQPLIGIQST | EDA |
| SEQ ID NO: 41 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSEN DRLRLLLKVITYHSPSYAYHQFERRAILNRLVQFIK DRISVVQALVLTSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAY GSVKPYTN FDAE | Z13Mad8Anaxa |
| SEQ ID NO: 42 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSEN DRLRLLLKNYRIATFKNWPFLDCAMEELTVSEFL KLDQRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPY TNFDAE | Z13Mad11Anaxa |
| SEQ ID NO: 43 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSEN DRLRLLLKHLELASMTNMELMSSIVSTVHEILCKLS LEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | Z13Mad9Anaxa |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|---|---|
| SEQ ID NO: 44 | RKKRRQRRRRVKRISQAVHAAHAEINEAGRVRK RKVPRNQDWLRVKRASFEAQGALANIAVDKAR VKRSIINFELRVKRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSA YGSVKPYTNFDAE | TatFMad5Anaxa |
| SEQ ID NO: 45 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAKSSSEN DRLRLLKLFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTN MELMSSIVVISASIIIVFNLELEGSTVHEILCKLSLEG DHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | Z13Mad12Anaxa |
| SEQ ID NO: 46 | MHHHHHHKRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYRE VAAKSSSENDRRLRLKESLKISQAVHAAHAEINE AGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPFAKFAFE AQGALANIAVDKANLDVEQLESIIINFELTEWTG S | Z13Mad5 |
| SEQ ID NO: 47 | STVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | Agonista peptídico de TLR: variante de secuencia "Anaxa " |

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de:

- 5 (i) un modulador de puntos de control inmunitarios y
 (ii) un complejo que comprende:
 a) un péptido de penetración celular;
 b) al menos un antígeno o epítipo antigénico; y
 10 c) al menos un agonista peptídico de TLR,

donde los componentes a) - c) que comprende el complejo están unidos de forma covalente, para su uso en medicina.

15 2. La combinación para su uso según la reivindicación 1, donde el complejo es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante.

3. La combinación para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde el péptido de penetración celular comprendido por el complejo

- 20 (i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente 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 según la SEQ ID NO: 3, donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido sustituidos,
 25 eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de dicho fragmento.

4. La combinación para su uso según la reivindicación 3, donde el péptido de penetración celular comprendido por el complejo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13), la SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14), la SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15), o la SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18), o variantes de secuencia de las mismas sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido; preferentemente, el péptido de penetración celular comprendido por el complejo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) o variantes de secuencia de la misma sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido.

5. La combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el al menos un antígeno o epítipo antigénico comprendido por el complejo comprende o consiste en al menos un epítipo patógeno y/o al menos un epítipo tumoral, preferentemente el al menos un antígeno o epítipo antigénico comprende o consiste en al menos un epítipo de cáncer.

6. La combinación para su uso según una 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, preferentemente donde 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 de forma consecutiva en el complejo.

7. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el al menos un agonista peptídico de TLR comprendido por el complejo es un agonista peptídico de TLR2, TLR4 y/o TLR5, preferentemente un agonista peptídico de TLR2 y/o un agonista peptídico de TLR4, más preferentemente el al menos un agonista peptídico de TLR comprendido por el complejo comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 15 o 47; o de una variante de secuencia de la misma.

8. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el modulador de puntos de control inmunitarios es un activador o un inhibidor de una o más moléculas de puntos de control inmunitarios seleccionadas de CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR, ICOS, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, PD-1, TIM-3, VISTA, CEACAM1, GARP, PS, CSF1R, CD94/NKG2A, TDO, TNFR y/o FasR/DcR3; o un activador o un inhibidor de uno o más ligandos de las mismas.

9. La combinación para su uso según la reivindicación 8, donde el modulador de puntos de control inmunitarios es

- 60 - un inhibidor de una molécula inhibidora de puntos de control, preferentemente un inhibidor de A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, PD-1, TIM-3, VISTA, CEACAM1, GARP, PS, CSF1R, CD94/NKG2A, TDO, TNFR y/o DcR3 o de un ligando de las mismas; o
 - un activador de una molécula estimuladora o coestimuladora de puntos de control, preferentemente un activador de CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR y/o ICOS o de un ligando de las mismas.

10. La combinación para su uso según la reivindicación 8 o 9, donde el modulador de puntos de control inmunitarios

es un modulador de CD40, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO, preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO o un activador de CD40, más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-1 y/o IDO e incluso más preferentemente el modulador de puntos de control inmunitarios es un inhibidor de CTLA-4 y/o PD-1.

11. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde se usa más de un modulador de puntos de control inmunitarios, en particular al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 puntos de control inmunitarios distintos; preferentemente se usan 2, 3, 4 o 5 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos, más preferentemente se usan 2, 3 o 4 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos, incluso más preferentemente se usan 2 o 3 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos y, más preferentemente, se usan 2 moduladores de puntos de control inmunitarios distintos, tales como al menos (i) un inhibidor de CTLA-4 y (ii) un inhibidor de PD-1, PD-L1 o PD-L2.

12. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde el complejo es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante donde

a) el péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13), la SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14), la SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15), o la SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18), o variantes de secuencia de las mismas sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido;

b) el al menos un antígeno o epítipo antigénico es un péptido, polipéptido o proteína y, preferentemente, comprende o consiste en al menos un epítipo de cáncer; y

c) el agonista peptídico de TLR es un agonista peptídico de TLR2 y/o un agonista peptídico de TLR4.

13. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la combinación se usa en la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

14. Un kit que comprende

(i) un modulador de puntos de control inmunitarios y

(ii) un complejo que comprende:

a) un péptido de penetración celular;

b) al menos un antígeno o epítipo antigénico; y

c) al menos un agonista peptídico de TLR,

donde los componentes a) - c) que componen el complejo están unidos de forma covalente; preferentemente donde el modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12.

15. El kit según la reivindicación 14, donde el kit comprende además un prospecto o folleto de instrucciones para tratar el cáncer mediante el uso de una combinación del modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo.

16. El kit según la reivindicación 14 o 15 para su uso en medicina; preferentemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

17. Una composición que comprende

(i) un modulador de puntos de control inmunitarios y

(ii) un complejo que comprende:

a) un péptido de penetración celular;

b) al menos un antígeno o epítipo antigénico; y

c) al menos un agonista peptídico de TLR,

donde los componentes a) - c) que componen el complejo están unidos de forma covalente; preferentemente donde el modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12.

18. Un kit que comprende

(i) una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un modulador de puntos de control inmunitarios, donde el modulador de puntos de control inmunitarios es un (poli)péptido o una proteína; y

(ii) una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un complejo, comprendiendo el complejo:

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

5 donde el complejo es un (poli)péptido o una proteína, en particular un (poli)péptido de fusión o una proteína de fusión; preferentemente donde el modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12.

10 19. El kit según la reivindicación 18 para su uso en medicina, preferentemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

20. El kit según la reivindicación 18 o el kit para su uso según la reivindicación 19, donde la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en un vector, tal como un vector de expresión; una molécula de ARN tal como un ARNr, un ARNm, un ARNmi, un ARNsi o un ARNt; o una molécula de ADN, tal como un ADNc.

15 21. Una molécula de ácido nucleico que comprende

- (i) un polinucleótido que codifica un modulador de puntos de control inmunitarios, donde el modulador de puntos de control inmunitarios es un (poli)péptido o una proteína; y
- 20 (ii) un polinucleótido que codifica un complejo, comprendiendo el complejo:

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

donde el complejo es un (poli)péptido o una proteína, en particular un (poli)péptido de fusión o una proteína de fusión; preferentemente donde el modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12.

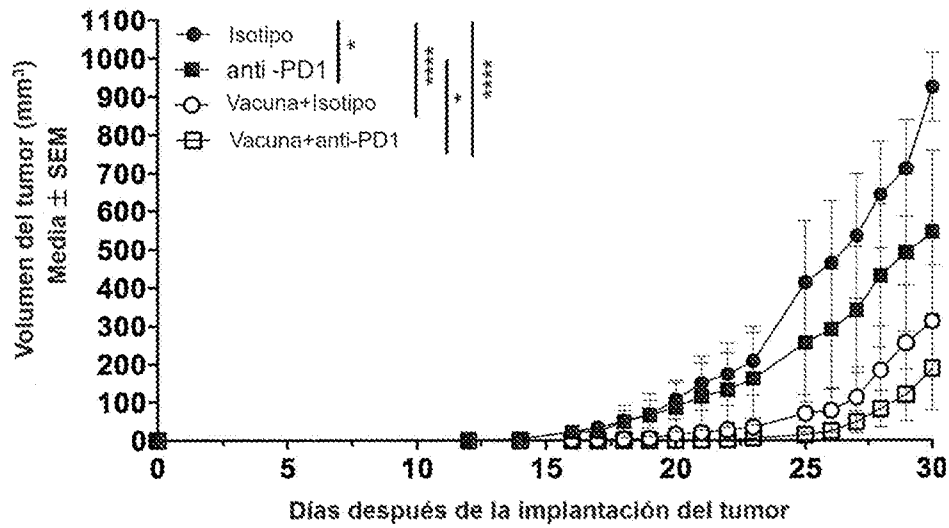
30 22. Una composición que comprende

- (i) una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un modulador de puntos de control inmunitarios, donde el modulador de puntos de control inmunitarios es un (poli)péptido o una proteína; y
- 35 (ii) una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un complejo, comprendiendo el complejo:

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

donde el complejo es un (poli)péptido o una proteína, en particular un (poli)péptido de fusión o una proteína de fusión; preferentemente donde el modulador de puntos de control inmunitarios y el complejo son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12.

A



B

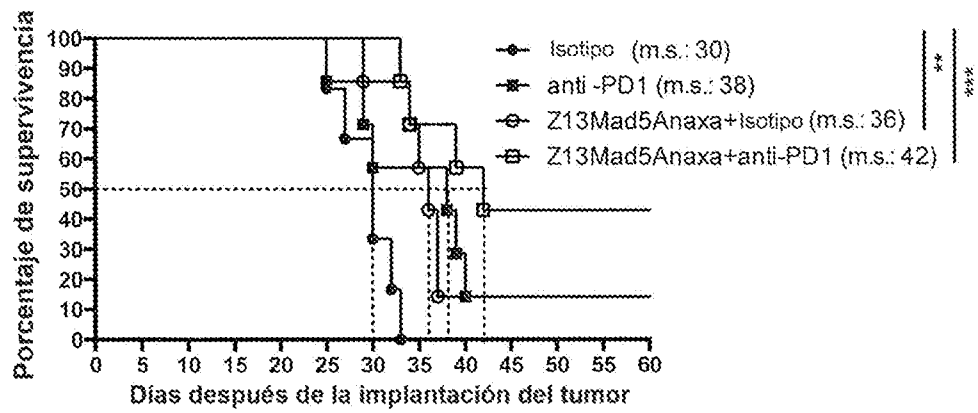


Fig. 1

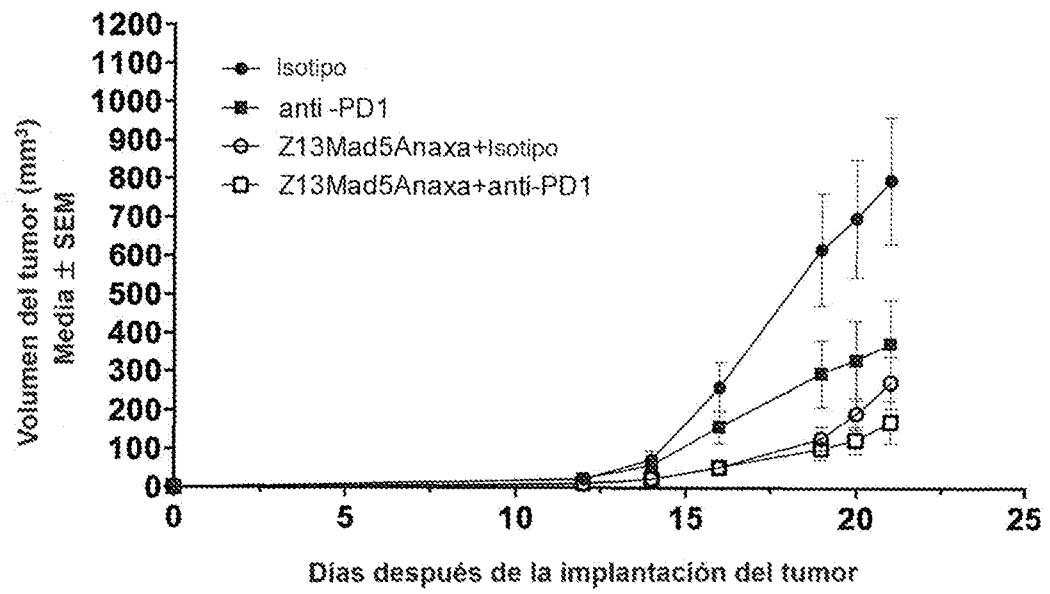
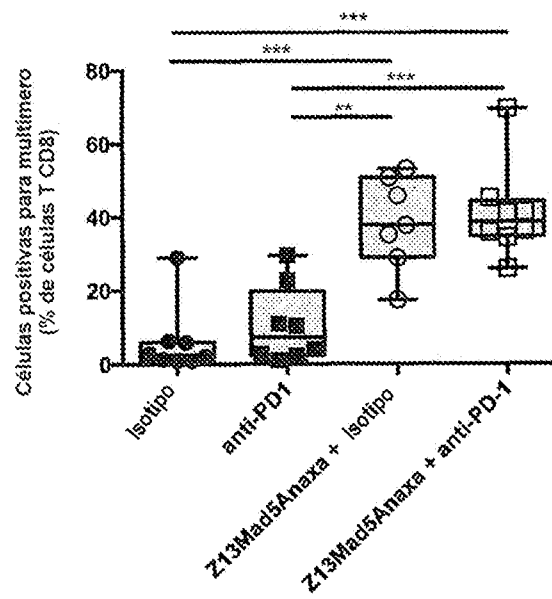


Fig. 2

A



B

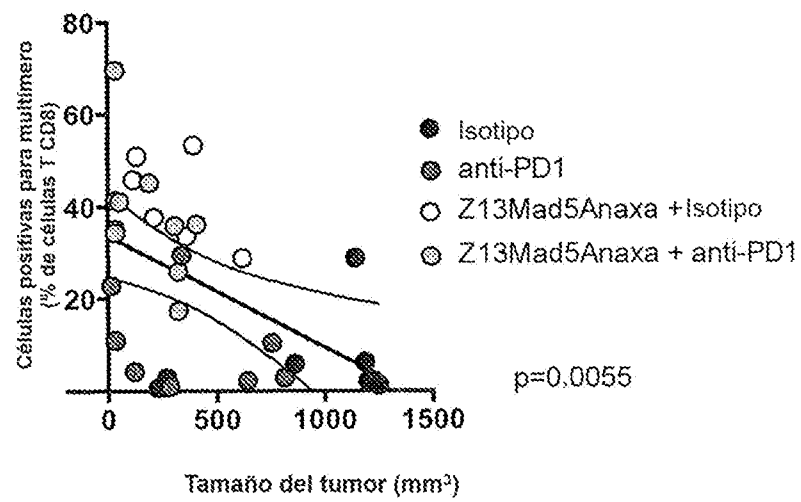
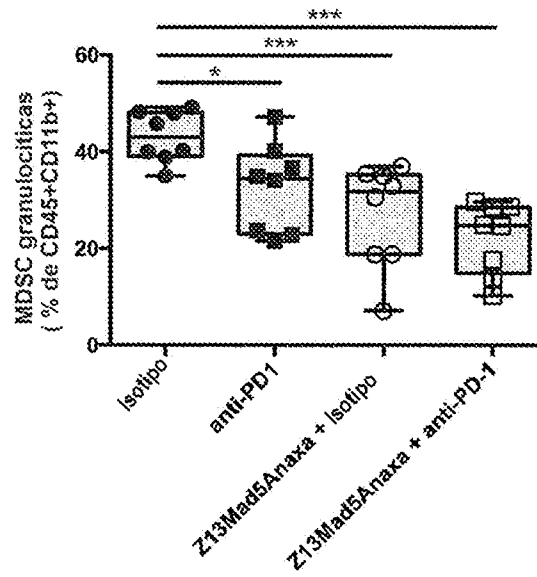


Fig. 3

A



B

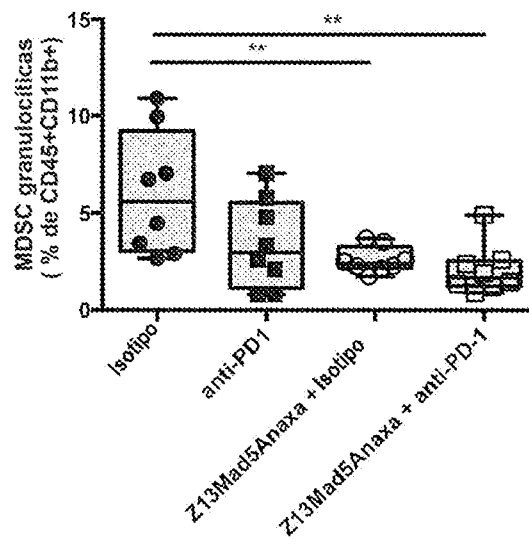


Fig. 4

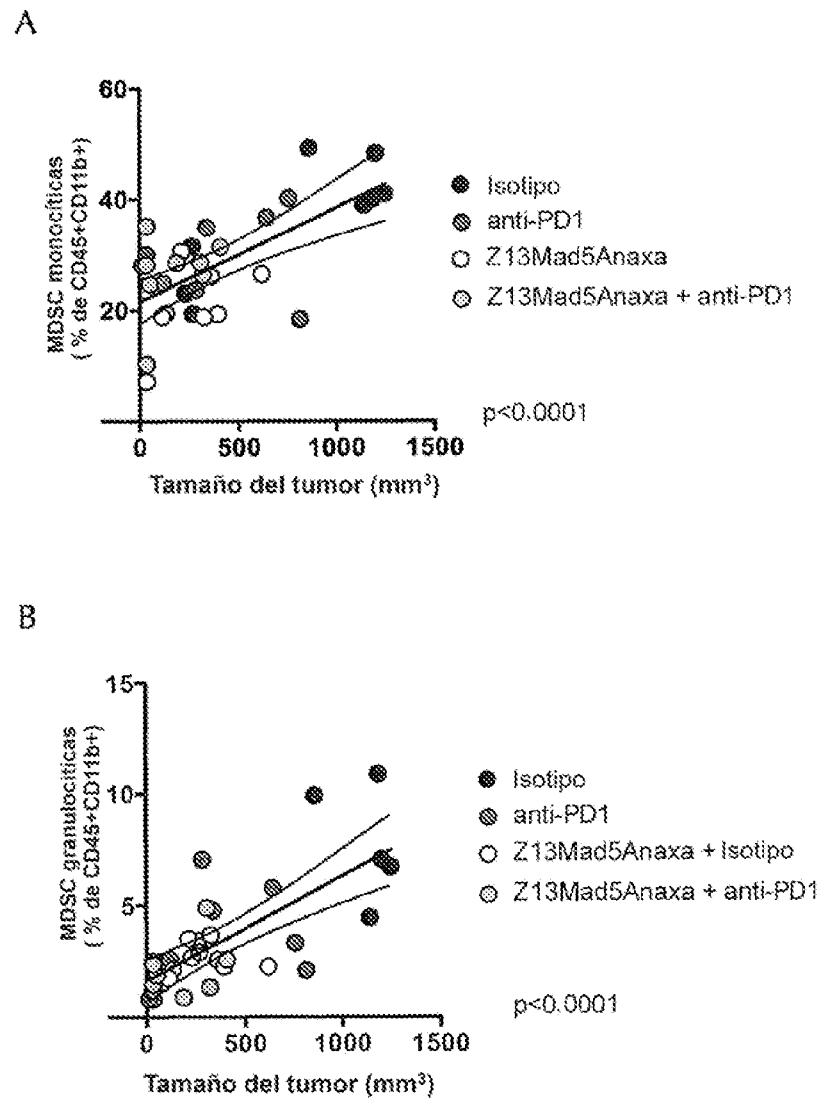
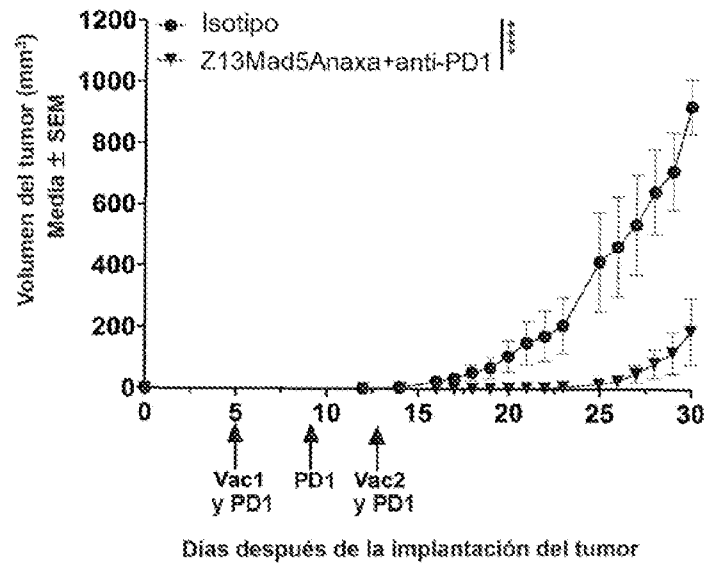


Fig. 5

A



B

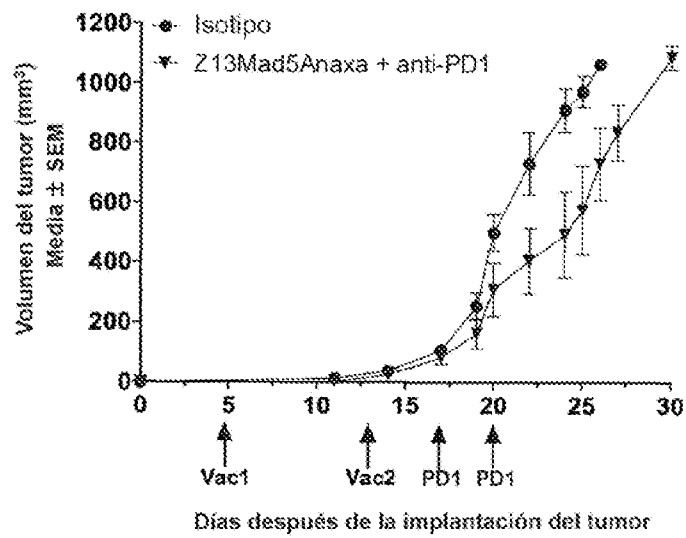


Fig. 6

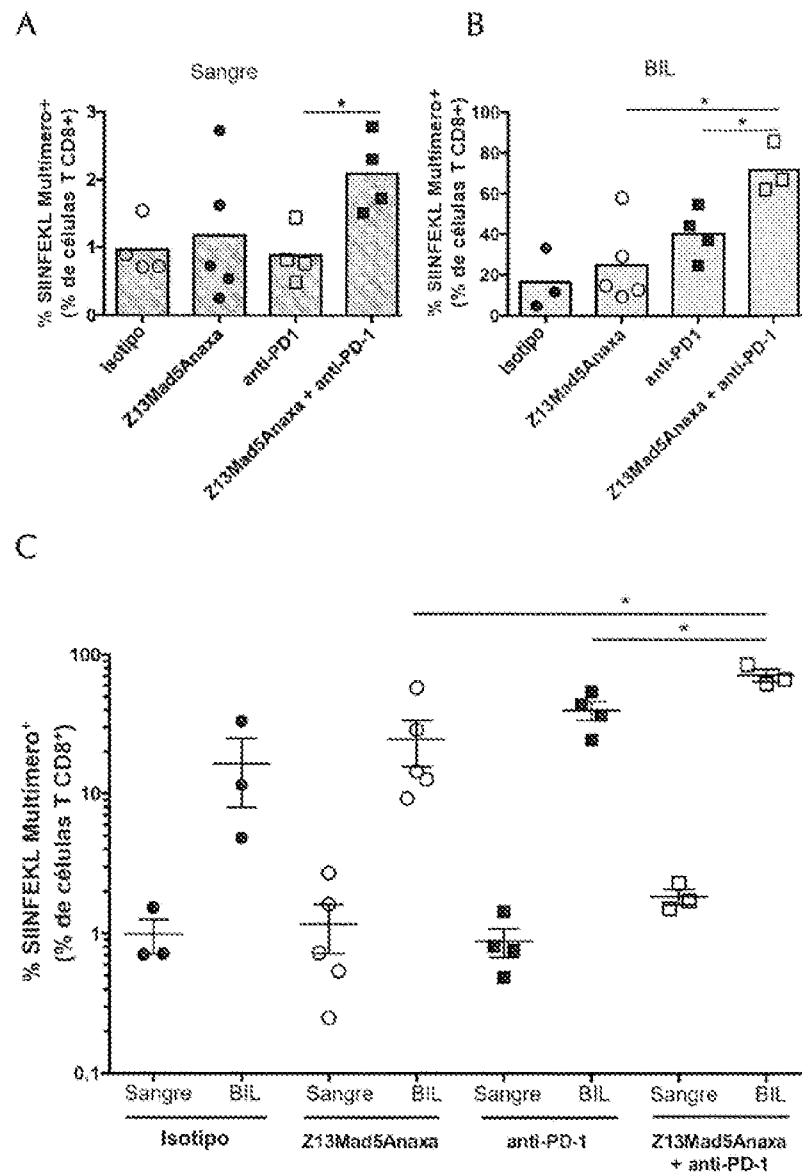
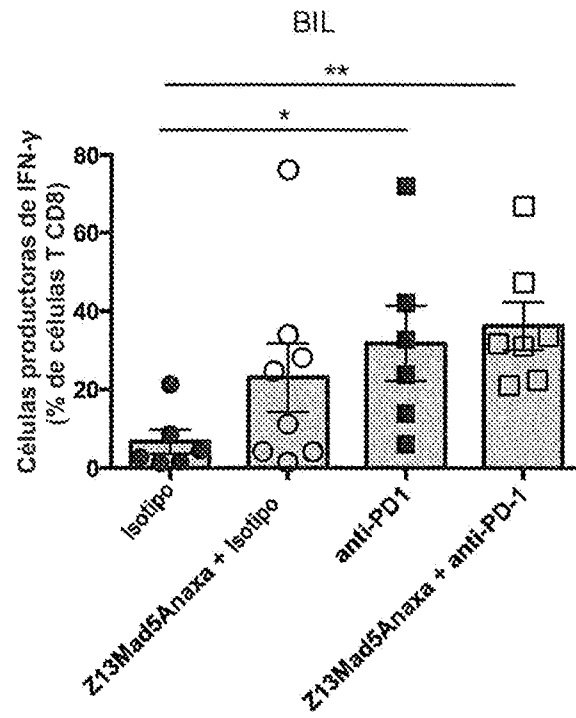


Fig. 7

A



B

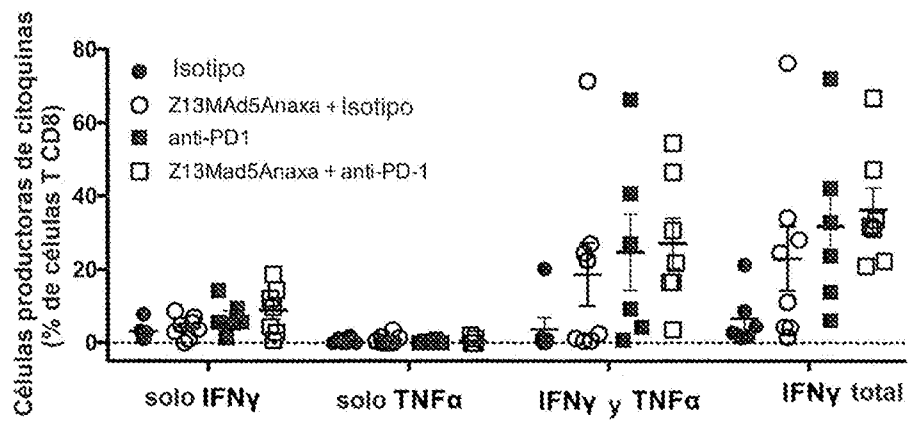


Fig. 8

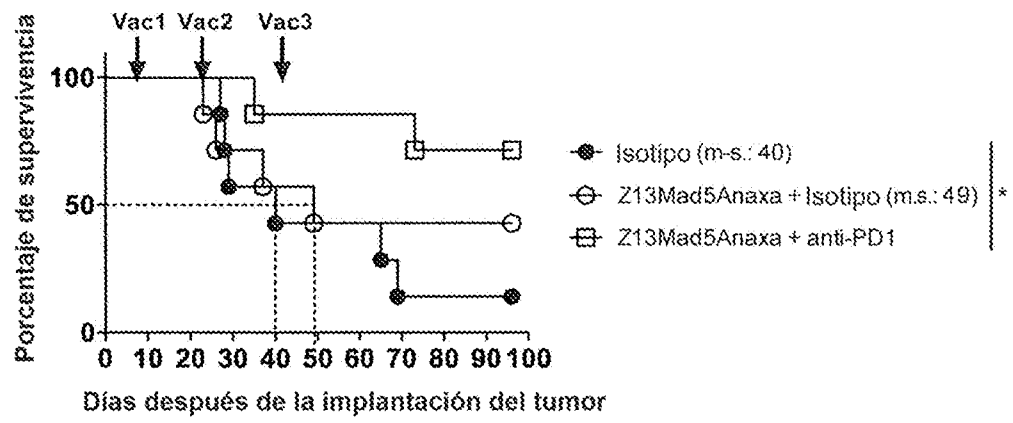


Fig. 9

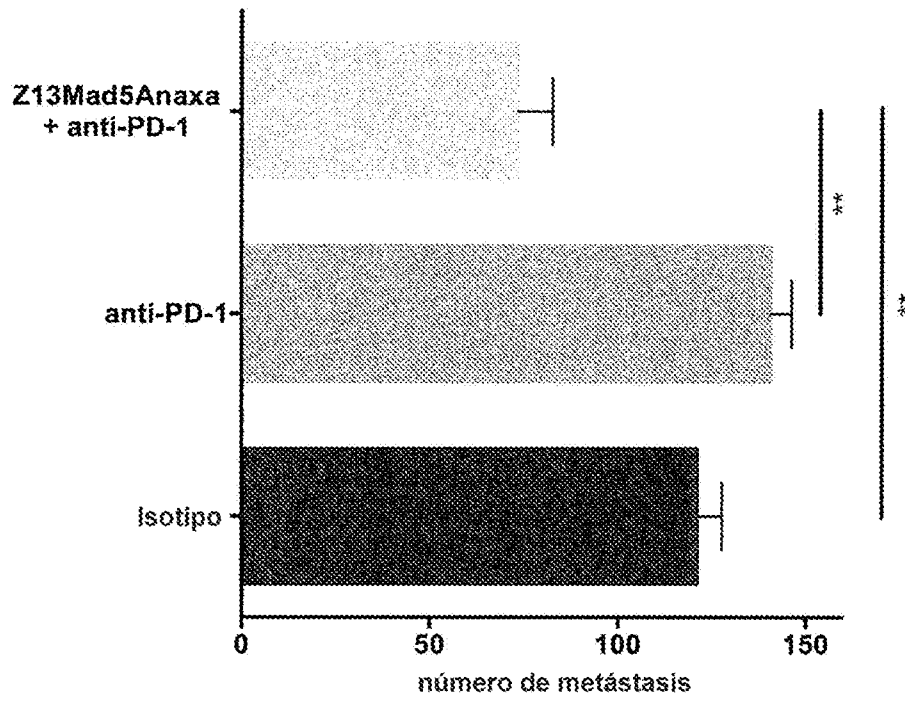


Fig. 10

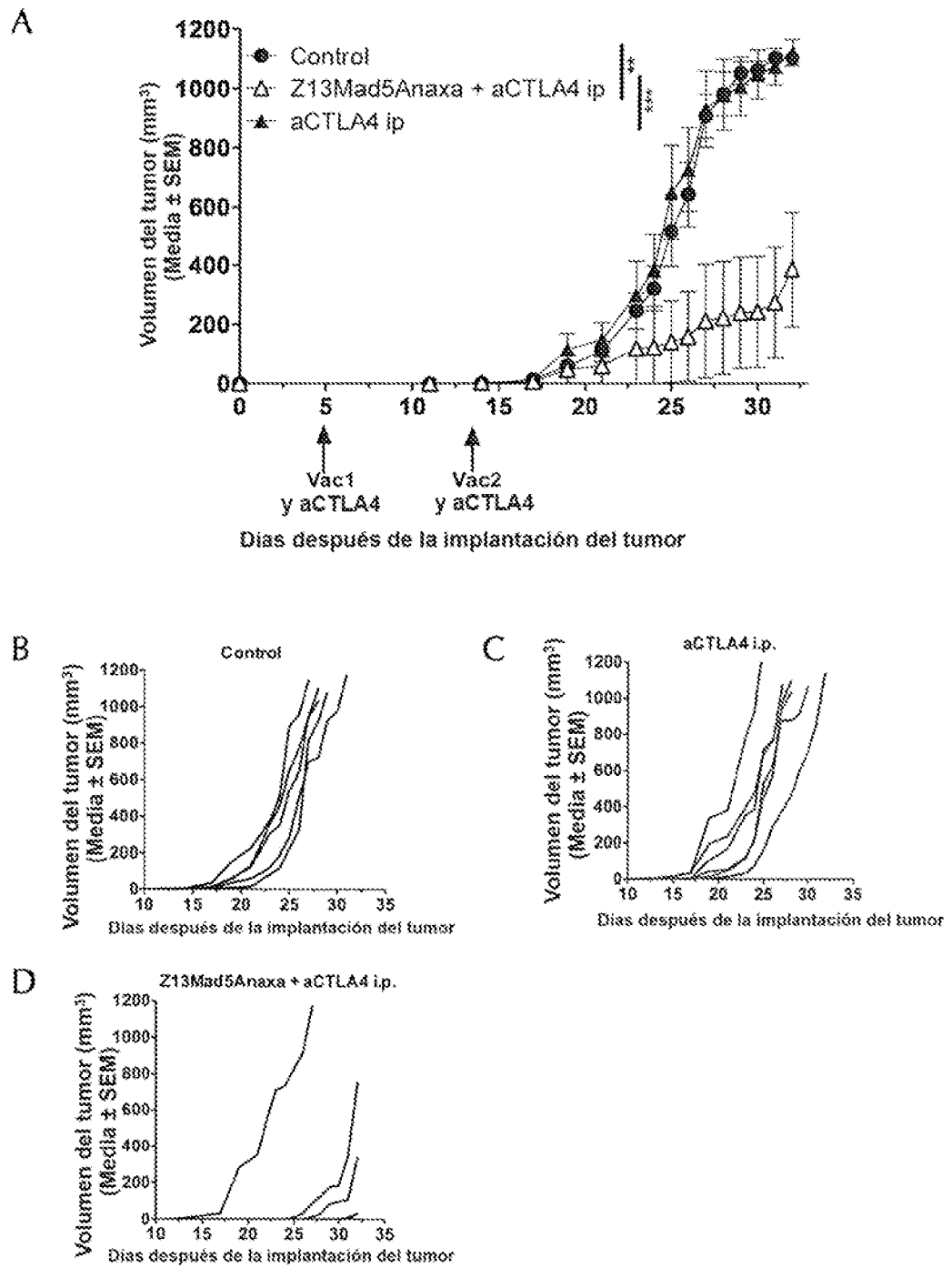


Fig. 11

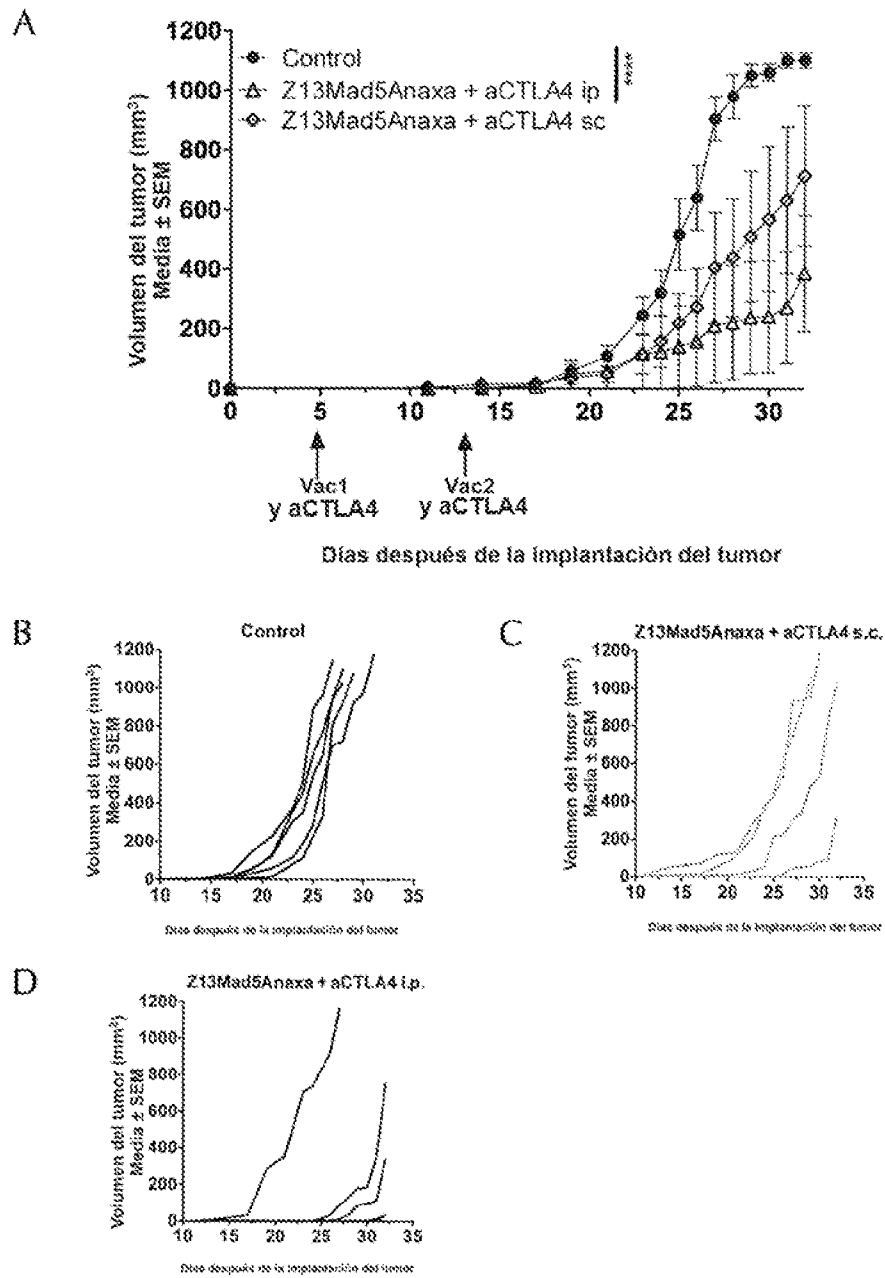
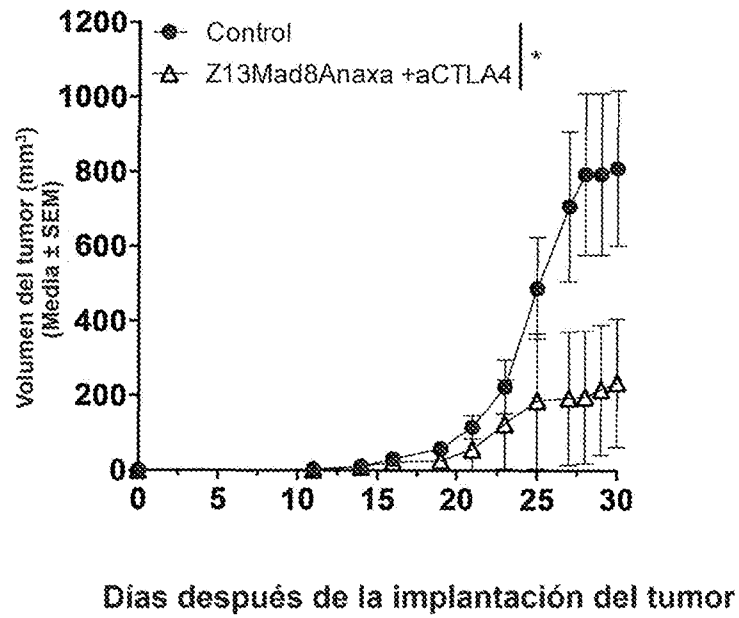
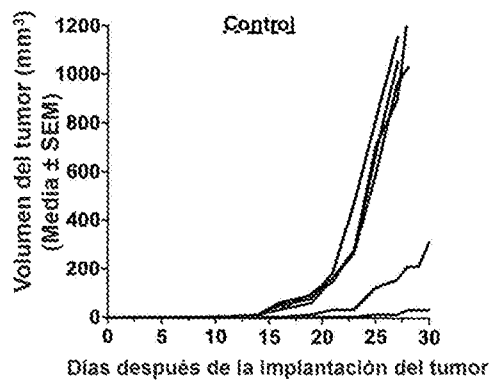


Fig. 12

A



B



C

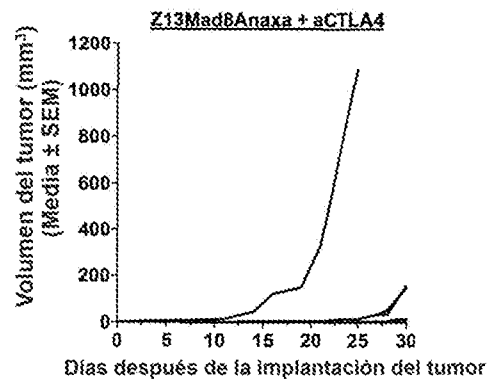
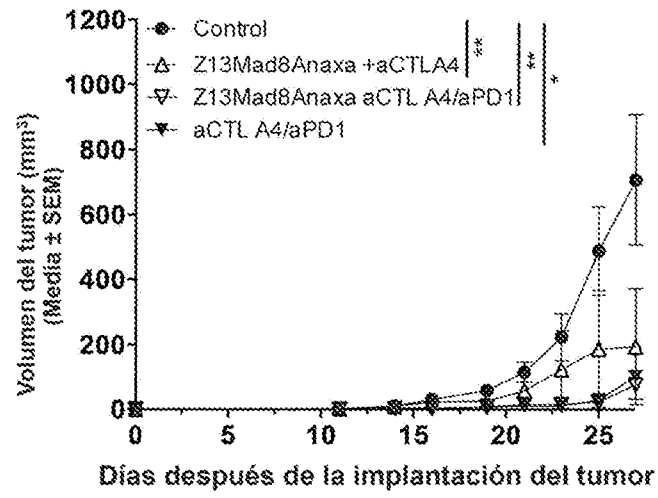
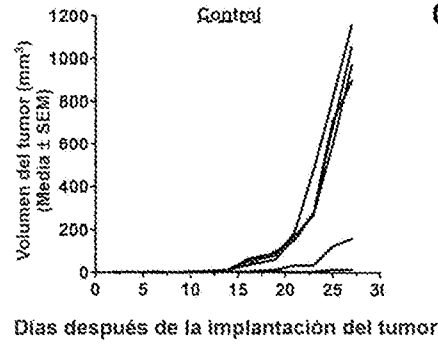


Fig. 13

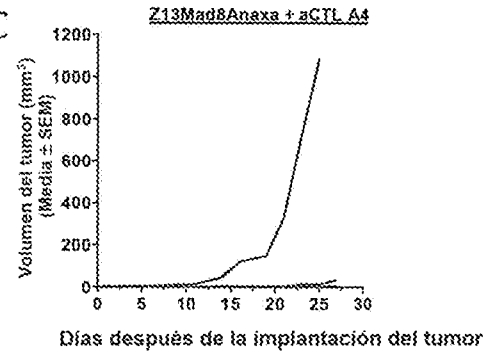
A



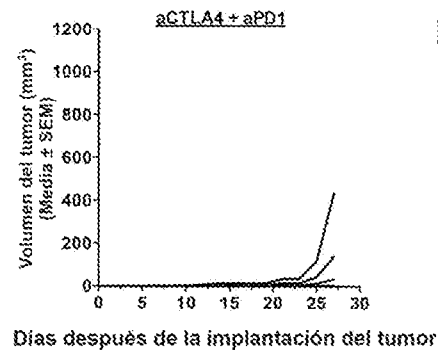
B



C



D



E

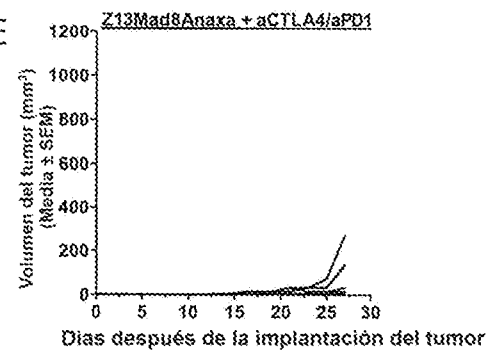
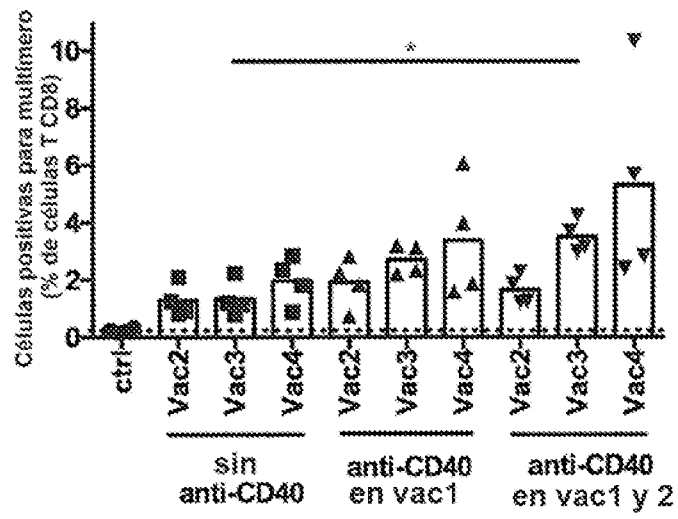


Fig. 14

A



B

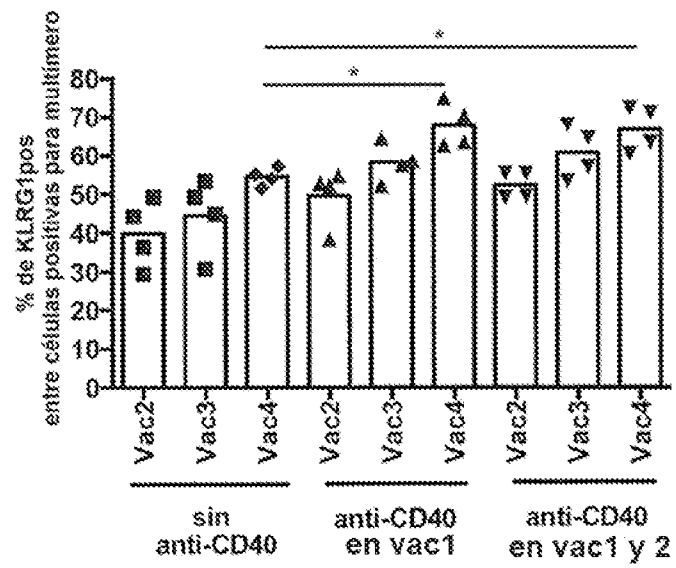
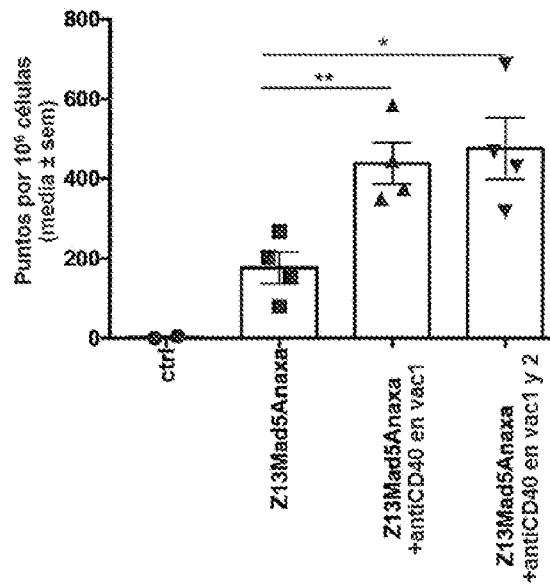


Fig. 15

A



B

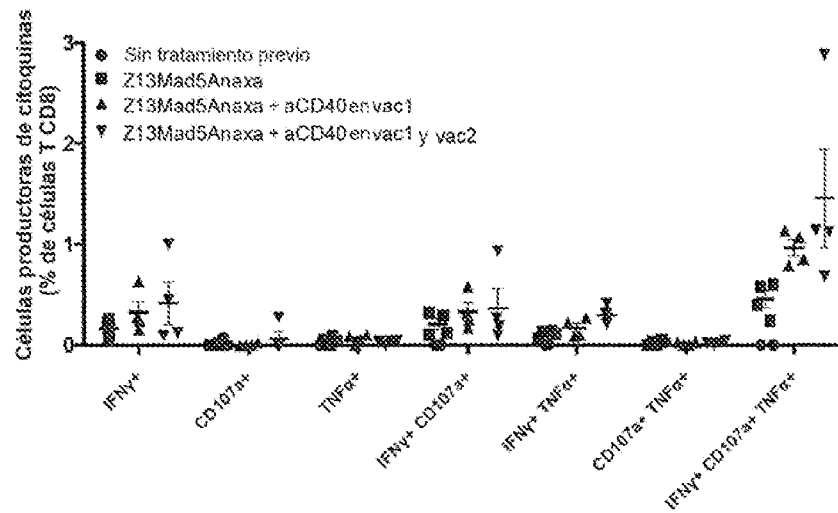
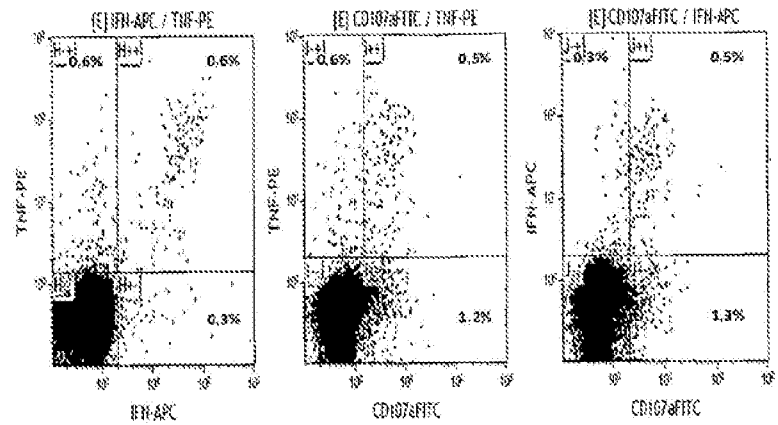
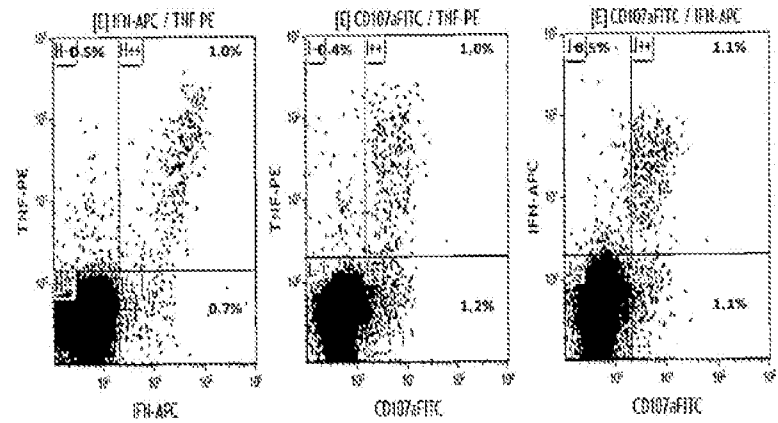


Fig. 16

Z13Mad5Anaxa



Z13Mad5Anaxa
+ antiCD40 en vac1



Z13Mad5Anaxa
+ antiCD40 en vac1 y
vac2

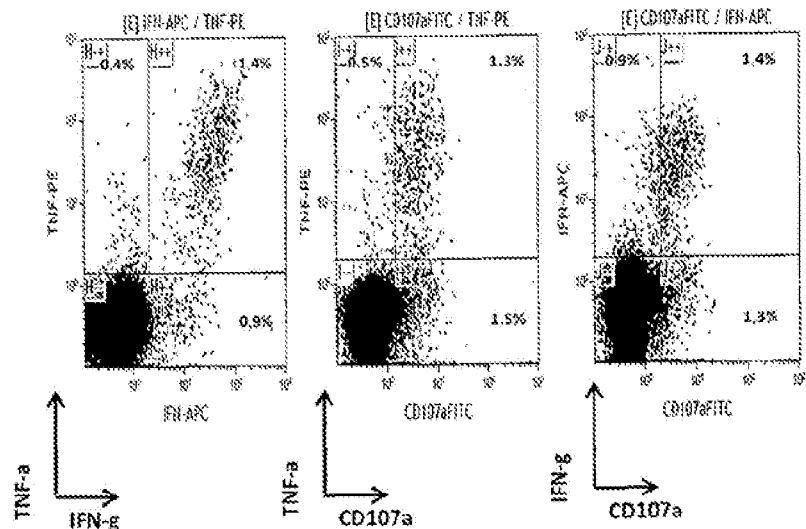


Fig. 17

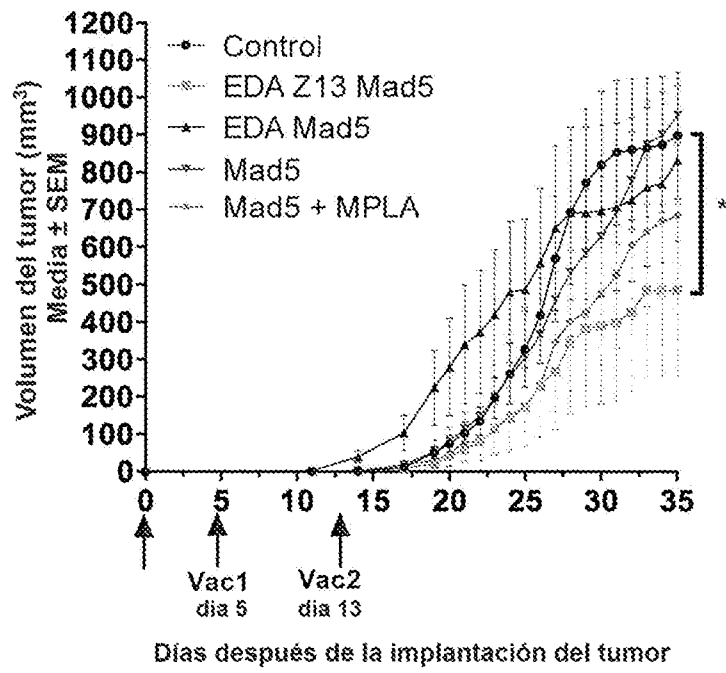


Fig. 18

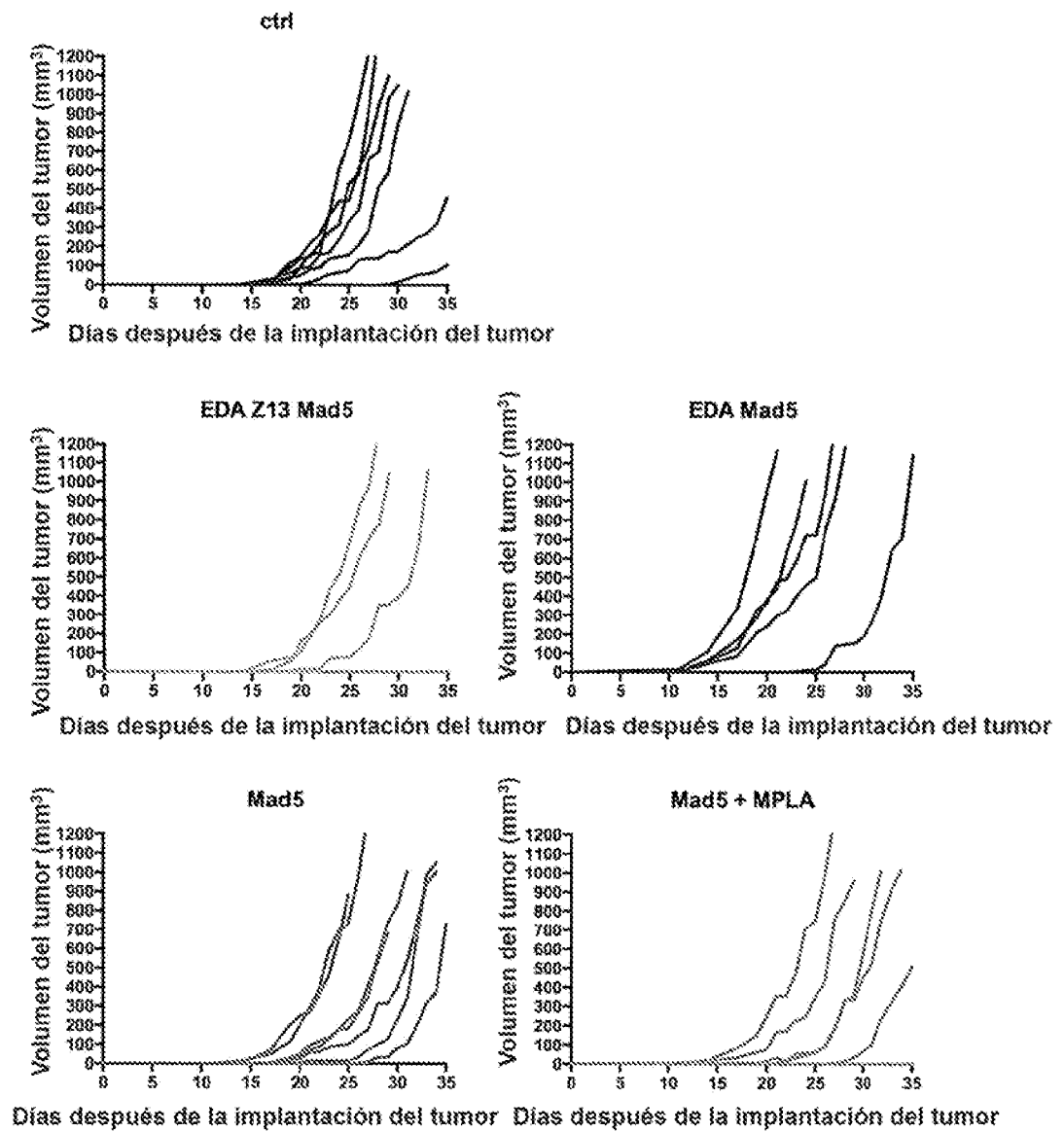
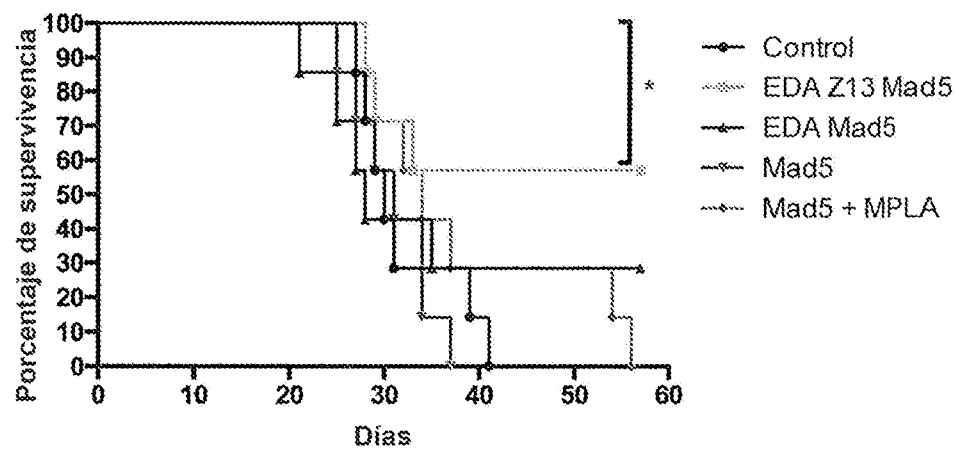


Fig. 19

A



B

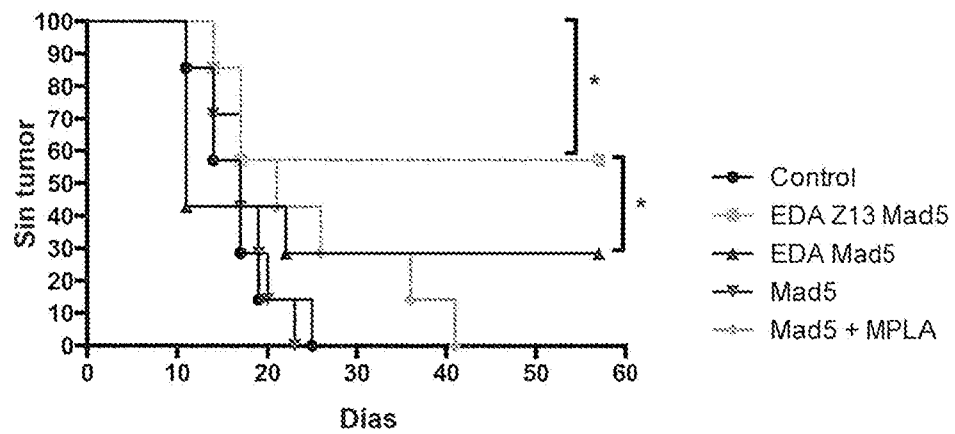


Fig. 20

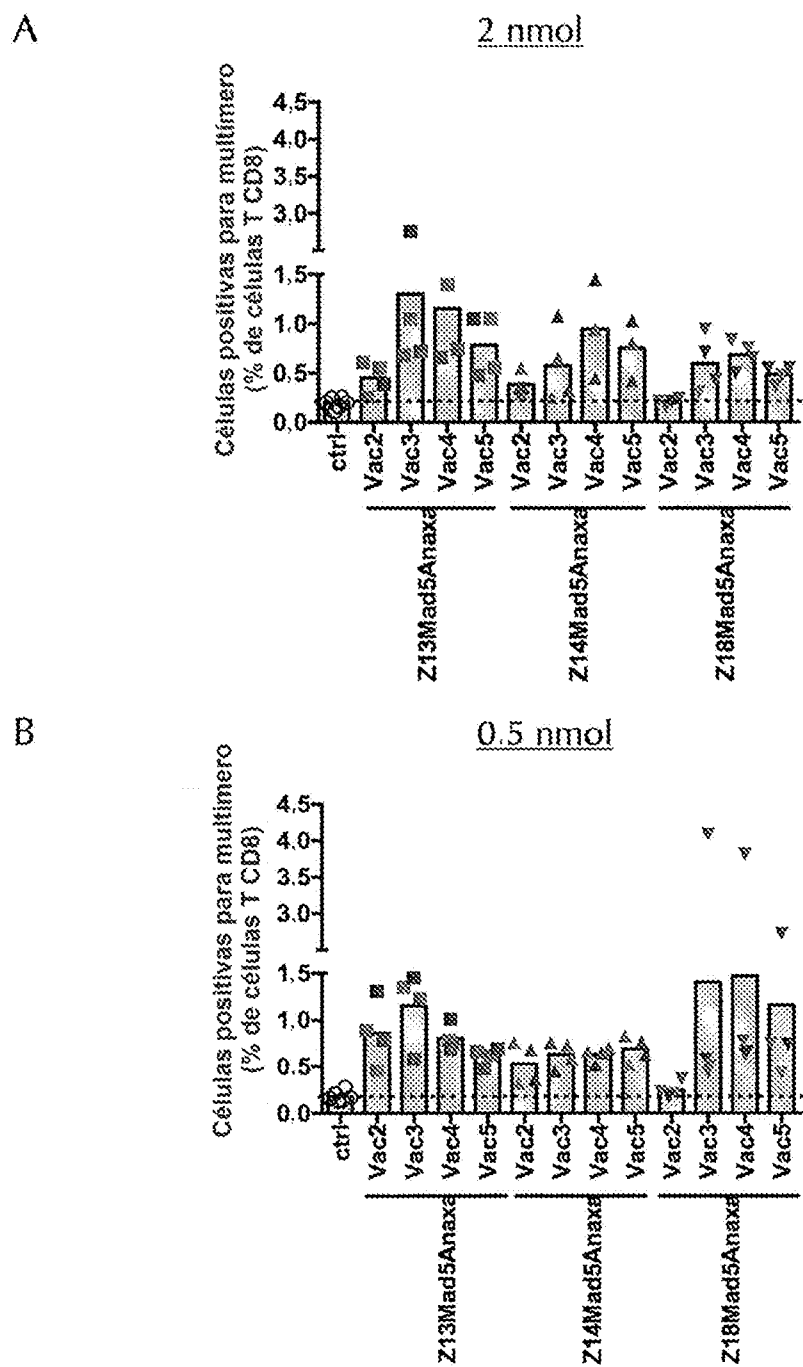


Fig. 21

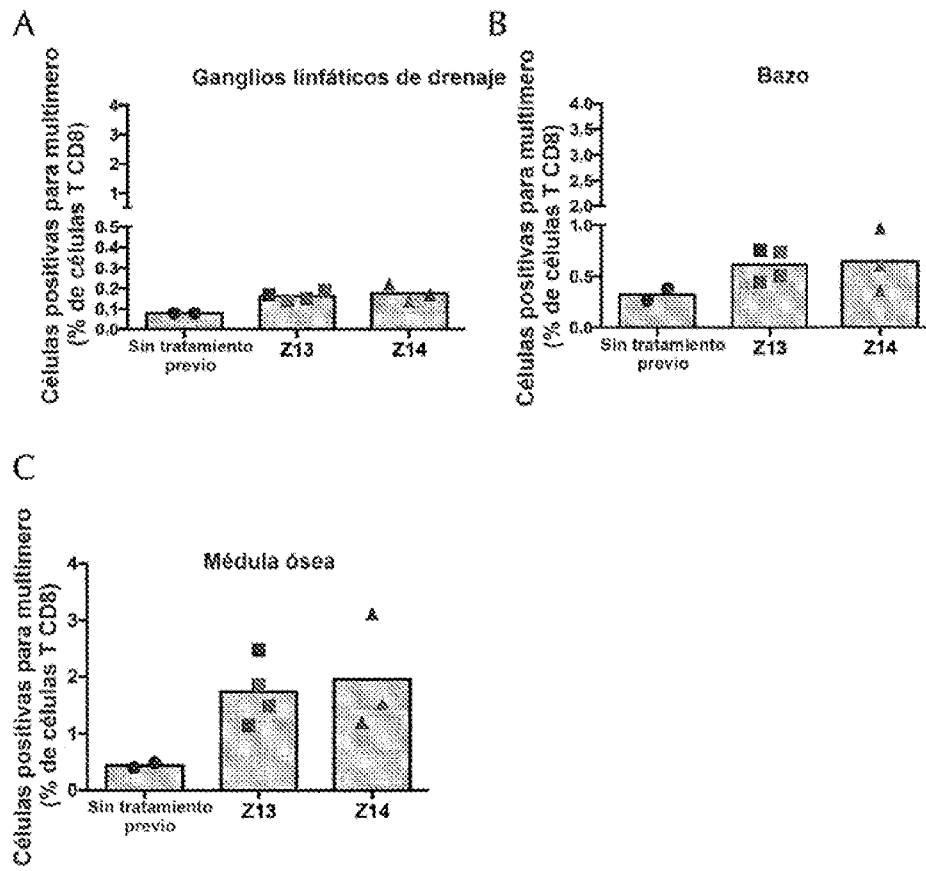
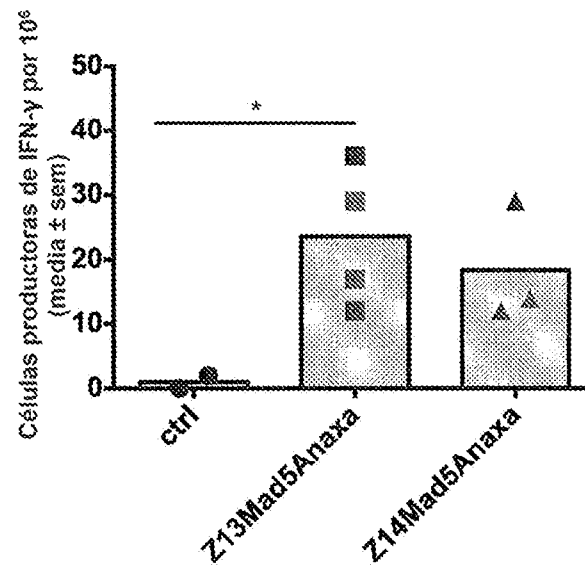


Fig. 22

A



B

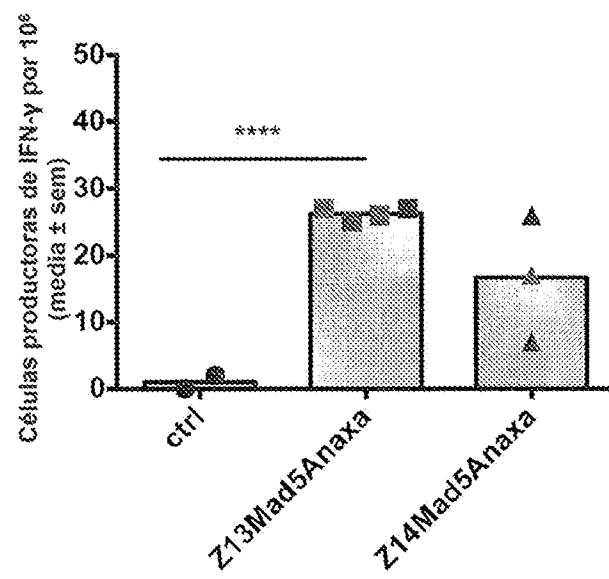


Fig. 23

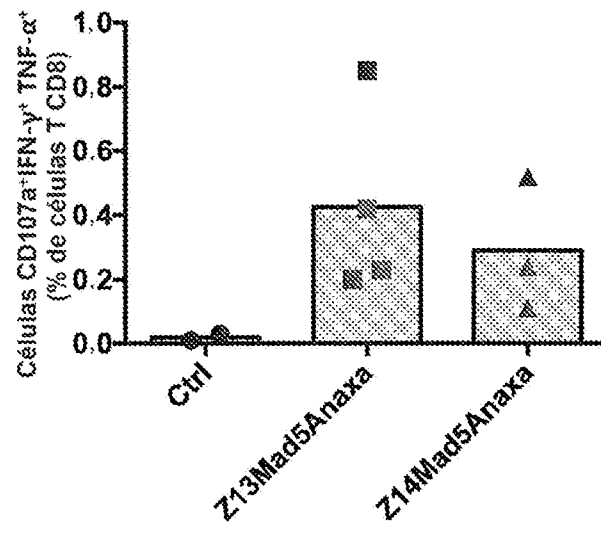
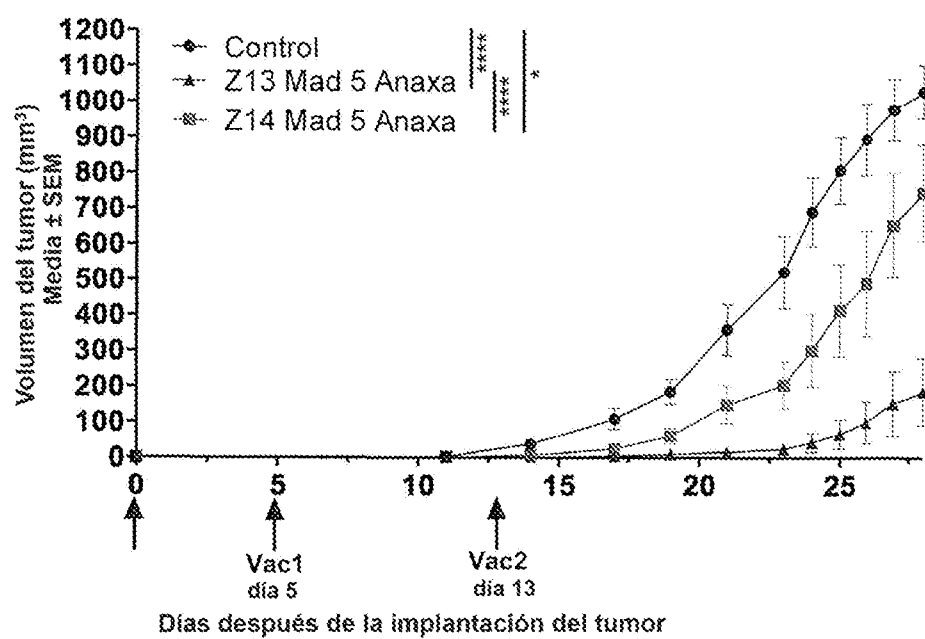


Fig. 24

A



B

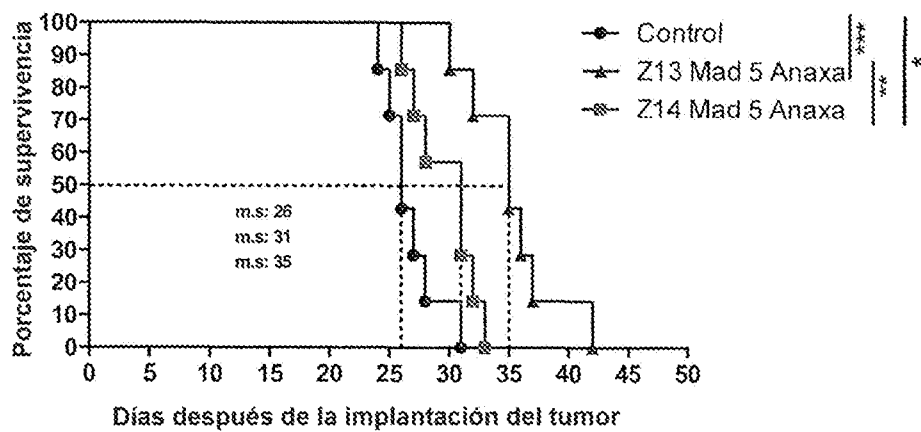
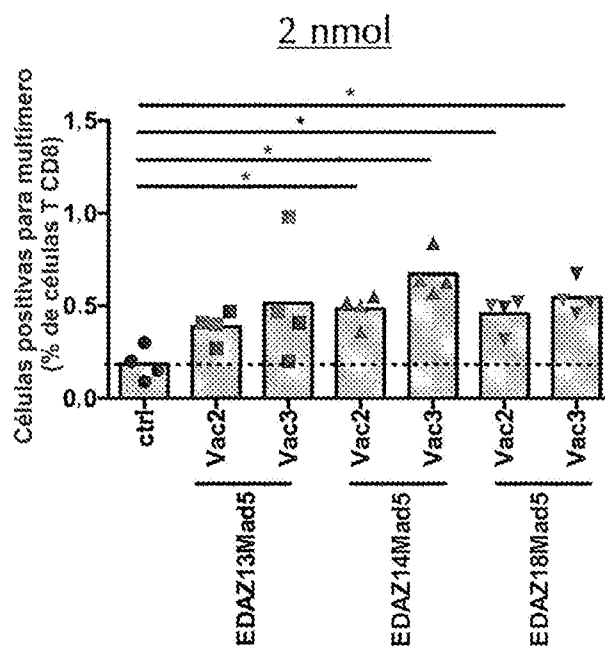


Fig. 25

A



B

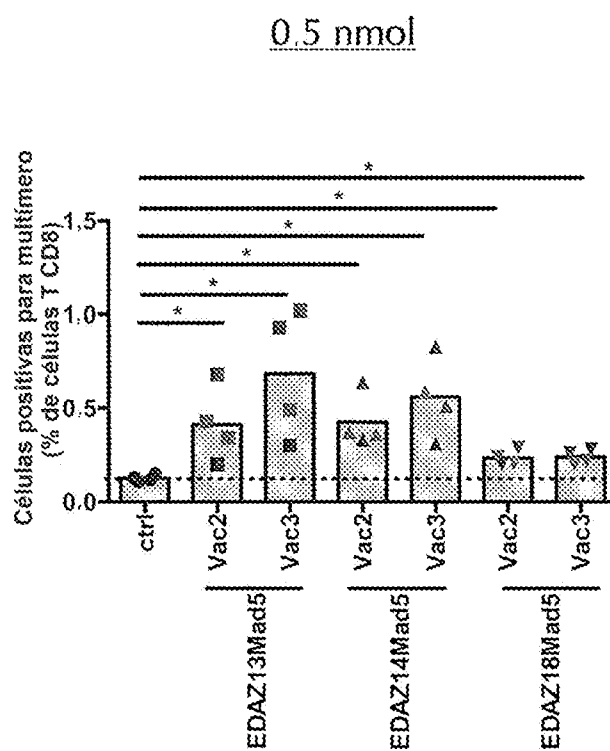
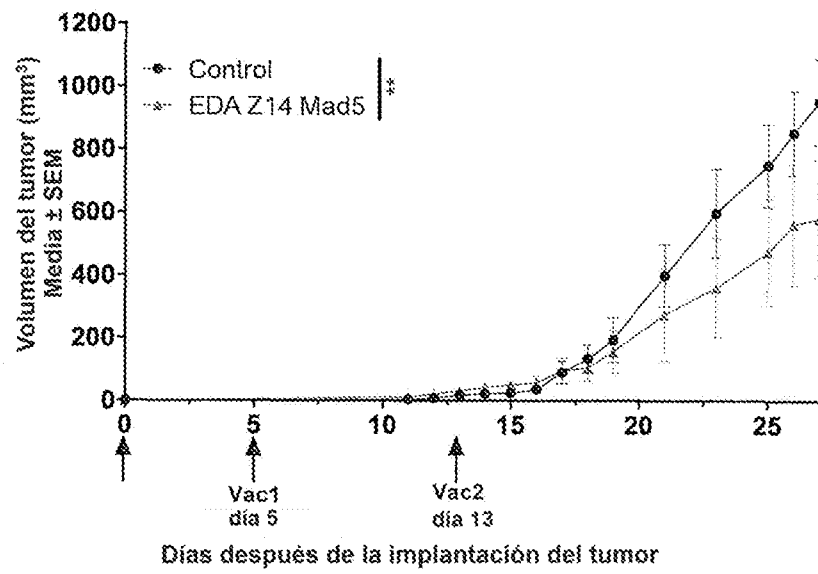


Fig. 26

A



B

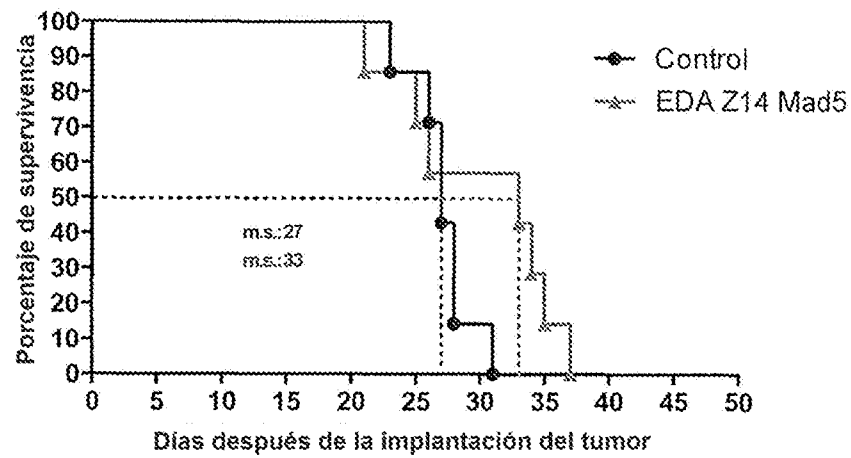


Fig. 27

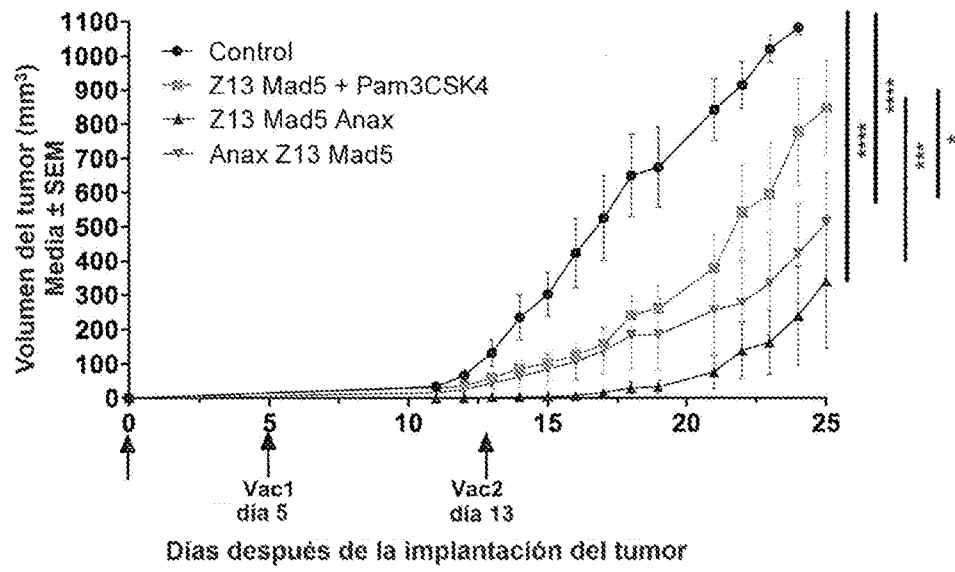


Fig. 28

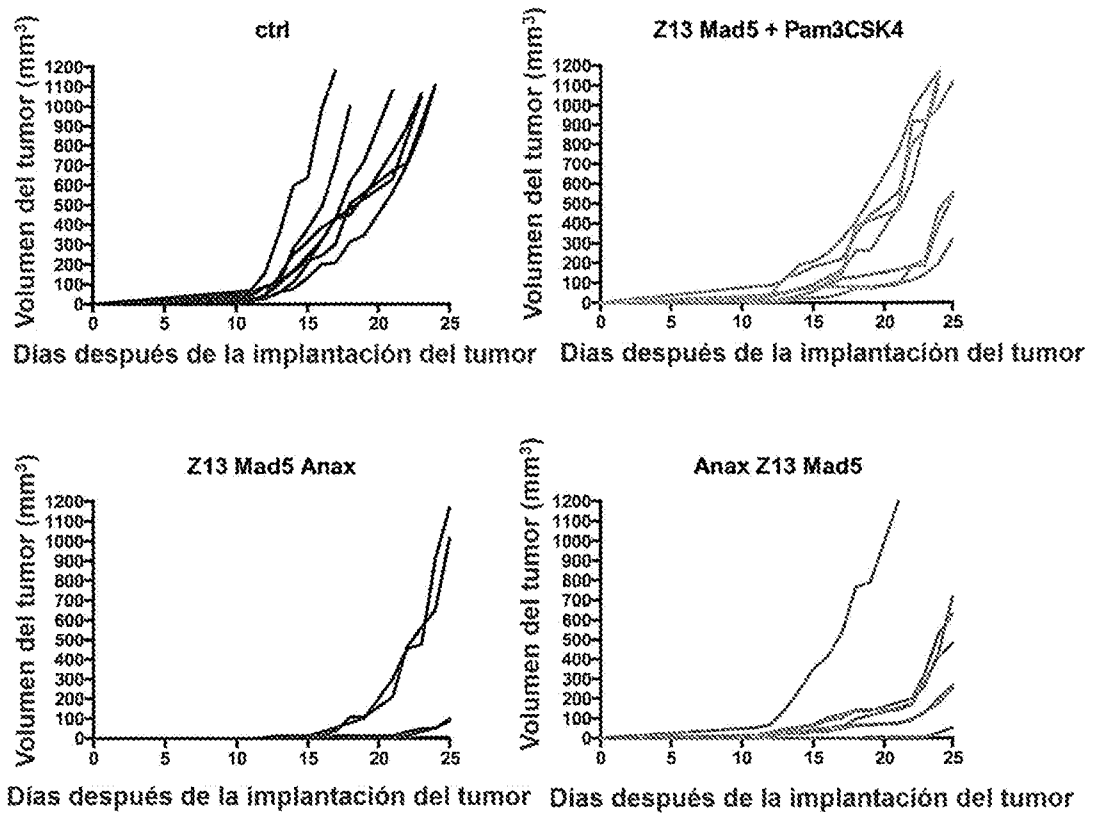


Fig. 29

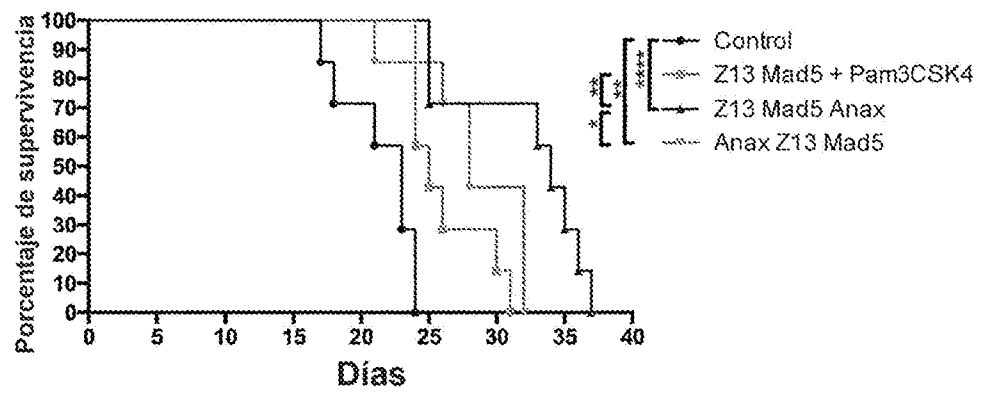


Fig. 30

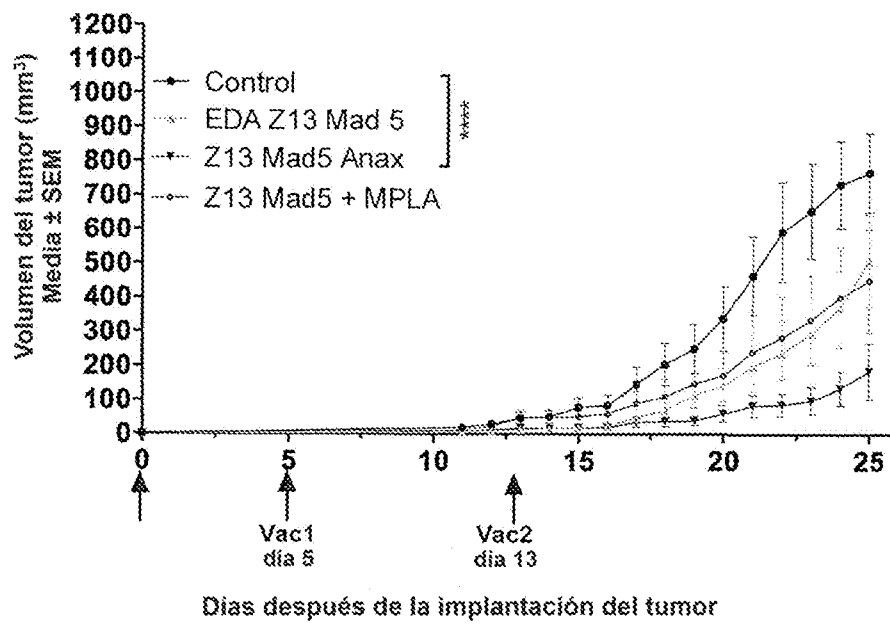


Fig. 31

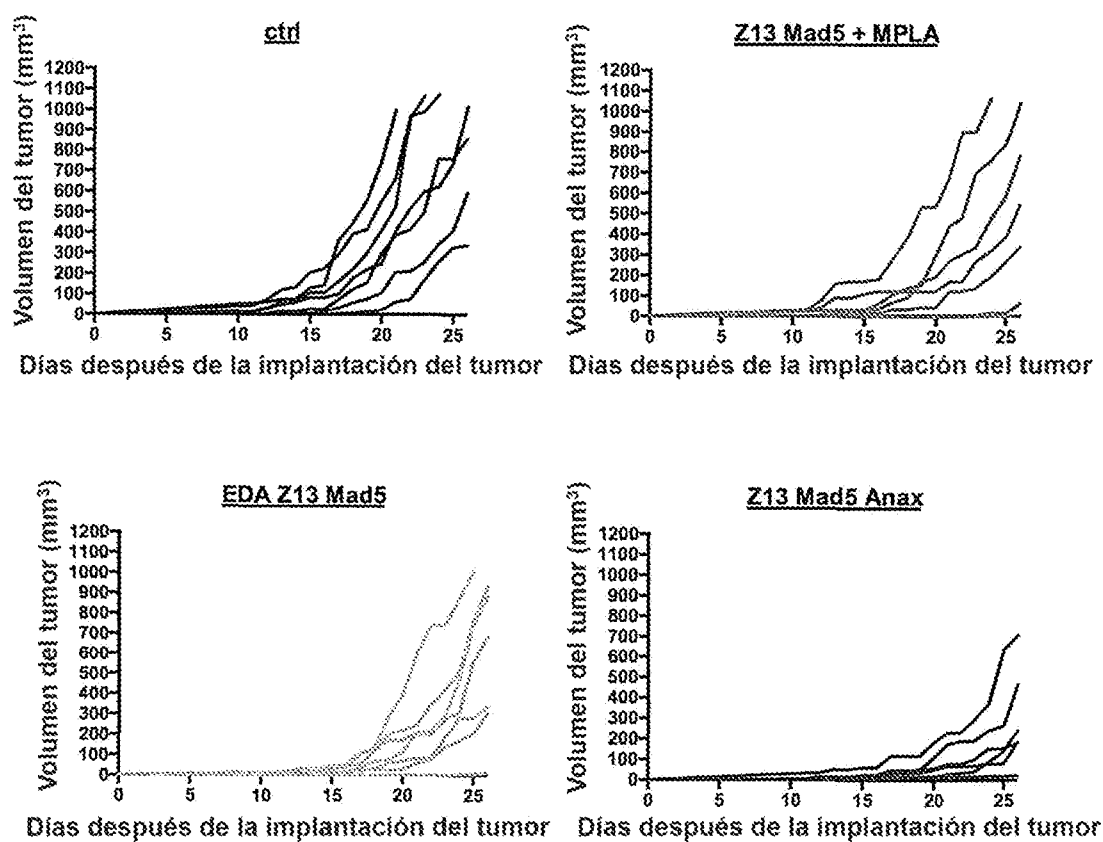


Fig. 32

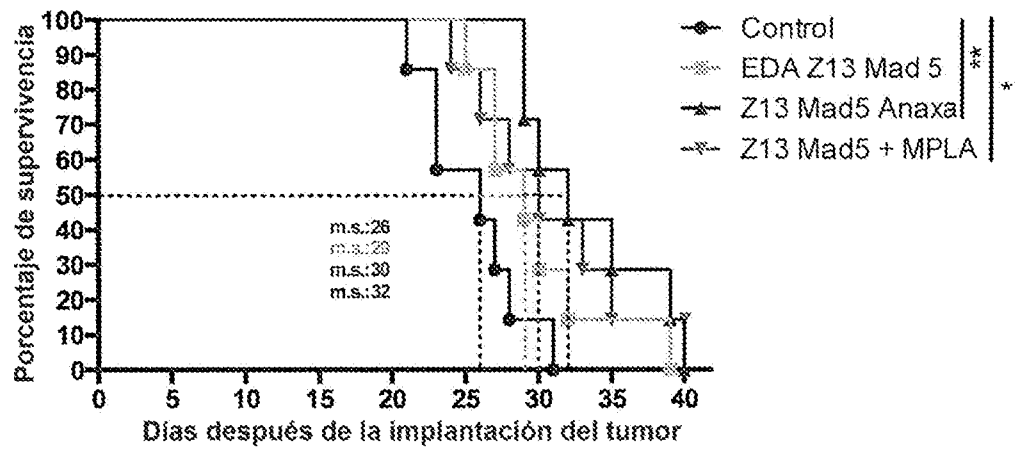
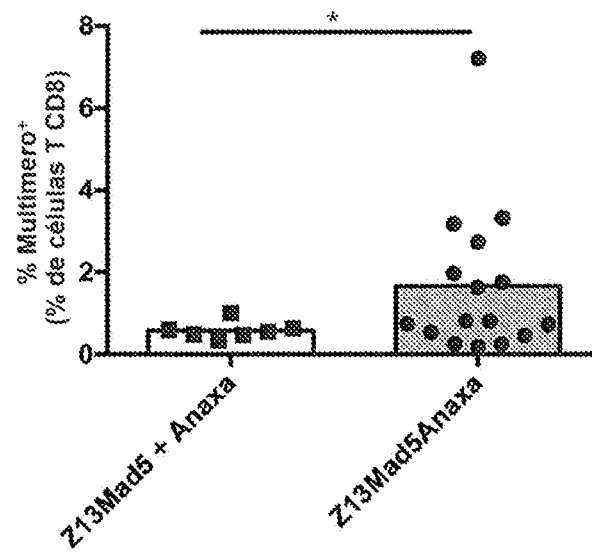


Fig. 33

A



B

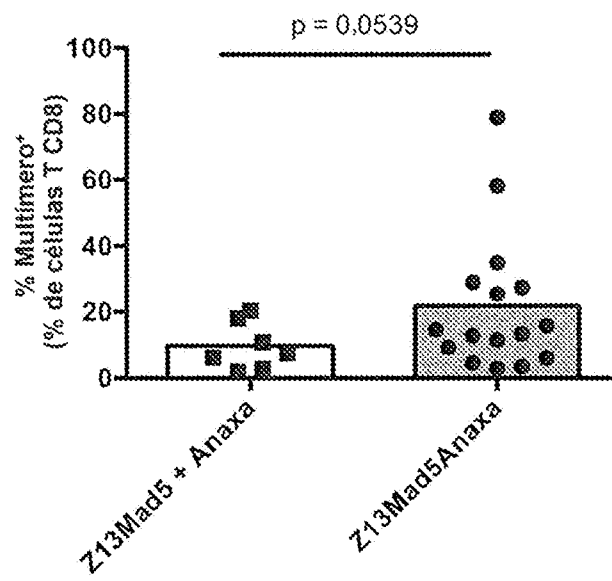


Fig. 34

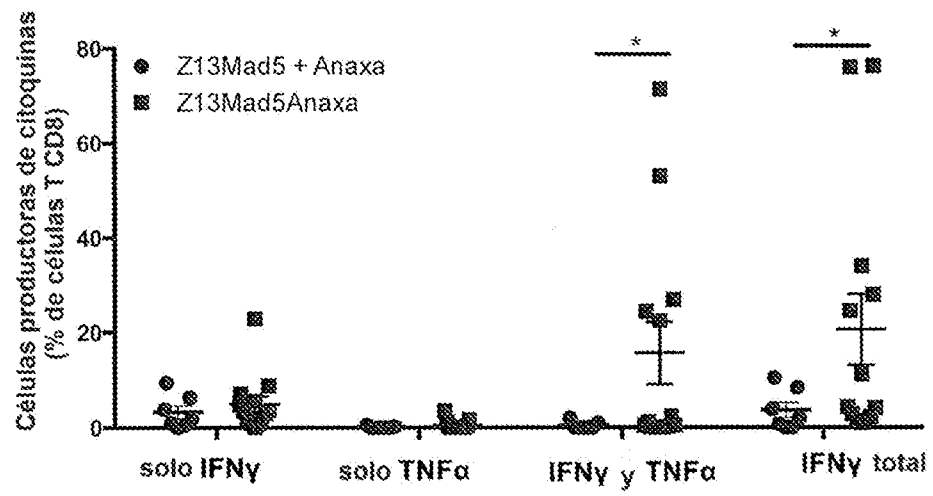


Fig. 35

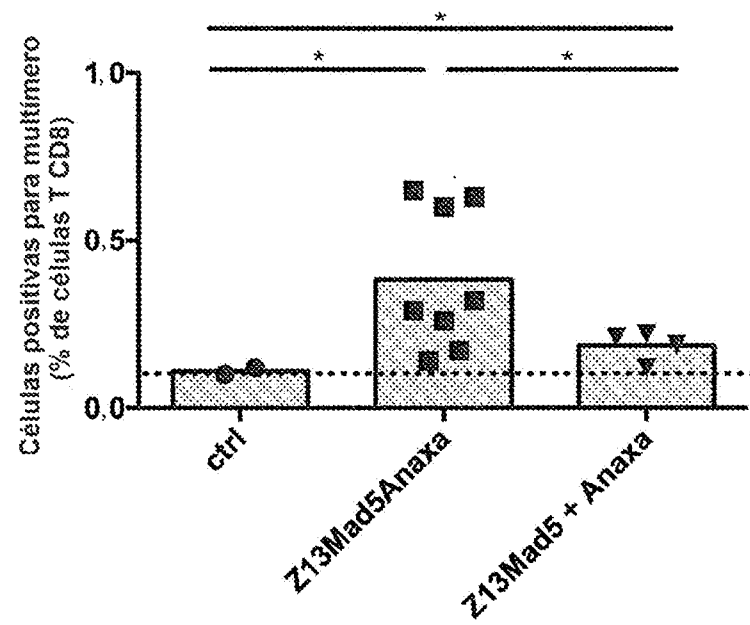
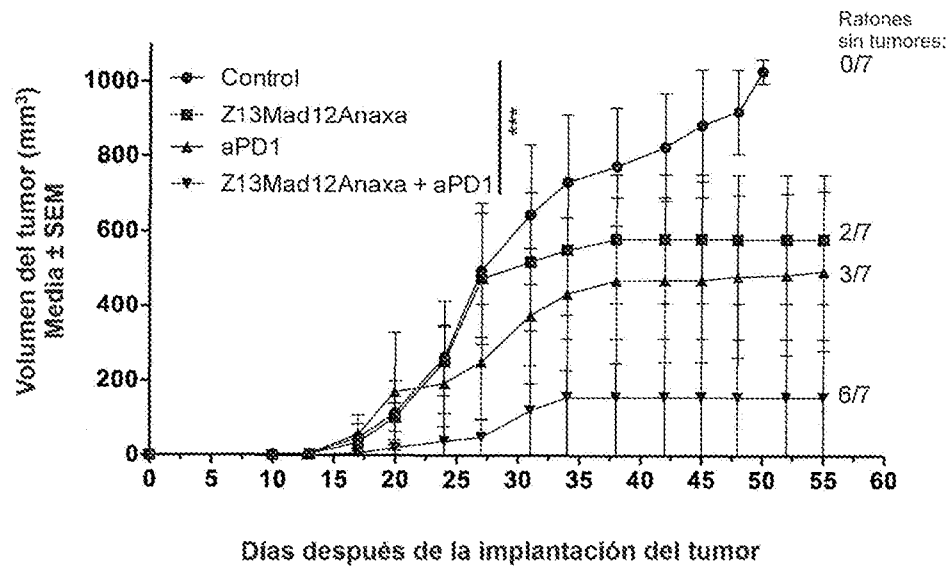


Fig. 36

A



B

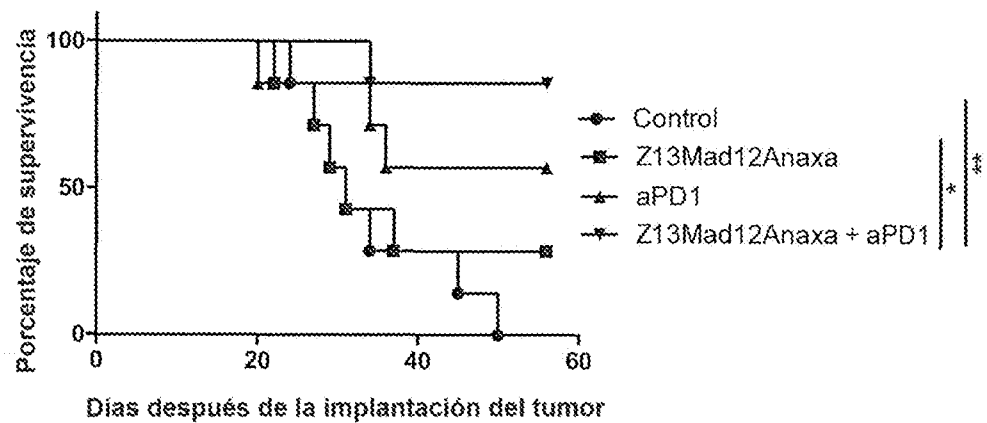


Fig. 37

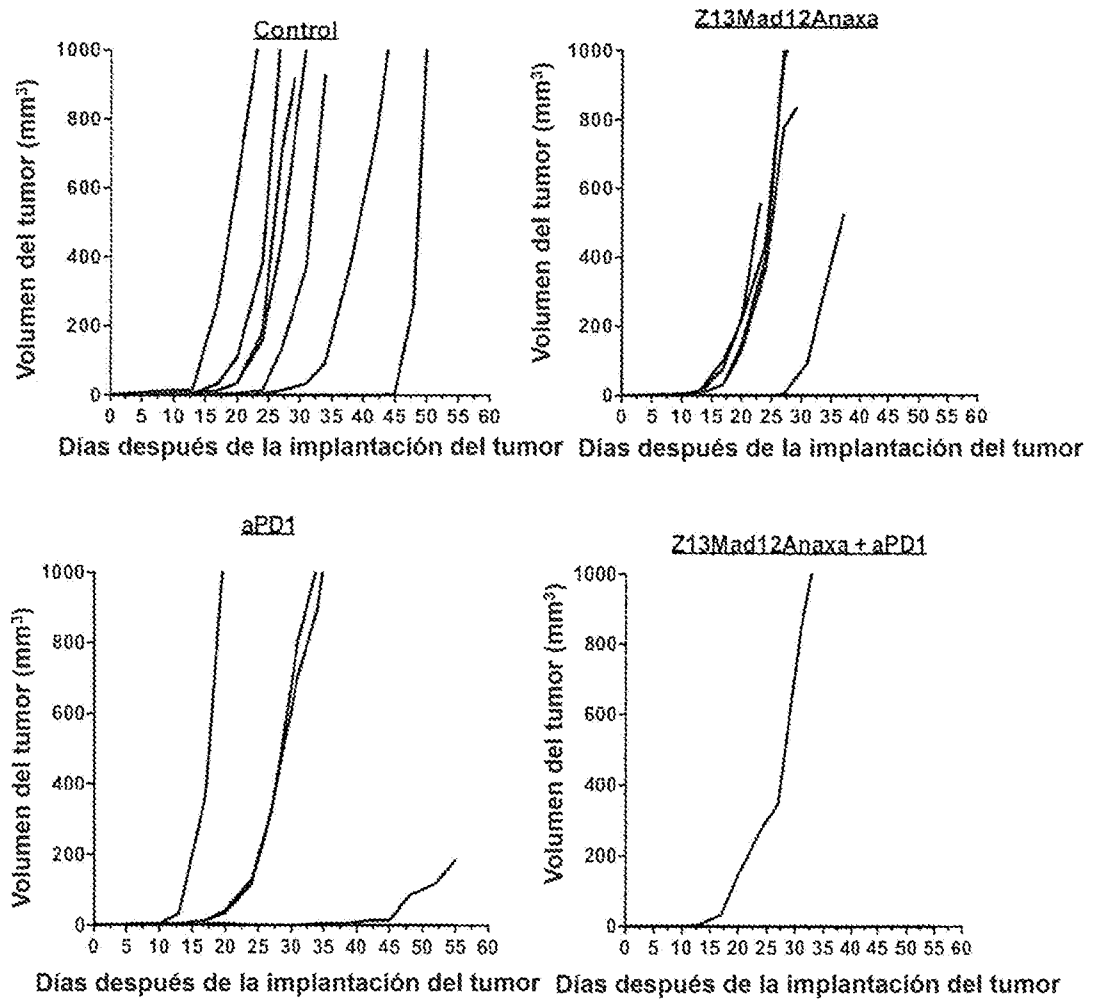
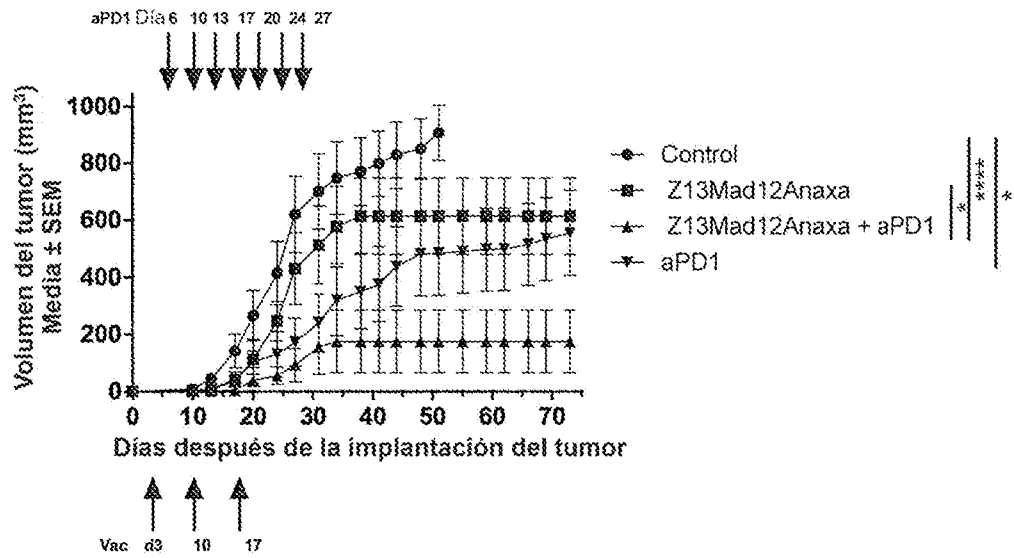


Fig. 38

A



B

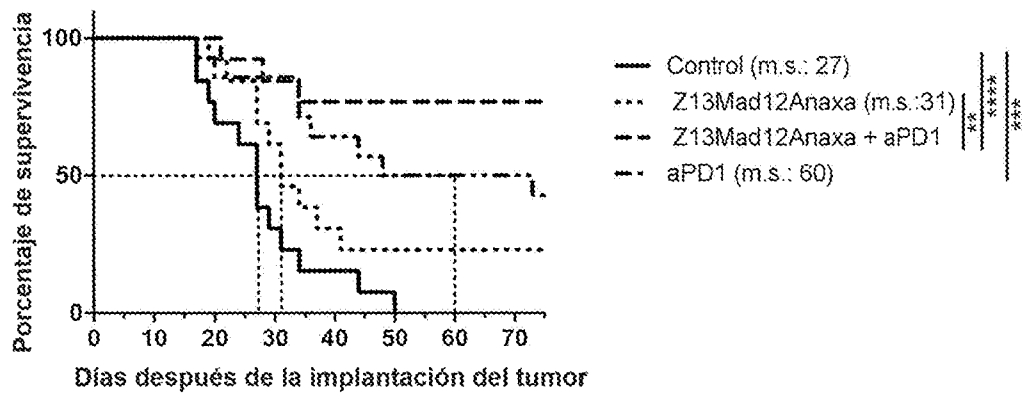


Fig. 39

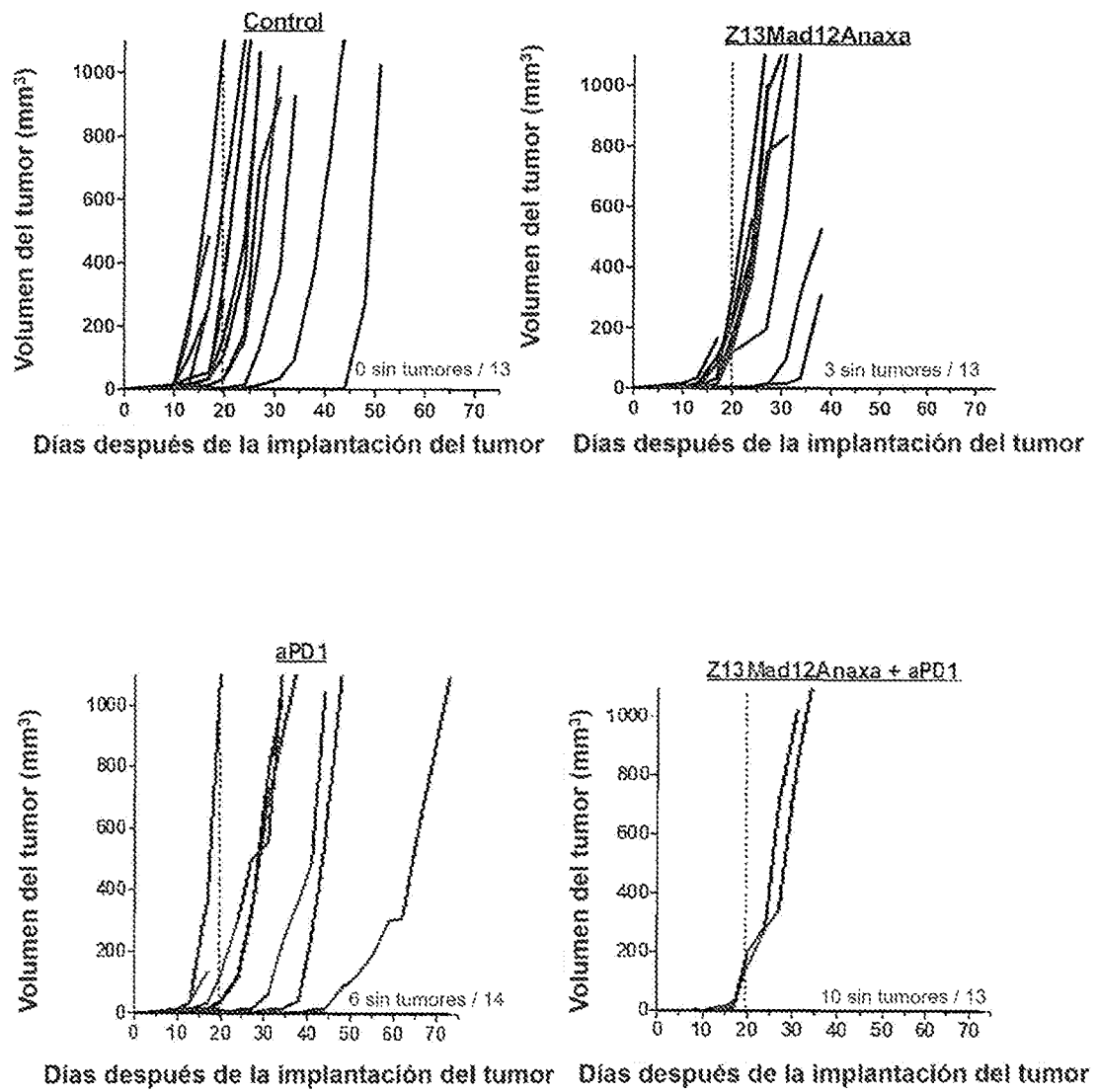


Fig. 40