

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 957**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2017** **PCT/EP2017/063589**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.12.2017** **WO17207814**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2017** **E 17729078 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2023** **EP 3463436**

54 Título: **Una vacuna junto con un inhibidor del punto de control inmunitario para usar en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**02.06.2016 EP 16172760**

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

**17.04.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GAUDERNACK, GUSTAV y**  
**TORNES, AUDUN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

### Observaciones:

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

ES 2 965 957 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

Una vacuna junto con un inhibidor del punto de control inmunitario para usar en el tratamiento del cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una mezcla de polipéptidos y un inhibidor del punto de control inmunitario para usar en medicina. En el presente documento también se divulga una molécula de ácido nucleico, un receptor de linfocitos T o un linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T para usar en medicina. La invención se refiere además a una  
10 composición y a un kit adecuados para el tratamiento del cáncer.

**Antecedentes de la invención**

El cáncer es una enfermedad caracterizada por un crecimiento nuevo y anormal de células en un individuo. El cáncer  
15 se desarrolla mediante un proceso de varias etapas que implica varios acontecimientos mutacionales que permiten que las células cancerosas se desarrollen, es decir, células que presentan propiedades de invasión y metástasis.

Se han propuesto numerosos enfoques para el tratamiento del cáncer. Un enfoque es el uso de péptidos antigénicos que comprenden fragmentos de antígenos asociados a tumores (es decir, vacunas contra el cáncer basadas en  
20 péptidos). Dichos péptidos antigénicos, cuando se administran a un individuo, provocan una respuesta de linfocitos T restringida al MHC de clase I o clase II contra células que expresan los antígenos asociados al tumor.

Debe apreciarse que para que se produzcan dichas respuestas de linfocitos T, el polipéptido antigénico debe presentarse en una molécula del MHC. Existe una amplia gama de variabilidad en las moléculas del MHC en las  
25 poblaciones humanas. En particular, diferentes individuos tienen diferentes alelos HLA que tienen diferente afinidad de unión por los polipéptidos, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Por lo tanto, un individuo que tiene un alelo HLA particular puede tener moléculas del MHC que se unirán a un polipéptido de una secuencia particular, mientras que otros individuos que carecen del alelo HLA tendrán moléculas del MHC incapaces de unirse y presentar el polipéptido (o, al menos, sus moléculas del MHC tendrán una afinidad muy baja por el polipéptido y, por  
30 lo tanto, lo presentarán en un nivel relativamente bajo). Por tanto, la variabilidad de las moléculas del MHC en la población humana significa que proporcionar una vacuna contra el cáncer basada en péptidos con una amplia cobertura poblacional es problemático porque no todos los individuos generarán una respuesta inmunitaria contra un antígeno determinado.

Un enfoque alternativo al tratamiento del cáncer es dirigirse a las proteínas implicadas en los puntos de control  
35 inmunitario para modular la respuesta inmunitaria de un individuo al cáncer. Los mecanismos de control inmunitario que normalmente regulan negativamente el sistema inmunitario para prevenir respuestas inmunitarias excesivas e incontroladas incluyen la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1). CTLA-4 y PD-1 regulan negativamente las vías de activación de los linfocitos T y, en personas  
40 con cáncer, esto puede dar lugar a una regulación negativa de las respuestas inmunitarias naturales contra los cánceres. Se espera que el bloqueo de estos puntos de control mediado por anticuerpos libere la potencia de la respuesta inmunitaria inhibida y mejore las tasas de supervivencia. El bloqueo de CTLA-4 en un entorno clínico, por ejemplo, utilizando los anticuerpos anti-CTLA-4 ipilimumab o tremelimumab, dio como resultado beneficios de supervivencia duraderos en aproximadamente un 20 % de los pacientes con melanoma metastásico (McDermott *et al.*  
45 *Ann Oncol.* 2013 24(10): 2694-2698). La terapia anti-CTLA-4 también se ha investigado en otros cánceres, tales como el cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, linfoma, cáncer gástrico y cáncer de mama (Postow *et al.*, *J Clin Oncol.* 2015 33(17):1974-82; Kyi y Postow, *FEBS Lett.* 2014 588(2):368-76).

Las mejores vacunas contra el cáncer basadas en péptidos terapéuticos son capaces de provocar respuestas  
50 inmunitarias específicas del cáncer en la mayoría de los pacientes, normalmente del 60 al 80 % (Kyte *et al.* *Clin Cancer Res.* 2011 17(13):4568-80; Brunsvig *et al.* *Cancer Immunol Immunother.* 2006 55(12):1553-64). Sin embargo, las respuestas clínicas como resultado de la vacunación con péptidos generalmente se observan solo en muy pocos pacientes (revisado en Melero *et al.* *Nat Rev Clin Oncol.* 2014 11(9):509-24). Por tanto, se esperaba que la combinación de vacunas contra el cáncer basadas en péptidos con la inhibición de los puntos de control inmunitarios  
55 produciría respuestas inmunitarias mejoradas contra la vacuna y tasas de respuesta clínica más elevadas.

Sin embargo, en un estudio clínico de referencia de fase III que combina ipilimumab con una vacuna peptídica contra gp100 de 9 unidades de melanoma, la combinación no fue mejor que ipilimumab solo y la vacuna sola no tuvo efecto protector (Hodi *et al.* *N Engl J Med.* 2010 363(8):711-23). Se observaron resultados muy similares con una combinación  
60 de otra vacuna contra el melanoma, que contenía tres péptidos de 9 unidades procedentes de Mart 1, gp100 y tirosinasa, e ipilimumab (Sarnaik *et al.* *Clin Cancer Res.* 2011 17(4):896-906).

De nuevo, no se asoció ningún beneficio clínico adicional con la combinación, en comparación con el resultado con ipilimumab solo. Las respuestas de los linfocitos T a los componentes peptídicos individuales de la vacuna fueron  
65 bajas (0-20 %) y no se asociaron con respuestas clínicas. En conjunto, los ensayos incluyeron 722 (647 + 75) pacientes y, por lo tanto, estos datos indicaron firmemente que la administración de un inhibidor del punto de control inmunitario,

en particular un bloqueo de CTLA-4, en combinación con vacunas contra el cáncer basadas en péptidos no aumenta las respuestas inmunitarias ni da como resultado una eficacia clínica mejorada de dichas vacunas en seres humanos. Esto es contrario a lo que se esperaba de los experimentos en ratones (Williams *et al.* Clin Cancer Res. 2013, 19(13) 3545-3555; Met *et al.* Cancer Lett. 2006 231(2):247-256). La presente invención busca proporcionar una solución a este problema.

El documento WO2015/095811 se refiere a métodos para el tratamiento de neoplasias y de manera más particular, de tumores, mediante la administración a un sujeto de una vacuna contra neoplasia que comprende una pluralidad de neoantígenos específicos de neoplasia/tumor y al menos un inhibidor de punto de control. Cabe apreciar que el documento WO2015/096811 se refiere específicamente a vacunas contra el cáncer personalizadas que comprenden neoantígenos específicos de tumores, que se crearon mediante las mutaciones personales que se encuentran en el tumor de cada paciente. Las vacunas contra el cáncer personalizadas divulgadas en el documento WO2015/095811 no serían adecuadas para una amplia gama de la población. Asimismo, en el documento WO2015/095811 no se proporcionan datos experimentales sobre la combinación de vacunas contra el cáncer personalizadas e inhibidores del punto de control para respaldar la eficacia de esta combinación en el tratamiento del cáncer. Esto es significativo, dada la preponderancia de la evidencia que indica que la administración de un inhibidor del punto de control inmunitario junto con una vacuna contra el cáncer basada en péptidos no aumenta las respuestas inmunitarias ni da como resultado una eficacia clínica mejorada en seres humanos, como se ha explicado anteriormente.

El documento WO2015/033140 se refiere a una composición inmunitaria procedente de un péptido de antígeno tumoral y al tratamiento del cáncer utilizando la composición. El concepto de combinar la composición con inmunoterapias o inmunomoduladores (por ejemplo, incluyendo agentes para bloquear puntos de control inmunitario) se divulga en términos generales. Sin embargo, el documento WO2015/033140 no proporciona ningún dato experimental sobre la combinación de la composición procedente de péptidos con inhibidores del punto de control inmunitario. Esto es significativo, dada la preponderancia de la evidencia que indica que la administración de un inhibidor del punto de control inmunitario junto con una vacuna contra el cáncer basada en péptidos no aumenta las respuestas inmunitarias ni da como resultado una eficacia clínica mejorada en seres humanos, como se ha explicado anteriormente. Por tanto, en el documento WO2015/033140 no se proporciona ninguna divulgación que permita la combinación en el tratamiento del cáncer.

El documento WO2016/025647 se refiere a un método para tratar el cáncer con una combinación de IL-2, un anticuerpo terapéutico o fragmento del mismo y una vacuna contra el cáncer. El ejemplo 4 del documento WO2016/025647 se refiere a una combinación cuádruple de MSA-IL-2 más anticuerpo anti-PD-1 más TA99 (un anticuerpo anti-Trp-1) más una vacuna contra el cáncer (una vacuna contra el cáncer anfilila dirigida a Trp-2) en un modelo de ratón con melanoma B16F10. En la página 84 se indica que la vacuna contra el cáncer provoca una respuesta de linfocitos T CD8+, lo que significa que tenía entre 8 y 10 aminoácidos de longitud. Esta longitud del péptido es equivalente a la utilizada en las vacunas contra el cáncer de Hodi *et al.* 2006 y Sarnaik *et al.* 2011 y que no produjo ningún beneficio clínico adicional en seres humanos cuando se combinaron con ipilimumab.

Yuan *et al.* Cancer Immunol Immunother. Agosto de 2011;60(8):1137-46, informa de un estudio de tres pacientes tratados con ipilimumab que habían sido prevacunados con: ADN de gp100; una vacuna peptídica con gp100<sup>209-217</sup> y con tirosinasa<sup>369-377</sup> más ADN de GM-CSF; o proteína NY-ESO-1 humana recombinante. En el paciente IMF-11, que había sido prevacunado con la proteína NY-ESO-1 humana recombinante, se realizó un inmunocontrol *in vitro* posterior con péptidos superpuestos NY-ESO-1 de 20 unidades; sin embargo, estos péptidos no se utilizaron en la propia vacuna. El tiempo transcurrido desde la vacunación hasta el tratamiento con ipilimumab varió de 10 meses a 2,5 años. Sigue existiendo la necesidad de proporcionar métodos y composiciones que proporcionen beneficios clínicos en seres humanos en una amplia gama de pacientes.

El documento WO 2007/113648 se refiere a usos y composiciones que comprenden un anticuerpo anti-CTLA-4 y al menos un agente terapéutico para el tratamiento del cáncer. La combinación de un anticuerpo anti-CTLA-4, CP-675.206 y antígeno tumoral (completo) se menciona pero no hay datos experimentales sobre esta combinación. Por ejemplo, el ejemplo 15 se refiere a la administración de una vacuna contra el virus de la gripe y el anticuerpo CP-675.206 en macacos de la India, pero no se proporcionan datos sobre la administración de una vacuna contra el cáncer procedente de un autoantígeno en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario. Esto es significativo, dada la preponderancia de la evidencia que indica que la administración de un inhibidor del punto de control inmunitario junto con una vacuna contra el cáncer basada en péptidos no aumenta las respuestas inmunitarias ni da como resultado una eficacia clínica mejorada en seres humanos, como se ha explicado anteriormente.

Foy *et al.* Cancer Immunol Immunother, mayo de 2016;65(5):537-49, se refiere al uso de inmunoterapia activa basada en poxvirus MVA-BN-HER2 sola o en combinación con el bloqueo del punto de control CTLA-4 en un modelo terapéutico de ratón con metástasis pulmonar CT26-HER-2. MVA-BN-HER2 es un vector recombinante basado en el virus vacunal modificado de Ankara que codifica una forma modificada del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2). El estudio de Foy *et al.* se realizó en ratones, donde el HER-2 humano no es un autoantígeno. Como se analizó anteriormente en el contexto de las vacunas contra el cáncer basadas en péptidos en combinación con el bloqueo de CTLA-4, existe la preocupación de que los experimentos en ratones no se traduzcan necesariamente en un aumento de las respuestas inmunitarias y una mejor eficacia clínica en seres humanos.

Zanetti Nat Rev Clin Oncol, febrero de 2017;14(2):115-128 es un artículo de opinión de Perspectives sobre la telomerasa transcriptasa inversa en la inmunoterapia contra el cáncer. La discusión abarca los inhibidores del punto de control inmunitario; en particular, en el contexto del microambiente tumoral y su papel en la determinación del éxito de la vacunación terapéutica (Figura 1). En particular, se analiza el papel de los inhibidores del punto de control inmunitario a la hora de liberar el freno de las respuestas inmunitarias (preexistentes) adquiridas de forma natural y la capacidad de los inhibidores del punto de control inmunitario para restaurar la actividad de los linfocitos T agotados. Sin embargo, no se proporcionan datos experimentales para apoyar el análisis que, como se ha mencionado anteriormente, es importante dada la preponderancia de la evidencia que indica que la administración de un inhibidor del punto de control inmunitario en combinación con una vacuna contra el cáncer basada en péptidos no aumenta las respuestas inmunitarias ni da como resultado una eficacia clínica mejorada en seres humanos.

El documento WO 03/086459 se refiere a métodos para promover o potenciar una respuesta inmunitaria secundaria o de memoria usando anticuerpos anti-CTLA-4. El ejemplo 1 se refiere a una vacuna de células de melanoma que provoca una respuesta de CD4+ y CD8+ en la que se utilizó una vacuna de células completas que expresa GM-CSF en macacos cangrejeros. El ejemplo 5 se refiere a la administración de un anticuerpo anti-CTLA-4 junto con la vacunación con dos péptidos gp100 restringidos por HLA-A\*0201 en seres humanos. Estos péptidos tenían 9 aminoácidos de longitud y eran los mismos péptidos (es decir, gp100:209-217(210M) y gp100:280-288(288V)) que se utilizaron en la vacuna contra el cáncer de Hodi. *et al.* 2010 y que no produjo ningún beneficio clínico adicional en seres humanos cuando se combinó con ipilimumab.

El documento WO 2011/101173 divulga diversos polipéptidos de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT, del inglés *human telomerase reverse transcriptase*) para el tratamiento del cáncer. No hay información sobre los inhibidores del punto de control inmunitario. Sigue siendo necesario proporcionar más tratamientos contra el cáncer.

La presente invención busca aliviar los al menos algunos de los problemas anteriores y, en algunos aspectos, busca proporcionar una vacuna contra el cáncer basada en péptidos con una amplia cobertura poblacional que mejore las tasas de respuesta clínica en pacientes con cáncer cuando se combina con un inhibidor del punto de control.

A este respecto, cabe señalar que las moléculas del MHC de clase I se encuentran en la superficie de la mayoría de las células y normalmente se unen a polipéptidos que tienen entre 8 y 10 restos de aminoácidos de longitud. Las moléculas del MHC de clase I presentan polipéptidos, que proceden de proteínas citosólicas por proteólisis, a los linfocitos T CD8+ (también conocidas como linfocitos T citotóxicos o CTL) para provocar una respuesta de los linfocitos T CD8+. En contraste, las moléculas del MHC de clase II se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígenos y se unen a polipéptidos que generalmente son más largos, preferentemente entre 12 y 24 aminoácidos de longitud. Las moléculas del MHC de clase II presentan polipéptidos, que proceden de proteínas extracelulares que se han internalizado por endocitosis y digeridas, a los linfocitos T CD4+ (también conocidos como linfocitos T auxiliares o linfocitos Th) para provocar una respuesta de los linfocitos T CD4+.

Los presentes inventores han hecho la observación de que en los estudios descritos en Hodi *et al.* 2006 y Sarnaik *et al.* 2011, las vacunas contra el cáncer basadas en péptidos comprendían péptidos cortos (9 unidades), diseñadas para provocar respuestas de linfocitos T citotóxicos en pacientes positivos para HLA-A2. La presente invención surge del sorprendente hallazgo de que la combinación de un inhibidor de CTLA-4 y una vacuna contra el cáncer basada en péptidos que comprende al menos un péptido que tiene 12 aminoácidos o más (es decir, un péptido "largo") y que es capaz de inducir una respuesta de linfocitos T auxiliares produce un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer. Este hallazgo llevó a la sorprendente comprensión de que una vacuna contra el cáncer basada en péptidos que comprende al menos un péptido largo de un autoantígeno, que es capaz de provocar una respuesta de linfocitos T auxiliares en una amplia gama de pacientes, en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario podría dar como resultado mejores respuestas inmunitarias y una mayor eficacia clínica en el tratamiento del cáncer en una amplia gama de la población.

### Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una mezcla de polipéptidos para usar en medicina en donde la mezcla de polipéptidos se administra a un paciente de manera simultánea, por separado o de manera secuencial con un inhibidor del punto de control inmunitario,

en donde la mezcla de polipéptidos comprende:

- i) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico;
- ii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico; y
- iii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3 o un fragmento inmunogénico del mismo

que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico,

en donde cada polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud, y

en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:

un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo;  
un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y/o  
un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En particular, el polipéptido provoca una respuesta de linfocitos T CD4+.

En el presente documento se divulga un polipéptido para usar en medicina en donde el polipéptido se administra de manera simultánea, por separado o de manera secuencial con un inhibidor del punto de control inmunitario, y en donde el polipéptido comprende al menos un polipéptido que comprende una región de al menos 12 aminoácidos de un autoantígeno o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la región. El polipéptido puede tener menos de 100 aminoácidos de longitud.

En el presente documento se divulga una molécula de ácido nucleico para usar en medicina en donde la molécula de ácido nucleico se administra de manera simultánea, por separado o de manera secuencial con un inhibidor del punto de control inmunitario, y en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un polipéptido que comprende una región de al menos 12 aminoácidos de un autoantígeno o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la región.

En el presente documento se divulga un receptor de linfocitos T, o un linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, para usar en medicina en donde el receptor de linfocitos T o el linfocito T se administra de manera simultánea, por separado o de manera secuencial con un inhibidor del punto de control inmunitario, y en donde el receptor de linfocitos T o el linfocito T es específico para un polipéptido que consiste en al menos 12 aminoácidos de un autoantígeno, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con el polipéptido, cuando el polipéptido se presenta en una molécula del MHC.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un inhibidor del punto de control inmunitario para usar en medicina en donde el inhibidor del punto de control inmunitario se administra a un paciente de manera simultánea, por separado o de manera secuencial con una mezcla de polipéptidos,

en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:

un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo;  
un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y/o  
un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y

en donde la mezcla de polipéptidos comprende:

i) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico;  
ii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico; y  
iii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico,

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

En el presente documento se divulga un inhibidor del punto de control inmunitario para usar en medicina en donde el inhibidor del punto de control inmunitario se administra de manera simultánea, por separado o de manera secuencial con:

i) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un polipéptido que comprende una región de al menos 12 aminoácidos de un autoantígeno o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la región;  
ii) un receptor de linfocitos T específico para un polipéptido que consiste en al menos 12 aminoácidos de un autoantígeno, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con el polipéptido, cuando el polipéptido se presenta en una molécula del MHC; o

iii) un linfocito T que presenta un receptor de linfocitos T como se define en ii).

Preferentemente, la mezcla de polipéptidos de la invención o el inhibidor del punto de control inmunitario de la invención es para usar en el tratamiento del cáncer.

5 Preferentemente, la mezcla de polipéptidos de la invención o el inhibidor del punto de control inmunitario de la invención es para usar en la vacunación contra el cáncer.

10 En el presente documento se divulga que la molécula de ácido nucleico, el linfocito T o el receptor de linfocitos T se utiliza en el tratamiento del cáncer o se utiliza en la vacunación contra el cáncer.

Preferentemente, la mezcla de polipéptidos junto con el inhibidor del punto de control inmunitario produce un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer.

15 En el presente documento se divulga que la al menos una molécula de ácido nucleico, el linfocito T o el receptor de linfocitos T junto con el inhibidor del punto de control inmunitario produce un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer.

20 Preferentemente, la mezcla de polipéptidos junto con el inhibidor del punto de control inmunitario produce un efecto sinérgico en la vacunación contra el cáncer.

25 En el presente documento se divulga que la al menos una molécula de ácido nucleico, el linfocito T o el receptor de linfocitos T junto con el inhibidor del punto de control inmunitario producen un efecto sinérgico en la vacunación contra el cáncer.

De manera ventajosa, la mezcla de polipéptidos junto con el inhibidor del punto de control inmunitario se utilizan para generar una respuesta inmunitaria acelerada de linfocitos T CD4+.

30 En el presente documento se divulga que la molécula de ácido nucleico, el linfocito T o el receptor de linfocitos T junto con el inhibidor del punto de control inmunitario se utilizan para generar una respuesta inmunitaria acelerada de linfocitos T CD4+.

En el presente documento se divulga una composición o kit adecuado para el tratamiento del cáncer, que comprende:

- 35 i)
- a) al menos un polipéptido que comprende una región de al menos 12 aminoácidos de un autoantígeno o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la región;
  - 40 b) al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un polipéptido que comprende una región de al menos 12 aminoácidos de un autoantígeno o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la región;
  - c) un receptor de linfocitos T específico para un polipéptido que consiste en al menos 12 aminoácidos de un autoantígeno, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con el polipéptido, cuando el polipéptido se presenta en una molécula del MHC; o
  - 45 d) un linfocito T que presenta un receptor de linfocitos T como se define en c) y

ii) un inhibidor del punto de control inmunitario,

50 en donde el al menos un polipéptido, el linfocito T o el receptor de linfocitos T junto con el inhibidor del punto de control inmunitario producen un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer.

En el presente documento se divulga que al menos una molécula de ácido nucleico junto con el inhibidor del punto de control inmunitario producen un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer.

55 En el presente documento se divulga que el al menos un polipéptido, la al menos una molécula de ácido nucleico, el linfocito T o el receptor de linfocitos T junto con el inhibidor del punto de control inmunitario producen un efecto sinérgico en la vacunación contra el cáncer.

60 En el presente documento se divulga que al menos un polipéptido según el punto a) tiene menos de 100 aminoácidos de longitud.

En el presente documento se divulga que al menos un polipéptido comprende una región de al menos 15, 20, 25 o 30 aminoácidos de un autoantígeno o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la región.

65 En el presente documento se divulga que el polipéptido comprende una región de al menos 15, 20, 25 o 30 aminoácidos de un autoantígeno o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la región.

En el presente documento se divulga que el autoantígeno es un antígeno tumoral universal, preferentemente telomerasa transcriptasa inversa, Top2alpha, survivina o CYP1B1.

5 En el presente documento se divulga que el autoantígeno es la telomerasa transcriptasa inversa y en donde el al menos un polipéptido comprende un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma o un fragmento inmunogénico de la misma que comprende al menos 12 aminoácidos.

10 En el presente documento se divulga que el autoantígeno es la telomerasa transcriptasa inversa y el o el al menos un polipéptido comprende:

- i) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1;
- ii) un fragmento inmunogénico de i) que comprende al menos 12 aminoácidos; o
- 15 iii) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con i) o ii).

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición, combinación o kit adecuado para el tratamiento del cáncer, que comprende:

20 a) una mezcla de polipéptidos que comprende:

- i) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico;
- 25 ii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico; y
- iii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico,
- 30

en donde cada polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud; y

b) un inhibidor del punto de control inmunitario, en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:

- 35 un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo;
- un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y/o
- un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

40 En el presente documento se divulga una composición o kit adecuado para el tratamiento del cáncer, que comprende:

- i) al menos una molécula de ácido nucleico, en donde la al menos una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia primaria de SEQ ID NO: 1 o una secuencia secundaria que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia primaria o un fragmento inmunogénico de la secuencia primaria o la secuencia secundaria que comprende al menos 12 aminoácidos; y
- 45 ii) un inhibidor del punto de control inmunitario.

En el presente documento se divulga que la al menos una molécula de ácido nucleico es una mezcla de moléculas de ácido nucleico, y en donde la mezcla de moléculas de ácido nucleico comprende además:

- 50 una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia primaria de SEQ ID NO: 2 o una secuencia secundaria que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia primaria o un fragmento inmunogénico de la secuencia primaria o la secuencia secundaria que comprende al menos 12 aminoácidos; y, opcionalmente,
- 55 una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia primaria de SEQ ID NO: 3 o una secuencia secundaria que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia primaria o un fragmento inmunogénico de la secuencia primaria o la secuencia secundaria que comprende al menos 12 aminoácidos.
- 60

En el presente documento se divulga una composición o kit adecuado para el tratamiento del cáncer, que comprende:

- i) al menos un receptor de linfocitos T, o al menos un linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, en donde el receptor de linfocitos T o el linfocito T es específico para un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con el polipéptido, cuando el polipéptido se presenta en una molécula del MHC; y
- 65

ii) un inhibidor del punto de control inmunitario.

En el presente documento se divulga que, el polipéptido del punto i) consiste en:

- 5 a) una secuencia de SEQ ID NO: 1;
- b) un fragmento inmunogénico de a) que comprende al menos 12 aminoácidos; o
- c) una secuencia que tenga al menos un 80 % de identidad de secuencia con a) o b),

cuando el polipéptido se presenta en una molécula del MHC.

10 En el presente documento se divulga que al menos un receptor de linfocitos T es una mezcla de receptores de linfocitos T o el al menos un linfocito T es una mezcla de linfocitos T y en donde la mezcla comprende además:

15 un receptor de linfocitos T, o un linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, específico para un polipéptido que consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 2, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma, cuando el polipéptido se presenta en una molécula del MHC; y, opcionalmente, un receptor de linfocitos T, o un linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, específico para un polipéptido que consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la misma, cuando el polipéptido se presenta en una molécula del MHC.

20 En el presente documento se divulga que al menos un receptor de linfocitos T es una mezcla de receptores de linfocitos T o el al menos un linfocito T es una mezcla de linfocitos T y en donde la mezcla comprende además:

25 un receptor de linfocitos T, o un linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, específico para un polipéptido que consiste en:

- a) una secuencia de SEQ ID NO: 2;
- b) un fragmento inmunogénico de a) que comprende al menos 12 aminoácidos; o
- c) una secuencia que tenga al menos un 80 % de identidad de secuencia con a) o b),

30 cuando el polipéptido se presenta en una molécula del MHC; y, opcionalmente, un receptor de linfocitos T, o un linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, específico para un polipéptido que consiste en:

- 35 a) una secuencia de SEQ ID NO: 3
- b) un fragmento inmunogénico de a) que comprende al menos 12 aminoácidos; o
- c) una secuencia que tenga al menos un 80 % de identidad de secuencia con a) o b),

cuando el polipéptido se presenta en una molécula del MHC.

40 De manera conveniente, la composición, combinación o kit de acuerdo con el tercer aspecto de la invención es adecuado para la vacunación contra el cáncer.

45 En el presente documento se divulga que la composición o kit descrito anteriormente es adecuado para la vacunación contra el cáncer.

En el presente documento se divulga que el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de CTLA-4, un inhibidor de PD-1 o un inhibidor de PD-L1.

50 En el presente documento se divulga que el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas CD28CTLA-4.

55 En el presente documento se divulga que el inhibidor de CTLA-4 es un antagonista de CTLA-4 de molécula pequeña, el inhibidor de PD-1 es un antagonista de PD-1 de molécula pequeña o el inhibidor de PD-L1 es un antagonista de PD-L1 de molécula pequeña.

60 Preferentemente, el anticuerpo anti-CTLA-4 es: ipilimumab o tremelimumab, en donde el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab o pembrolizumab, o en donde el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab (MPDL3280A), durvalumab (MEDI4736) o BMS-936559 (MDX-1105).

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la composición de la presente invención y un adyuvante, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otro ingrediente terapéutico.

65 De manera conveniente, el kit de la presente invención comprende además un adyuvante, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otro ingrediente terapéutico.



Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un resto modificado o un resto que no se produce de forma natural, tal como un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como polímeros de aminoácidos de origen natural.

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

El término "fragmento", como se utiliza en el presente documento en relación con un polipéptido, significa una serie consecutiva de aminoácidos que forman parte del polipéptido. Un "fragmento inmunogénico" de un polipéptido es un fragmento como se definió anteriormente que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria, tales como una respuesta de linfocitos T, cuando se administra a un individuo. En algunas realizaciones, un "fragmento inmunogénico" de un polipéptido es un fragmento como se definió previamente que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria restringida al MHC de clase II.

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

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

El término "cáncer", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo de enfermedades que se caracterizan por una proliferación de células nueva, anormal y/o incontrolada en un individuo. Las células cancerosas tienen la capacidad de invadir tejidos adyacentes y/o diseminarse a otros sitios del cuerpo (es decir, las células cancerosas son capaces de hacer metástasis).

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

El término "autoantígeno", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un antígeno que procede de una proteína de origen natural en el cuerpo humano. En condiciones normales, el sistema inmunitario no reacciona a los autoantígenos debido a la selección negativa de linfocitos T en el timo. Sin embargo, en un individuo con cáncer, los autoantígenos pueden ser reconocidos como extraños por el sistema inmunitario (por ejemplo, como resultado de que la célula cancerosa sobreexpresa la proteína de la que procede el autoantígeno o la expresa de manera inapropiada dado el tejido en el que se desarrolla el cáncer) y se produce una respuesta inmunitaria de los linfocitos T contra el autoantígeno. En el presente documento se divulga que el autoantígeno puede denominarse "antígeno asociado a tumor", es decir, un antígeno asociado con una célula cancerosa así como con una célula normal. Un ejemplo de autoantígeno es la telomerasa transcriptasa inversa.

El término "antígeno tumoral universal", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un antígeno que se expresa en (casi) todos los tumores, tal como, por ejemplo, en al menos un 80 %, un 85 % o un 90 % de todos los tipos de tumores. En el presente documento se divulga que el antígeno tumoral universal está directamente implicado en el fenotipo maligno del tumor. Ejemplos de antígeno tumoral universal incluyen la telomerasa transcriptasa inversa, Top2alpha, survivina y CYP1 B1.

El término "linfocito T" (también conocido como "célula T"), como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que es capaz de reconocer un antígeno específico y que comprende un receptor de linfocitos T en la superficie celular. El término "linfocito T" comprende diferentes tipos de linfocitos T, tales como: linfocitos T CD4+ (también conocidos como linfocitos T auxiliares o linfocitos Th), linfocitos T CD8+ (también conocidos como linfocitos T citotóxicos o CTL), linfocitos T de memoria y linfocitos T reguladores (Tregs).

La expresión "receptor de linfocitos T", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un receptor de antígeno del linfocito T. En el presente documento se divulga que el receptor de linfocitos T reconoce (es decir, se une a) un

polipéptido cuando lo presenta una molécula del MHC.

La expresión "un linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un linfocito T que comprende el receptor de linfocitos T en su superficie celular. En el presente documento se divulga que el receptor de linfocitos T es responsable de reconocer (es decir, unirse a) un polipéptido cuando lo presenta una molécula del MHC. En el presente documento se divulga que la unión del receptor de linfocitos T al polipéptido cuando se presenta mediante la molécula del MHC da como resultado la activación del linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T. La activación de los linfocitos T se puede medir mediante ensayos de respuesta de linfocitos T y ensayos ELISPOT como se describe en el presente documento.

La expresión "el receptor de linfocitos T o el linfocito T es específico para un polipéptido", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un receptor de linfocitos T o un linfocito T que comprende el receptor de linfocitos T que es capaz de reconocer (es decir, unirse a) el polipéptido cuando se presenta en una molécula del MHC. En el presente documento se divulga que el polipéptido para el cual el receptor de linfocitos T (o el linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T) es específico, tiene una longitud mayor que la que normalmente se acomodaría en una molécula del MHC. En el presente documento se divulga que la expresión "el receptor de linfocitos T o el linfocito T es específico para un polipéptido", como se utiliza en el presente documento, se refiere al reconocimiento por parte del receptor de linfocitos T o del linfocito T de un fragmento inmunogénico del polipéptido cuando se presenta en la molécula del MHC. En el presente documento se divulga que la unión del receptor de linfocitos T o del linfocito T al polipéptido del que es específico da como resultado la activación de un linfocito T. La activación de los linfocitos T se puede medir mediante ensayos de respuesta de linfocitos T y ensayos ELISPOT como se describe en el presente documento.

La expresión "molécula del MHC", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una estructura proteica que se ensambla con un polipéptido y que es capaz de presentar el polipéptido en la superficie celular a un linfocito T. Las moléculas del MHC están codificadas por genes dentro del complejo principal de histocompatibilidad. En algunas realizaciones, la expresión "molécula del MHC" se refiere a una molécula del MHC de clase I y/o a una molécula del MHC de clase II.

El término "punto de control inmunitario", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier punto en el que se limita una respuesta inmunitaria. Los puntos de control inmunitario son vías inhibitorias que ralentizan o detienen las reacciones inmunitarias y previenen el daño tisular excesivo debido a la actividad incontrolada de las células inmunitarias. Ejemplos de un "punto de control inmunitario" incluyen el punto de control de la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y el punto de control de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1).

La expresión "inhibidor del punto de control inmunitario", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto, sustancia o composición (por ejemplo, cualquier molécula pequeña, compuesto químico, anticuerpo, molécula de ácido nucleico, polipéptido o fragmentos del mismo, una vacuna o vacuna vírica) que sea capaz de disminuir o bloquear un punto de control inmunitario permitiendo una actividad inmunitaria más extensa. La expresión "inhibidor del punto de control" se utiliza indistintamente en el presente documento con "inhibidor del punto de control inmunitario". En la presente invención, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína implicada en la vía del punto de control inmunitario, interrumpiendo y disminuyendo así la actividad general del punto de control inmunitario. Ejemplos de dicho inhibidor del punto de control inmunitario incluyen un anticuerpo anti-CTLA-4 (tal como ipilimumab, tremelimumab o AGEN-1884) y un anticuerpo anti-PD-1 (tal como nivolumab o pembrolizumab). En el presente documento se divulga que el inhibidor del punto de control inmunitario es un antagonista de molécula pequeña que interfiere y/o inhibe la actividad de una proteína implicada en la vía del punto de control inmunitario y, por lo tanto, regula negativamente la actividad general del punto de control inmunitario. En el presente documento se divulga que el antagonista de molécula pequeña se dirige a las proteínas CTLA-4 y/o PD-1 para disminuir los puntos de control de CTLA-4 y/o PD-1 (es decir, el antagonista de molécula pequeña es un antagonista de CTLA-4 de molécula pequeña o un antagonista de PD-1 de molécula pequeña). En el presente documento se divulga que el inhibidor del punto de control inmunitario está dirigido a otro miembro de la superfamilia de Ig CD28CTLA4, tal como BTLA, LAG3, ICOS, PDL1 o KIR (Page *et al.*, Annual Review of Medicine 65:27 (2014)). En el presente documento se divulga que el inhibidor del punto de control inmunitario se dirige a un miembro de la superfamilia TNFR, tal como CD40, OX40, CD137, GITR, CD27 o TIM-3. En el presente documento se divulga que el inhibidor del punto de control inmunitario se dirige a la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). En algunos casos, el direccionamiento de un punto de control inmunitario se logra con un anticuerpo inhibidor o una molécula similar. En otros casos, se logra con un agonista para la diana; ejemplos de esta clase incluyen las dianas estimuladoras OX40 y GITR.

En la presente invención, el inhibidor del punto de control inmunitario se dirige a un punto de control inmunitario que está implicado en la regulación de un linfocito T. En la presente invención, el punto de control inmunitario al que se dirige es un regulador negativo de la actividad de los linfocitos T; por lo tanto, la acción del inhibidor del punto de control inmunitario permite una actividad más extensa de los linfocitos T. Como se ha analizado anteriormente, en la presente invención, el inhibidor del punto de control inmunitario se dirige a un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) CD28CTLA4, tal como CTLA-4, PD-1 y/o PD-L1. Las proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas poseen un dominio de inmunoglobulina (también conocido como pliegue de inmunoglobulina) que

es un pliegue característico en forma de lámina beta.

La expresión "inhibir un punto de control inmunitario", como se utiliza en el presente documento, se refiere a disminuir o bloquear un punto de control inmunitario para permitir una actividad inmune más extensa. En el presente documento se divulga que la inhibición de un punto de control inmunitario se logra con al menos uno de los inhibidores del punto de control inmunitario descritos anteriormente.

La expresión "efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la presencia de al menos una de las siguientes combinaciones de factores en pacientes a los que se les ha administrado una vacuna contra el cáncer basada en péptidos (o, como se divulga en el presente documento, basada en una molécula de ácido nucleico) y un inhibidor del punto de control en comparación con un control (por ejemplo, pacientes a los que se les ha administrado la vacuna contra el cáncer basada en péptidos sin el inhibidor del punto de control; o, como alternativa, pacientes a los que se les ha administrado el inhibidor del punto de control sin la vacuna contra el cáncer basada en péptidos).

1. Una reducción del tiempo necesario para que el sistema inmunitario de los pacientes genere una respuesta inmunitaria medible al péptido o péptidos de la vacuna. Dicho de otro modo, se genera una respuesta inmunitaria acelerada de linfocitos T CD4+.

2. El desarrollo de una fuerte respuesta inmunitaria a los péptidos de la vacuna por parte de los pacientes. En una realización, una "respuesta inmunitaria fuerte", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cuando, en un promedio de 10 pacientes, la respuesta inmunitaria máxima media es un IE de al menos 17, preferentemente de al menos 19.

3. Un mejor resultado clínico en los pacientes.

En algunas realizaciones, la expresión "efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer" se refiere a la presencia de al menos dos de dichos factores o los tres de dichos factores en los pacientes. En una realización, un factor adicional, en concreto, la inducción de una respuesta inmunitaria amplia (es decir, el montaje de una respuesta inmunitaria contra 2, 3 o más componentes de la vacuna), es una prueba más de un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer. En una realización preferida, las respuestas inmunitarias se miden mediante un ensayo de respuesta de linfocitos T (proliferación mediante la incorporación de 3H-timidina) utilizando muestras de sangre de pacientes como se explica en la sección materiales y métodos en el presente documento. Una respuesta específica de linfocitos T se considera positiva si la respuesta peptídica es al menos 3 veces mayor que el fondo (Índice de estimulación, IE  $\geq 3$ ). En una realización, se proporciona un efecto sinérgico cuando, en un promedio de diez pacientes, más del 50 % presenta una respuesta inmunitaria positiva 7 semanas después de la primera administración de la vacuna peptídica; y la respuesta inmunitaria máxima media es un IE de al menos 17, preferentemente de al menos 19. En algunas realizaciones, un resultado clínico mejorado es una respuesta parcial o completa (también conocida como remisión parcial o completa) o una enfermedad estable. Una respuesta completa se refiere a la desaparición de un tumor o cáncer detectable en el cuerpo en respuesta al tratamiento; una respuesta parcial se refiere a una disminución en el tamaño del tumor o en la extensión del cáncer en el cuerpo, en respuesta al tratamiento; y enfermedad estable significa que el tumor o el cáncer en el cuerpo no disminuye ni aumenta en extensión o gravedad.

La expresión "generar una respuesta inmunitaria acelerada de linfocitos T CD4+", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una reducción en la cantidad de tiempo requerido por el sistema inmunitario para montar una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ medible. En una realización, un tiempo de respuesta se refiere al tiempo desde: el inicio de la vacunación; hasta: la expansión de los linfocitos T CD4+ específicos de la vacuna a un nivel que define una respuesta positiva a la vacuna. En la presente realización, una respuesta acelerada de linfocitos T CD4+ se define como  $T_2 < T_1$ , donde  $T_1$  es el tiempo de respuesta de la vacuna sola y  $T_2$  es el tiempo de respuesta del tratamiento combinado de la vacuna y el inhibidor del punto de control inmunitario. En la presente invención, la vacuna comprende una mezcla de polipéptidos de la invención. También se divulga una vacuna que comprende una molécula de ácido nucleico como se describe en el presente documento.

En determinadas realizaciones, cuando la vacuna es una vacuna clínica,  $T_1$  y  $T_2$  se refieren a los valores promedio en una población tratada. En una realización,  $T_1$  y  $T_2$  se refieren a los valores promedio de 10 o más pacientes. El nivel que define una respuesta inmunitaria positiva depende del ensayo utilizado. En una realización, se basa en un umbral de detección; en una realización alternativa, es un valor predefinido. En determinadas realizaciones, el ensayo utilizado para medir la respuesta inmunitaria es un ensayo de proliferación de linfocitos T (proliferación por incorporación de 3H-timidina) como se describe en el presente documento. En una realización, el nivel que define una respuesta inmunitaria positiva está predefinido en un índice de estimulación (IE) de 3 (SI  $\geq 3$ ). Se debe entender que este nivel es superior al umbral de detección y se selecciona, en determinadas realizaciones, para representar una respuesta inmunitaria potencial y clínicamente relevante. En otras realizaciones, el IE es menor o mayor que 3. En una realización, el IE es 2 o 4.

En una realización,  $T_1$ , tal como se define anteriormente, es el número de semanas hasta que el 50 % o más de los pacientes tratados con la vacuna sola tienen una respuesta inmunitaria positiva; y  $T_2$  es el número de semanas hasta que el 50 % o más de los pacientes tratados con la combinación de la vacuna y el inhibidor del punto de control inmunitario tienen una respuesta inmunitaria positiva. En una realización, una respuesta inmunitaria acelerada se

refiere a una disminución del 60 % en T2 en comparación con T1 (por ejemplo, T2 es de 4 semanas en comparación con T1 que es de 10 semanas). En otras realizaciones, una respuesta inmunitaria acelerada de CD4+ se refiere a una disminución del 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 % o 30 % en T2 en comparación con T1. Las muestras se recogen en puntos temporales discretos, por lo que, en algunas realizaciones, el cálculo de T1 y T2 requiere interpolación.

El término "telomerasa transcriptasa inversa" (*TERT*), como se utiliza en el presente documento, se refiere al componente catalítico del complejo holoenzimático de telomerasa cuya actividad principal es el alargamiento de los telómeros al actuar como una transcriptasa inversa que añade repeticiones de secuencia simple a los extremos de los cromosomas copiando una secuencia molde dentro del componente de ARN de la enzima telomerasa. En la presente invención, el término telomerasa se refiere a la proteína telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT). La secuencia de hTERT completa se establece en el número de registro de GenBank AF015950.1 y se establece en la SEQ ID NO: 6.

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

## Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un esquema que muestra el mecanismo mediante el cual una realización de la presente invención provoca una respuesta inmunitaria.

Las figuras 2A y 2B son gráficos de barras que resumen las respuestas de los linfocitos T detectadas en un paciente con melanoma vacunado con una combinación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 utilizando un ensayo de proliferación de linfocitos T y un ensayo ELISPOT respectivamente. Se detectaron las respuestas de linfocitos T CD4+ contra las SEQ ID NO: 1 y 2 así como la combinación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3. La proliferación en respuesta a PBMC cargadas con péptidos se midió mediante la incorporación de 3H-timidina. Un índice de estimulación  $\geq 3$  se considera una respuesta inmunitaria. 719-20 se refiere a la SEQ ID NO: 1, 725 se refiere a la SEQ ID NO: 2, 728 se refiere a la SEQ ID NO: 3 y la mezcla hTERT1 se refiere a una combinación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

Las figuras 3A-C son gráficos de barras que resumen las respuestas de los linfocitos T CD4+ detectadas en pacientes con melanoma y en un paciente con cáncer de pulmón contra polipéptidos que tienen una secuencia de SEQ ID NO: 1 y fragmentos de los mismos. La proliferación en respuesta a PBMC cargadas con péptidos se midió mediante la incorporación de 3H-timidina. Un índice de estimulación  $\geq 2$  se considera una respuesta inmunitaria. 719-20-13 a 719-20-16 y 719-20-2 a 719-20-9 se refieren a fragmentos de la SEQ ID NO: 1 que comprenden 14 aminoácidos de la misma.

La figura 4 es un gráfico de barras que resume las respuestas de los linfocitos T CD4+ detectadas en una paciente con melanoma y una paciente con cáncer de ovario contra polipéptidos que tienen una secuencia de SEQ ID NO: 2 y fragmentos de los mismos. La proliferación en respuesta a PBMC cargadas con péptidos se midió mediante la incorporación de 3H-timidina. Un índice de estimulación  $\geq 2$  se considera una respuesta inmunitaria. 725-1 a 725-4 se refieren a los fragmentos de la SEQ ID NO: 2 que comprenden 12 aminoácidos de la misma.

La figura 5 es un gráfico de barras que resume las respuestas de los linfocitos T CD4+ detectadas en un paciente con cáncer de páncreas y un paciente con glioblastoma contra polipéptidos que tienen una secuencia de SEQ ID NO: 3 y fragmentos de los mismos. La proliferación en respuesta a PBMC cargadas con péptidos se midió mediante la incorporación de 3H-timidina. Un índice de estimulación  $\geq 3$  se considera una respuesta inmunitaria. 728-1 a 728-4 se refieren a los fragmentos de la SEQ ID NO: 3 que comprenden 12 aminoácidos de la misma.

La figura 6 es un gráfico de barras que resume las respuestas de los linfocitos T CD4+ detectadas en un paciente con cáncer de próstata vacunado con una combinación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3. Se detectaron respuestas de linfocitos T CD4+ contra péptidos de 14 unidades superpuestos de la SEQ ID NO: 1 después de la vacunación y se clonaron los linfocitos T que respondieron. Los datos de la figura 6 indican respuestas proliferativas de clones de linfocitos T CD4+ seleccionados. La proliferación en respuesta a PBMC cargadas con péptidos se midió mediante la incorporación de 3H-timidina. Un índice de estimulación  $\geq 3$  se considera una respuesta inmunitaria.

La figura 7 es un gráfico que resume las respuestas inmunitarias positivas detectadas en muestras de pacientes con cáncer de pulmón y próstata vacunados con las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y GM-CSF, y en muestras de pacientes con melanoma que reciben tratamiento con ipilimumab en combinación con la vacunación con las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y GM-CSF. La proliferación de linfocitos T se midió mediante la incorporación de 3H-timidina. Un índice de estimulación  $\geq 3$  se consideró una respuesta inmunitaria positiva.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona un kit para el tratamiento del cáncer. El kit comprende dos componentes. En la presente invención, el primer componente es una mezcla de polipéptidos. El segundo componente es un inhibidor del punto de control inmunitario.

**5 Polipéptidos**

El primer componente del kit para el tratamiento del cáncer es una mezcla de polipéptidos como se define en la materia objeto de las reivindicaciones.

- 10 También se divulga en el presente documento que el primer componente del kit es al menos un polipéptido de un autoantígeno. Un autoantígeno es un antígeno que procede de una proteína de origen natural en el cuerpo humano. Las células cancerosas pueden expresar determinados autoantígenos a un nivel más elevado que las células normales o el autoantígeno puede expresarse de manera inapropiada dado el tejido en el que se haya desarrollado la célula cancerosa. Estos autoantígenos se pueden considerar "antígenos asociados a tumores" y, por tanto, representan una
- 15 diana potencial para la terapia contra el cáncer. El autoantígeno descrito en el presente documento puede ser un antígeno tumoral universal, que es un antígeno expresado en (casi) todos los tumores humanos. Debe apreciarse que determinados antígenos asociados a tumores son tanto autoantígenos como antígenos tumorales universales. El cáncer es una enfermedad heterogénea y existe un elevado grado de diversidad entre diferentes tipos de cáncer, así como entre individuos con el mismo tipo de cáncer. Mediante el direccionamiento a los antígenos tumorales
- 20 universales, la aplicabilidad de la terapia contra el cáncer mejora en toda la población de pacientes (es decir, dentro y entre los tipos de cáncer).

- En la presente invención, los polipéptidos de la invención comprenden una región de al menos 12 aminoácidos de un autoantígeno, en donde el autoantígeno es la subunidad de la telomerasa transcriptasa inversa ("*TERT*" o "hTERT" para seres humanos) de la enzima telomerasa. La enzima telomerasa es una "autoproteína", es decir, es una proteína de origen natural en el cuerpo humano. Asimismo, se ha observado que la enzima telomerasa se activa en la gran mayoría de los tumores humanos. En vista de esto, los polipéptidos de la hTERT se consideran tanto autoantígenos como antígenos tumorales universales.
- 25

- 30 La telomerasa es una enzima que tiene la función de replicar el extremo 3' de las regiones de los telómeros de las cadenas lineales de ADN en células eucariotas, ya que estas regiones no se pueden extender mediante la enzima ADN polimerasa de forma normal. La enzima telomerasa comprende una subunidad de telomerasa transcriptasa inversa ("*TERT*" o "hTERT" para seres humanos) y ARN de telomerasa. Mediante la utilización del ARN de la telomerasa como molde, la subunidad de la telomerasa transcriptasa inversa añade una secuencia repetida al extremo
- 35 3' de los cromosomas en las células eucariotas para extender el extremo 3' de la cadena de ADN. La secuencia de hTERT completa se establece en el número de registro de GenBank AF015950.1 y se establece en la SEQ ID NO: 6.

- La telomerasa se expresa en determinados tejidos normales, tales como las células madre de la médula ósea y el tubo gastrointestinal. Sin embargo, se ha observado que la enzima telomerasa se activa en la gran mayoría de todos los tumores humanos (por ejemplo, Kim *et al.*, Science. 1994 266(5193):2011-5; Shay y Wright, FEBS Lett. 2010 584(17):3819-25). Se cree que la telomerasa se activa en la gran mayoría de los tumores humanos porque, sin la expresión de la enzima telomerasa, los telómeros de las células se pierden gradualmente y la integridad de los cromosomas disminuye con cada ronda de división celular de una célula, lo que finalmente produce la apoptosis de las células. Por lo tanto, la expresión de la enzima telomerasa es generalmente necesaria para que se desarrolle una
- 40 célula cancerosa porque sin dicha expresión la muerte celular programada suele ocurrir de por defecto. En vista del papel de la activación de la telomerasa en el cáncer, los polipéptidos de la hTERT se consideran antígenos tumorales universales.
- 45

- En el presente documento también se divulga un autoantígeno y/o un antígeno tumoral universal que proviene de una proteína distinta de la hTERT. En el presente documento se divulga un autoantígeno y/o un antígeno tumoral universal que se selecciona de: topoisomerasa II alfa (Top2alpha), survivina o citocromo P450 1B1 (CYP1B1) (Park *et al.*, Cancer Immunol Immunother. 2010 (5):747-57; Sorensen *et al.*, Cancer Biol Ther. 2008 7(12):1885-7; Wobser *et al.*, Cancer Immunol Immunother. 2006 55(10):1294-8; Gribben *et al.*, Clin Cancer Res. 2005 11 (12):4430-6). En el presente documento también se divulga que el al menos un polipéptido es una mezcla de polipéptidos. En la presente
- 50 invención, la mezcla de polipéptidos comprende al menos dos polipéptidos diferentes de la proteína hTERT. Sin embargo, en el presente documento también se divulga una mezcla de polipéptidos que comprende al menos dos polipéptidos diferentes seleccionados de uno cualquiera de los diferentes autoantígenos y/o antígenos tumorales universales. En el presente documento se divulga que la mezcla de polipéptidos comprende al menos dos polipéptidos diferentes seleccionados de uno cualquiera de: hTERT, Top2alpha, survivina o CYP1B1.
- 55

- 60 El al menos un polipéptido de un autoantígeno en el primer componente del kit como se describe en el presente documento para el tratamiento del cáncer tiene al menos 12 aminoácidos de longitud.

- Debe apreciarse que diferentes longitudes del polipéptido provocan diferentes respuestas de linfocitos T. De manera más específica, para provocar una respuesta de linfocitos T CD8+, el polipéptido debe presentarse en moléculas del MHC de clase I que normalmente sólo se unirán a polipéptidos que tengan entre 8 y 10 restos de aminoácidos de
- 65

longitud. Por otra parte, para provocar una respuesta de linfocitos T CD4+, es necesario que el polipéptido se presente en una molécula del MHC de clase II para la cual los polipéptidos pueden ser en general más largos, normalmente entre 12 y 24 restos de aminoácidos de longitud. Por tanto, el al menos un polipéptido de un autoantígeno o antígeno tumoral universal como se describe en el presente documento es capaz de provocar una respuesta de linfocitos T CD4+ (es decir, una respuesta de linfocitos T auxiliares) porque es de mayor longitud (es decir, al menos 12 aminoácidos en longitud).

El al menos un polipéptido del autoantígeno descrito en el presente documento puede tener una longitud igual o de al menos 15 aminoácidos. El al menos un polipéptido del autoantígeno descrito en el presente documento puede tener una longitud igual o de al menos 16, 17, 18, 19, 20, 25 o 30 aminoácidos. El al menos un polipéptido descrito en el presente documento tiene menos de 100 aminoácidos de longitud y puede tener menos de 50, 40 o 30 aminoácidos de longitud.

En el presente documento se divulga que el autoantígeno es telomerasa (más específicamente, hTERT), y el polipéptido puede comprender secuencias de las SEQ ID NO: 1 a 5. El polipéptido descrito en el presente documento puede comprender la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3. El polipéptido descrito en el presente documento puede consistir en la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3. Debe entenderse que dichos polipéptidos son capaces de provocar una respuesta de linfocitos T CD4+ (es decir, una respuesta de linfocitos T auxiliares) porque cada uno de los polipéptidos tiene al menos 12 aminoácidos de longitud. La SEQ ID NO: 1 tiene 30 aminoácidos de longitud; Las SEQ ID NO: 2, 3 y 4 tienen 15 aminoácidos; y la SEQ ID NO: 5 tiene 16 aminoácidos de longitud.

En realizaciones de la presente invención, se proporcionan fragmentos inmunogénicos que comprenden al menos 12 aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3. En el presente documento también se divulgan fragmentos inmunogénicos que comprenden al menos 12 aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 5. En una realización, los fragmentos inmunogénicos comprenden al menos 12, 13 o 14 aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 o 5. En el presente documento también se divulgan fragmentos inmunogénicos que comprenden al menos 12, 13 o 14 aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 5. En otra realización, los fragmentos inmunogénicos comprenden al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 25 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, la mezcla de polipéptidos comprende fragmentos inmunogénicos de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3, en donde los fragmentos inmunogénicos comprenden al menos 12 aminoácidos. En el presente documento también se divulga que la mezcla de polipéptidos comprende fragmentos inmunogénicos de las SEQ ID NO: 1 a 5, en donde los fragmentos inmunogénicos comprenden al menos 12 aminoácidos.

Los fragmentos inmunogénicos ilustrativos incluyen los establecidos en las SEQ ID NO: 7 a 38. Debe apreciarse que los polipéptidos de las SEQ ID NO: 7 a 23 y 24 a 30 son todos fragmentos inmunogénicos del polipéptido de la SEQ ID NO: 1. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 31 a 34 son todos fragmentos inmunogénicos del polipéptido de la SEQ ID NO: 2. Los polipéptidos de las SEQ ID NO: 35 a 38 son todos fragmentos inmunogénicos del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

En realizaciones adicionales, el al menos un polipéptido proporcionado no tiene una identidad de secuencia exacta con uno de los polipéptidos de la invención antes mencionados. Más bien, el polipéptido tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido expuesto anteriormente. En particular, se prefiere que la secuencia tenga al menos un 99 % de identidad de secuencia con la establecida anteriormente. En el presente documento también se divulga que un polipéptido tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un polipéptido establecido anteriormente. La secuencia puede tener al menos un 90 %, un 95 % o un 99 % de identidad de secuencia con respecto a lo establecido anteriormente. También se prefiere que cualquier adición o sustitución de la secuencia de aminoácidos dé como resultado la conservación de las propiedades de la cadena lateral de aminoácidos original. Es decir, la sustitución o modificación es "conservadora".

Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la materia. Ejemplos de propiedades de las cadenas laterales de aminoácidos son los aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y y V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S y T), y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I y P); una cadena lateral que contiene un grupo hidroxilo (S, T e Y); una cadena lateral que contiene un átomo de azufre (C y M); una cadena lateral que contiene un ácido carboxílico y una amida (D, N, E y Q); una cadena lateral que contiene una base (R, K y H); y una cadena lateral que contiene aromáticos (H, F, Y y W). Además, cada uno de los ocho grupos siguientes contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984):

- 1) Alanina (A), glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), glutamina (Q)
- 4) Arginina (R), lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W);
- 7) Serina (S), treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), metionina (M).

En algunas realizaciones, la secuencia de el al menos un polipéptido se altera para cambiar (por ejemplo, aumentar) la afinidad de unión de un polipéptido a una molécula del MHC de clase II de un alelo HLA particular. En otras realizaciones, el polipéptido tiene aminoácidos adicionales, además de los mencionados anteriormente, en el extremo N y/o C del mismo. Dichos aminoácidos adicionales también se pueden usar para cambiar (por ejemplo, aumentar) la afinidad de unión de un polipéptido a una molécula del MHC.

Debe entenderse que el polipéptido de la invención no se limita a tener una secuencia correspondiente a un fragmento de la hTERT. Es decir, en algunas realizaciones, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C, además de la región correspondiente a la hTERT. Sin embargo, la región correspondiente a la hTERT (es decir, al menos un 95 % o un 99 % idéntica a lo establecido anteriormente) tiene al menos 12 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones adicionales de la presente invención, el al menos un polipéptido está unido (por ejemplo, covalentemente) a otras sustancias, mientras mantiene su capacidad de inducir una respuesta de linfocitos T CD4+. Estas otras sustancias incluyen lípidos, azúcar y cadenas de azúcar, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos y similares. El al menos un polipéptido, en determinadas realizaciones, contiene modificaciones, tales como la glucosilación, oxidación de las cadenas laterales o fosforilación.

En el presente documento se divulga que el al menos un polipéptido es una mezcla de polipéptidos, tal como una mezcla de polipéptidos del mismo autoantígeno o de dos o más autoantígenos diferentes. La mezcla descrita en el presente documento puede comprender al menos 2 o al menos 3 polipéptidos diferentes del autoantígeno. En la mezcla de polipéptidos de la invención y como se describe en el presente documento, los polipéptidos de la mezcla pueden ser capaces de unirse a moléculas del MHC de clase II de más de un alelo HLA. También debe entenderse que la mezcla como se describe en el presente documento puede comprender más de dos polipéptidos que tienen secuencias diferentes (por ejemplo, 3, 4 o 5 polipéptidos).

En la presente invención, la mezcla de polipéptidos comprende polipéptidos de la proteína hTERT. Los polipéptidos en la mezcla de la invención comprenden las secuencias de SEQ ID NO: 1, 2 y 3. En especial se prefiere que los polipéptidos en la mezcla consistan en las secuencias de SEQ ID NO: 1, 2 y 3. En el presente documento también se divulga que los polipéptidos en una mezcla comprenden secuencias de al menos 2 polipéptidos diferentes que comprenden secuencias de las SEQ ID NO: 1 a 5.

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

#### *Moléculas de ácido nucleico*

En el presente documento se divulga una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se establece anteriormente.

En el presente documento se divulga que el autoantígeno es telomerasa y la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende secuencias de las SEQ ID NO: 1 a 5. La molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3. La molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

En el presente documento se divulga una mezcla de moléculas de ácido nucleico, tal como una mezcla de moléculas de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos del mismo autoantígeno o de dos o más autoantígenos diferentes. En el presente documento se divulga que la mezcla comprende al menos 2 o al menos 3 moléculas de ácido nucleico diferentes que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos del autoantígeno. En la mezcla de moléculas de ácido nucleico, como se describe en el presente documento, los polipéptidos codificados pueden ser capaces de unirse a moléculas del MHC de clase II de más de un alelo HLA. También debe entenderse que la mezcla, como se describe en el presente documento, puede comprender más de dos moléculas de ácido nucleico que codifican diferentes secuencias polipeptídicas (por ejemplo, 3, 4 o 5 moléculas de ácido nucleico).

La mezcla de moléculas de ácido nucleico, como se describe en el presente documento, puede comprender

secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de la proteína hTERT. Las secuencias de polipéptidos codificadas en la mezcla, como se describe en el presente documento, pueden comprender secuencias de al menos 2 polipéptidos diferentes que comprenden secuencias de las SEQ ID NO: 1 a 5. Los polipéptidos codificados en la mezcla pueden comprender las secuencias de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3. Los polipéptidos codificados en la mezcla descrita en el presente documento pueden consistir en secuencias de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

Como se describe de manera alternativa en el presente documento, la secuencia del polipéptido codificado puede no ser idéntica a la mencionada anteriormente, sino que tiene al menos un 80 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % de identidad de secuencia con la misma. En cualquier caso, el polipéptido codificado descrito en el presente documento tiene menos de 100 aminoácidos de longitud y puede tener menos de 50, 40 o 30 aminoácidos de longitud.

En el presente documento se divulga que la o cada molécula de ácido nucleico está unida (por ejemplo, covalentemente) a otras sustancias.

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

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

#### *Receptor de linfocitos T o linfocito T*

En el presente documento se divulga un receptor de linfocitos T, o un linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, que es específico para un polipéptido como se establece anteriormente, cuando el polipéptido se presenta en una molécula del MHC.

Tal como se ha expuesto anteriormente, el polipéptido, como se describe en el presente documento, comprende una región de al menos 12 aminoácidos de un autoantígeno. Los polipéptidos de esta longitud se presentan en moléculas del MHC de clase II. Por tanto, el receptor de linfocitos T, o el linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, es capaz de reconocer y unirse a un polipéptido cuando se presenta en una molécula del MHC de clase II. Las moléculas del MHC de clase II normalmente se unen a polipéptidos que tienen entre 12 y 24 aminoácidos de longitud. Cuando el receptor de linfocitos T, o el linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, se describe como específico para un polipéptido que tiene una longitud superior a 12 a 24 aminoácidos, debe entenderse que un fragmento inmunogénico del polipéptido se presenta en la molécula del MHC.

En el presente documento se divulga que el autoantígeno es la telomerasa (hTERT) y el receptor de linfocitos T, o el linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, descrito en el presente documento puede ser específico para un polipéptido que consiste en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1 a 5, o un fragmento inmunogénico del mismo que consiste en al menos 12 aminoácidos, cuando el polipéptido o el fragmento inmunogénico del mismo se presenta en una molécula del MHC. El receptor de linfocitos T, o el linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, como se describe en el presente documento puede ser específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3, o un fragmento inmunogénico del mismo que consiste en al menos 12 aminoácidos, cuando el polipéptido o el fragmento inmunogénico del mismo se presenta en una molécula del MHC.

En el presente documento se divulga una mezcla de receptores de linfocitos T, o una mezcla de linfocitos T que presentan los receptores de linfocitos T. Es decir, la mezcla comprende diferentes receptores de linfocitos T, o linfocitos T que presentan diferentes receptores de linfocitos T, siendo cada uno de estos específico para un polipéptido diferente, cuando se presenta en una molécula del MHC.

En el presente documento se divulga que la mezcla de diferentes receptores de linfocitos T, o la mezcla de linfocitos T que presentan los diferentes receptores de linfocitos T, es específica para diferentes polipéptidos del mismo autoantígeno, cuando cada polipéptido se presenta en una molécula del MHC, o como alternativa, es específica para diferentes polipéptidos de dos o más autoantígenos diferentes, cuando cada polipéptido se presenta en una molécula del MHC. En el presente documento se divulga que la mezcla de diferentes receptores de linfocitos T, o la mezcla de linfocitos T que presentan los diferentes receptores de linfocitos T, es específica para al menos 2 o al menos 3 polipéptidos diferentes de un autoantígeno, cuando cada polipéptido se presenta en una molécula del MHC. Es decir, la mezcla descrita en el presente documento es específica para más de 2 o más de 3 polipéptidos que tienen secuencias diferentes, cuando cada polipéptido se presenta en una molécula del MHC (por ejemplo, 3, 4 o 5 polipéptidos). La mezcla de diferentes receptores de linfocitos T, o la mezcla de linfocitos T que presentan los diferentes receptores de linfocitos T, descrita en el presente documento puede ser específica para polipéptidos capaces de unirse y presentarse mediante moléculas del MHC de clase I y/o de clase II de más de un alelo HLA.

La mezcla de receptores de linfocitos T, o la mezcla de linfocitos T que presentan los receptores de linfocitos T, descrita en el presente documento puede ser específica para diferentes polipéptidos de la proteína hTERT, cuando cada polipéptido se presenta en una molécula del MHC.



Los polipéptidos que, para la mezcla de receptores de linfocitos T, o la mezcla de linfocitos T que presentan los receptores de linfocitos T descritos en el presente documento, son específicos cuando se presentan en una molécula del MHC, pueden consistir en secuencias de al menos 2 polipéptidos diferentes que comprenden secuencias de SEQ ID NO: 1 a 5. Los polipéptidos que, para la mezcla de receptores de linfocitos T, o la mezcla de linfocitos T que presentan los receptores de linfocitos T descritos en el presente documento, son específicos cuando se presentan en una molécula del MHC, pueden consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 1, 2 y 3. Los polipéptidos que, para la mezcla de receptores de linfocitos T, o la mezcla de linfocitos T que presentan los receptores de linfocitos T descritos en el presente documento, son específicos cuando se presentan en una molécula del MHC, pueden consistir en las secuencias de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

En el presente documento se divulga que un polipéptido que es específico para la mezcla de receptores de linfocitos T, o la mezcla de linfocitos T que presentan los receptores de linfocitos T, es un fragmento inmunogénico de ese polipéptido, y el fragmento inmunogénico se presenta en la molécula del MHC. Debe entenderse que determinados polipéptidos antes mencionados, tal como la SEQ ID NO: 1, son más largos de los que normalmente se acomodarían en una molécula del MHC de clase II. Por tanto, en divulgaciones en las que un receptor de linfocitos T, o un linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, o una mezcla de los mismos, se describe como específico para un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1, debe entenderse que un fragmento inmunogénico, que comprende al menos 12 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, se presenta en la molécula del MHC.

Como se describe de manera alternativa en el presente documento, la secuencia del polipéptido para la que el o cada receptor de células T, o la o cada célula T que presenta el receptor de células T, es específica cuando se une a una molécula MHC puede no ser idéntica a la mencionada anteriormente, sino tener al menos un 80 %, un 90 %, un 95 % o 99 % de identidad de secuencia con la misma, siempre que el polipéptido todavía sea capaz de ser presentado por la molécula del MHC.

#### *Inhibidor del punto de control inmunitario*

El segundo componente del kit para el tratamiento del cáncer es un inhibidor del punto de control inmunitario tal como se define en la materia objeto de las reivindicaciones.

En la presente invención, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo o fragmento del mismo y se dirige al punto de control CTLA-4 y/o al punto de control PD-1. En el presente documento también se divulga un inhibidor del punto de control inmunitario que es cualquier compuesto, sustancia o composición (por ejemplo, cualquier compuesto químico de molécula pequeña, anticuerpo, molécula de ácido nucleico, o polipéptido, o fragmentos del mismo) que es capaz de regular negativamente o bloquear un punto de control inmunitario para permitir una actividad inmunitaria más extensa. En el presente documento también se divulga un inhibidor del punto de control inmunitario que está dirigido a otro miembro de la superfamilia de Ig CD28CTLA-4, tal como BTLA, LAG3, ICOS, PDL1 o KIR (Page *et al.*, Annual Review of Medicine 65:27 (2014)). En el presente documento también se divulga un inhibidor del punto de control inmunitario que está dirigido a un miembro de la superfamilia TNFR, tal como CD40, OX40, CD137, GITR, CD27 o TIM-3. En el presente documento también se divulga un inhibidor del punto de control inmunitario que se dirige a la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO).

En la presente invención, el direccionamiento a un punto de control inmunitario se logra con un anticuerpo inhibidor, o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una molécula similar. En la tabla 2 siguiente se muestran ejemplos de dichos agentes terapéuticos adecuados. También se divulgan otros agentes terapéuticos en la tabla 1 y la tabla 2 siguientes. En una realización preferida, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína implicada en la vía del punto de control inmunitario, interrumpiendo y disminuyendo así la actividad general del punto de control inmunitario. En la presente invención, el inhibidor del punto de control inmunitario incluye un anticuerpo anti-CTLA-4 o un anticuerpo anti-PD-1. Se prefiere especialmente que el anticuerpo anti-CTLA-4 sea ipilimumab o tremelimumab; y que el anticuerpo anti-PD-1 sea nivolumab o pembrolizumab.

Se divulga en el presente documento que el inhibidor del punto de control inmunitario es un antagonista de molécula pequeña que interfiere y/o inhibe la actividad de una proteína implicada en la vía del punto de control inmunitario y, por lo tanto, regula negativamente la actividad general del punto de control inmunitario. El antagonista de molécula pequeña descrito en el presente documento que se dirige a las proteínas CTLA-4 y/o PD-1 para regular negativamente los puntos de control de CTLA-4 y/o PD-1 (es decir, el antagonista de molécula pequeña es un antagonista de CTLA-4 de molécula pequeña o un antagonista de PD-1 de molécula pequeña).

En una realización adicional, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo anti-PD-L1 (es decir, un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1, que es un ligando endógeno de PD-1). Se prefiere que el anticuerpo anti-PD-L1 sea BMS-936559 o MPDL3280A. En el presente documento se divulga que dirigirse a un punto de control inmunitario se logra con un agonista para la diana; ejemplos de esta clase incluyen las dianas estimuladoras OX40 y GITR.

Tabla 1: Otros agentes inmunoterapéuticos en desarrollo

<b>Diana</b>	<b>Nombre</b>	<b>Indicaciones</b>
B7.1	Galiximab	Linfoma
B7H3	MGA271	Tumores sólidos
LAG3	IMP321	Tumores sólidos
	BMS-986016	Tumores sólidos
CD137	BMS-663513	Tumores sólidos
	PF-05082566	Linfoma
KIR	IPH2101	Mieloma, LMA
CCR4	KW-0761	LTA, LCCT
CD27	CDX-1127	Tumores sólidos y hemo
Ox40	MEDI-6469	Tumores sólidos
CD40	CP-870.893	Pancreático
Hemo, tumores hematológicos; LTA, leucemia de linfocitos T aguda; LCCT, linfoma cutáneo de células T; LMA, leucemia mieloide aguda		

Tabla 2: Agentes dirigidos a PD-1/PD-L1 en desarrollo clínico

<b>Agente dirigido a PD-1</b>	<b>Agente dirigido a PD-L1</b>
BMS-936558/MDX-1106 Nivolumab (AcM IgG4 completamente humano)	BMS-936559/MDX-1105 (AcM IgG4 completamente humano)
CT-011 Pidilizumab (AcM IgG1 humanizado)	N/D
N/D	MPDL3280A (AcM IgG1, Fc modificado)
AMP-514	MEDI4736 (AcM completamente humano)
MK-3475 Pembrolizumab (AcM IgG4 humanizado)	N/D
N/D	MSB0010718C
AUNP 12 (péptido)	N/D
PD-1, receptor de muerte programada 1, PD-L1, ligando de muerte celular programada 1; IgG4, inmunoglobulina G4; AcM, anticuerpo monoclonal; N/D, no disponible	

- 5 En la primera realización de la invención, en el kit para el tratamiento del cáncer se proporciona un inhibidor del punto de control inmunitario. Se prefiere que el inhibidor del punto de control inmunitario sea un anticuerpo anti-CTLA-4. En especial se prefiere que el inhibidor del punto de control inmunitario sea ipilimumab. En una segunda realización de la invención, en el kit para el tratamiento del cáncer se proporciona al menos un inhibidor del punto de control inmunitario. En esta segunda realización, se proporcionan un primer y un segundo inhibidor del punto de control, en donde el primer y el segundo inhibidor del punto de control se dirigen a diferentes puntos de control inmunitario. Se prefiere que el primer inhibidor del punto de control inmunitario se dirija al punto de control CTLA-4 y el segundo inhibidor del punto de control inmunitario se dirija al punto de control PD-1.

CTLA-4 e inhibidores de la vía CTLA-4:

- 15 El antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), también conocido como CD152, es una molécula coinhibidora que funciona para regular la activación de los linfocitos T.
- 20 CTLA-4 se identificó inicialmente como un regulador negativo en la superficie de los linfocitos T que se reguló positivamente poco después del inicio de una respuesta inmunitaria *de novo* o estimulación de una respuesta existente para amortiguar la respuesta inmunitaria de linfocitos T posterior y evitar la autoinmunidad o la inflamación descontrolada. Por lo tanto, la magnitud de la respuesta inmunitaria en desarrollo se ha relacionado estrechamente con la acción de CTLA-4. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab o tremelimumab.
- 25 Los inhibidores del punto de control funcionan mediante la modulación de los mecanismos endógenos de regulación de los linfocitos T del sistema inmunitario. Ipilimumab (YERVOY, Bristol-Meyers Squibb, Nueva York, NY) es un anticuerpo monoclonal y es el primer inhibidor del punto de control aprobado por la Administración de Medicamentos

y Alimentos de EE. UU. (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*). Se ha convertido en el tratamiento convencional para el melanoma metastásico (Hodi *et al.*, N. Engl. J. Med. 363:711-23. 2010; Robert *et al.*, N. Engl. J. Med. 364:2517-26. 2011). Ipilimumab se une y bloquea la señalización inhibitoria mediada por la molécula coinhibidora de la superficie de los linfocitos T, el antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). Debido a que el mecanismo de acción no es específico de un tipo de tumor y debido a que una gran cantidad de datos preclínicos respaldan el papel de la vigilancia inmunitaria tumoral en múltiples neoplasias malignas (Andre *et al.*, Clin. Cancer Res. 19:28-33. 2013; May *et al.* Clin. Cancer Res. 17:5233-38. 2011), Ipilimumab se está investigando como tratamiento para pacientes con cáncer de próstata, pulmón, riñón y de mama, entre otros tipos de tumores. Ipilimumab actúa activando el sistema inmunitario mediante el direccionamiento a CTLA-4. Otro anticuerpo bloqueador de CTLA-4, tremelimumab, continúa investigándose en ensayos clínicos y también ha demostrado respuestas duraderas en pacientes con melanoma (Kirkwood *et al.*, Clin. Cancer Res. 16: 1042-48. 2010; Rihos *et al.* J. Clin. Oncol. 31:616-22, 2013).

PD-1 e inhibidores de la vía PD-1:

Mientras que CTLA-4 sirve para regular la activación temprana de los linfocitos T, la señalización de muerte programada-1 (PD-1) funciona en parte para regular la activación de los linfocitos T en los tejidos periféricos. El receptor PD-1 se refiere a un receptor inmunoinhibidor que pertenece a la familia CD28. PD-1 se expresa en varios tipos de células, incluido los linfocitos T reg, los linfocitos B activados y los linfocitos citolíticos naturales (NK), y se expresa predominantemente en linfocitos T previamente activados *in vivo*, y se une a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. Los ligandos endógenos de PD-1, PD-L1 y PD-L2, se expresan en células inmunitarias activadas así como en células no hematopoyéticas, incluidas células tumorales. PD-1, como se utiliza en el presente documento, pretende incluir PD-1 humano (hPD-1), variantes, isoformas y homólogos de especies de hPD-1, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPD-1. La secuencia completa de hPD-1 se puede encontrar con el número de registro de GenBank U64863. El ligando de muerte programada 1 (PD-L1) es uno de los dos ligandos glucoproteicos de la superficie celular para PD-1 (el otro es PD-L2) que regula negativamente la activación de los linfocitos T y la secreción de citocinas al unirse a PD-1. PD-L1, como se utiliza en el presente documento, incluye PD-L1 humano (hPD-L1), variantes, isoformas y homólogos de especies de hPD-L1, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPD-L1. La secuencia completa de hPD-L1 se puede encontrar con el número de registro de GenBank Q9NZQ7. Se ha demostrado que los tumores escapan a la vigilancia inmunitaria mediante la expresión de PD-L1/L2, suprimiendo así los linfocitos que se infiltran en tumores a través de interacciones PD-1/PD-L1, 2 (Dong *et al.* Nat. Med. 8:793-800. 2002). Se ha demostrado que la inhibición de estas interacciones con anticuerpos terapéuticos mejora la respuesta de los linfocitos T y estimula la actividad antitumoral (Freeman *et al.* J. Exp. Med. 192: 1027-34, 2000).

Como se ha analizado anteriormente, en algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab (número de registro CAS: 946414-94-4). Los nombres alternativos para nivolumab incluyen MDX-1 106, MDX-1 106-04, ONO-4538, BMS-936558. Nivolumab es un anticuerpo monoclonal bloqueador IgG4 completamente humano contra PD-1 (Topalian *et al.*, N. Engl. J. Med. 366:2443-54. 2012). Nivolumab bloquea específicamente PD-1, que puede superar la resistencia inmunitaria. Los ligandos de PD-1 se han identificado como PD-L1 (B7-H1), que se expresa en todas las células hematopoyéticas y en muchos tejidos no hematopoyéticos, y PD-L2 (B7-DC), cuya expresión está restringida principalmente a células dendríticas y macrófagos (Dong, H. *et al.* 1999. Nat. Med. 5: 1365; Freeman, G. J. *et al.* 2000. J. Exp. Med. 192: 1027; Latehman, Y. *et al.* 2001. Nat. Immunol 2:261; Tseng, S. Y. *et al.* 2001. J. Exp. Med. 193:839). PD-L1 se sobreexpresa en muchos cánceres y a menudo se asocia con un mal pronóstico (Okazaki T. *et al.*, Intern. Immun. 2007 19(7):813) (Thompson R. H. *et al.*, Cancer Res 2006, 66(7):3381), la mayoría de los linfocitos T que se infiltran en tumores expresan predominantemente PD-1, a diferencia de los linfocitos T en tejido normal y los linfocitos T de sangre periférica, lo que indica que la regulación positiva de PD-1 en los linfocitos T reactivos a tumores puede contribuir a la alteración de las respuestas inmunitarias antitumorales (Blood 2009 114(8): 1537). De manera específica, dado que las células tumorales expresan PD-L1, un ligando PD-1 inmunosupresor, la inhibición de la interacción entre PD-1 y PD-L1 puede mejorar las respuestas de los linfocitos T *in vitro* y mediar la actividad antitumoral preclínica.

Se han realizado o están en curso varios ensayos clínicos (Fases I, II y III) con nivolumab. Por ejemplo, en un ensayo de fase I de aumento de dosis, nivolumab fue seguro y las respuestas objetivas fueron del 16 al 31 % en todos los tipos de tumores, y la mayoría de las respuestas fueron duraderas durante >1 año (Topalian *et al.*, presentado en Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol., Chicago, 31 de mayo - 4 de junio. 2013). En otro estudio, se investigó la seguridad y actividad clínica de nivolumab (anti-PD-1, BMS-936558, Q Q-4538) junto con ipilimumab en pacientes con melanoma avanzado (Woichok, J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 9012 2013 ASCO Annual Meeting).

Se han sometido a investigación clínica dos anticuerpos inhibidores anti-PD-L1, MPDL3280A (Genentech, Sur de San Francisco, CA) y BMS-936559 (Bristol Meyers Squibb, Nueva York, NY). Como nivolumab y MK-3475, se cree que estos anticuerpos funcionan principalmente mediante el bloqueo de la señalización de PD-1/PD-L1. A diferencia de los anticuerpos PD-1, los anticuerpos PD-L1 evitan posibles interacciones entre PD-L2 y PD-1, pero además bloquean las interacciones entre PD-L1 y CD80 (Park *et al.*, 2010. Blood 3 16:1291-98). MPDL3280A se ha evaluado en múltiples tipos de tumores, con seguridad y eficacia preliminar identificadas en melanoma; carcinoma de células renales; cáncer de pulmón no microcítico (CPNM); y carcinoma epidermoide colorrectal, gástrico y de cabeza/cuello (Herbst *et al.* presentado en Annu. Meet Am. Soc. Clin. Oncol., Chicago, 31 de mayo - 4 de junio. 2013). De forma similar, BMS-936559 demostró ser seguro y clínicamente activo en múltiples tipos de tumores en un ensayo de fase I. MEDI-4736

es otro anticuerpo bloqueador de PD-L1 actualmente en desarrollo clínico (NCT01693562).

Además de CTLA-4 y PD-1/PD-L1, se han identificado principalmente muchas otras dianas inmunomoduladoras, muchas de ellas con los correspondientes anticuerpos terapéuticos que se están investigando en ensayos clínicos.

5 Page *et al.* (Annu. Rev. Med. 2014.65) detalla las dianas de los inmunomoduladores de anticuerpos en la figura 1.

#### *Componentes adicionales*

10 En algunas realizaciones de la invención, se proporcionan componentes adicionales en el kit para el tratamiento del cáncer.

En una realización, el kit comprende además un adyuvante, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Los adyuvantes ilustrativos incluyen Poli I:C (Hiltonol), CpG, liposomas, microesferas, partículas similares a virus (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxinas bacterianas (por ejemplo, toxina del cólera y toxina de salmonela). Otros adyuvantes ilustrativos incluyen imiquimod o glucopiranosil lípido A. Un adyuvante particularmente preferido es GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos). Diluyentes y excipientes ilustrativos incluyen agua esterilizada, solución salina fisiológica, líquido de cultivo y tampón fosfato. Adyuvantes ilustrativos para usar en vacunas dirigidas al brazo de linfocitos T del sistema inmunitario, como en la presente invención, se detallan en Petrovsky & Aguilar Immunol Cell Biol. 2004 20 82(5):488-96.

25 En determinadas realizaciones, el polipéptido, como se describe anteriormente, se acopla a un vehículo inmunogénico o se incorpora a un virus o bacteria. En el presente documento también se divulga que la molécula de ácido nucleico, como se describe anteriormente, se acopla a un vehículo inmunogénico o se incorpora a un virus o bacteria. Los vehículos inmunogénicos ilustrativos incluyen hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, inmunoglobulina aviar y fragmentos peptídicos de toxinas inmunogénicas. En el presente documento se divulga que la molécula de ácido nucleico se acopla o integra en un vehículo seleccionado del grupo que consiste en células dendríticas, levadura, bacterias, vectores víricos, virus oncolíticos, partículas similivíricas, liposomas, nanopartículas micelares o nanopartículas de oro.

30 El kit, en algunas realizaciones, también comprende un ingrediente terapéutico adicional. Ingredientes terapéuticos adicionales ilustrativos incluyen interleucina 2 (IL2), interleucina 12 (IL12), un polipéptido adicional de un autoantígeno o antígeno asociado a tumor (es decir, un polipéptido de un autoantígeno o antígeno asociado a tumor aparte de los analizados anteriormente), quimioterápicos, analgésicos, agentes antiinflamatorios y otros agentes antineoplásicos.

Se pueden encontrar más detalles sobre componentes adicionales del kit en Remington's Pharmaceutical Sciences y US Pharmacopoeia, 1984, Mack Publishing Company, Easton, PA, Estados Unidos.

40 En determinadas realizaciones, los componentes antes mencionados del kit se proporcionan en forma de una composición o una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

45 En una realización, la vacuna (es decir, la mezcla de polipéptidos) y el inhibidor del punto de control inmunitario se inyectan localmente con la misma jeringa. En la presente realización, se utiliza una dosis mucho más baja del inhibidor del punto de control inmunitario en comparación con la que se utiliza cuando el inhibidor del punto de control inmunitario se administra sistémicamente (véase Fransen *et al.* Clin Cancer Res. 2013 19(19):5381-9; Fransen *et al.* Oncoimmunology. 2013 2(11):e26493). Es decir, el inhibidor del punto de control inmunitario se utilizará en una dosis que se sitúa en el extremo inferior del intervalo de 1 µg/kg a 10 mg/kg. La dosis de la vacuna no cambia en comparación con cuando se administra por separado del inhibidor del punto de control inmunitario. En el presente documento también se divulga que la vacuna es una molécula de ácido nucleico, y la vacuna y el inhibidor del punto de control inmunitario se inyectan localmente desde la misma jeringa como se describió anteriormente.

#### *Métodos de la invención*

55 Durante el uso, cada componente del kit, la composición o la composición farmacéutica como se explicó anteriormente se administra a un paciente que necesita tratamiento. En principio, se puede utilizar cualquier modo de administración de los componentes del kit, la composición o la composición farmacéutica.

60 En realizaciones de la presente invención en las que el kit, la composición o la composición farmacéutica comprende un polipéptido, el polipéptido es endocitado por células presentadoras de antígeno, puede estar sujeto a procesamiento de antígeno y después se presenta en complejo con una molécula del MHC de clase II en la superficie celular. A través de la interacción con los receptores de linfocitos T en la superficie de los linfocitos T, se provoca una respuesta de linfocitos T CD4+. Debe apreciarse que como resultado del procesamiento del antígeno, el polipéptido del kit, la composición o la composición farmacéutica también se puede presentar en un complejo con una molécula del MHC de clase I en la superficie celular y provocar así una respuesta de linfocitos T CD8+. En el presente documento también se divulga que el kit, la composición o la composición farmacéutica comprende una molécula de ácido nucleico, en

donde la molécula de ácido nucleico también se endocitosa y después se transcribe (si la molécula de ácido nucleico es ADN) y se traduce, y el polipéptido codificado se sintetiza a través de vías celulares endógenas. Posteriormente, el polipéptido codificado se procesa y se presenta en una molécula del MHC para provocar la respuesta de los linfocitos T, como se ha descrito previamente. Así el kit, la composición o la composición farmacéutica se puede utilizar como vacuna para provocar inmunidad de linfocitos T CD4+ (así como de linfocitos T CD8+).

En el presente documento también se divulga que el kit, la composición o la composición farmacéutica comprende un receptor de linfocitos T, o un linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, en donde el linfocito T o el receptor de linfocitos T proporciona directamente inmunidad de linfocitos T CD4+ (o linfocitos T CD8+).

Los componentes del kit, como se explica anteriormente, se pueden administrar de manera simultánea, por separado o de manera secuencial a un paciente que necesita tratamiento. Es decir, los componentes del kit pueden administrarse en un momento diferente, así como de manera sustancialmente simultánea. La expresión de manera simultánea, como se utiliza en el presente documento, se refiere a la administración de uno o más agentes al mismo tiempo. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la mezcla de polipéptidos y el inhibidor del punto de control inmunitario se administran de manera simultánea. De manera simultánea incluye la administración contemporánea, es decir, durante el mismo período de tiempo. En determinadas realizaciones, uno o más agentes se administran de manera simultánea en la misma hora, o de manera simultánea en el mismo día. En algunas realizaciones, la expresión "de manera secuencial" se refiere a los componentes del kit que se administran con 1, 3, 5, 7, 10, 30 o 60 días de diferencia entre sí. En algunas realizaciones, la expresión "de manera secuencial" se refiere a los componentes del kit que se administran con 2, 4 o 6 meses de diferencia entre sí.

Como se ha explicado anteriormente, el segundo componente del kit (es decir, el inhibidor del punto de control inmunitario) es capaz de disminuir o bloquear un punto de control inmunitario para permitir una actividad inmunitaria más extensa. En algunas realizaciones, se prefiere administrar el segundo componente del kit después del primer componente del kit. De esta manera, el segundo componente del kit surte efecto cuando se inicia una respuesta inmunitaria de linfocitos T en respuesta a la vacunación con el primer componente del kit (que, en la presente invención, es la mezcla de polipéptidos). Se prefiere administrar el segundo componente del kit durante la fase de inicio de la vacunación. En algunas realizaciones, esto es en un plazo de 30, 21, 14, 10, 7, 5, 3 o 1 días desde la vacunación inicial con el primer componente del kit. A continuación se describen más detalles sobre las pautas del tratamiento de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la administración del segundo componente del kit después del primer componente del kit y dentro del período de tiempo antes mencionado promueve una expansión rápida y eficaz de linfocitos T específicos del primer componente del kit de una población de linfocitos T indiferenciados en los órganos linfoides primarios (es decir, una respuesta inmunitaria primaria rápida y eficaz). Se cree que esto se debe a que el segundo componente del kit surte efecto a medida que se desarrolla la respuesta de los linfocitos T y evita que el punto de control inmunitario atenúe la respuesta. Por tanto, se promueve una fuerte respuesta inmunitaria *de novo*, lo que se traduce en un mayor beneficio clínico como se describe a continuación. Además, se cree que la administración del segundo componente del kit después del primer componente del kit y dentro del período de tiempo antes mencionado contribuye a la generación de una respuesta inmunitaria acelerada de linfocitos T CD4+.

La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada componente del kit se puede realizar mediante cualquier vía adecuada que incluye, pero sin limitación, vías intradérmicas, vías orales, vías intravenosas, vías subcutáneas, vías intramusculares, absorción directa a través de los tejidos de las membranas mucosas (por ejemplo, nasal, bucal, vaginal y rectal) y vías oculares (por ejemplo, intravítrea, intraocular, etc.). Los componentes del kit se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes. En particular, se prefiere que los componentes del kit se administren mediante inyección. En una realización, los componentes del kit se inyectan directamente en un tumor de un paciente. Si el cáncer a tratar está en la nariz o la boca de un paciente, entonces en algunas realizaciones, los componentes del kit, la composición o la composición farmacéutica se administran mediante pulverización e inhalación.

Una dosis adecuada del primer componente del kit, que, en la presente invención, es la mezcla de polipéptidos (también se divulga en el presente documento una molécula de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido descrito en el presente documento) está entre 100 y 700 µg, aunque en ocasiones pueden necesitarse dosis fuera de este intervalo (por ejemplo, de 1 a 1500 µg). En particular, se prefiere una dosis de 300 µg. En el presente documento también se divulga que el primer componente del kit es un linfocito T y se proporciona a una dosis de  $10^6$  a  $10^{11}$  células. Una dosis adecuada del segundo componente del kit (es decir, el inhibidor del punto de control inmunitario) es 3 mg/kg, aunque en ocasiones pueden ser necesarias otras dosis (por ejemplo, de 1 µg/kg a 10 mg/kg).

En algunas realizaciones, se sigue una pauta de tratamiento que comprende entre dos y cinco administraciones del segundo componente del kit (es decir, el inhibidor del punto de control inmunitario) en donde cada administración está separada por entre dos y cinco semanas. En una realización preferida, se sigue una pauta de tratamiento que comprende tres administraciones del inhibidor del punto de control inmunitario en donde cada administración está separada por tres semanas.

En algunas realizaciones, el primer componente del kit, que, en la presente invención, es la mezcla de polipéptidos (también se divulga en el presente documento una molécula de ácido nucleico o un receptor de linfocitos T o linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T) se administra al paciente de acuerdo con la siguiente pauta de tratamiento. Se administra el primer componente del kit: (i) antes de la primera administración del inhibidor del punto de control inmunitario; (ii) antes de cada readministración del inhibidor del punto de control inmunitario; y (iii) después de completar la pauta de tratamiento con el inhibidor del punto de control inmunitario. Se prefiere que se proporcionen administraciones múltiples del primer componente del kit en las etapas (i), (ii) y (iii).

En particular, se prefiere que se proporcionen de una a cinco administraciones del primer componente del kit en las etapas (i) y (ii) en los siete días anteriores a la primera administración o readministración del inhibidor del punto de control respectivamente. En especial se prefiere que se proporcionen de una a tres administraciones del primer componente del kit. En algunas realizaciones, la administración del primer componente del kit en la etapa (i) se proporciona entre uno y tres días antes de la primera administración del inhibidor del punto de control. También se prefiere que el primer componente del kit se administre mensualmente al paciente una vez completado la pauta de tratamiento con el inhibidor del punto de control inmunitario (es decir, la etapa (iii)). En una realización alternativa, la administración del primer componente del kit en la etapa (iii) es trimestral.

En una realización, el primer componente del kit se administra con un componente adicional como se explicó anteriormente. En particular, se prefiere que el primer componente del kit se administre con GM-CSF. Una dosis adecuada de GM-CSF está entre 50 y 100 µg. En particular, se prefiere una dosis de 75 µg.

En algunas realizaciones, la pauta de tratamiento que utiliza el primer y segundo componente del kit dura un total de 48 semanas desde la primera administración del segundo componente del kit. En realizaciones alternativas, la pauta de tratamiento es más corta o más larga que 48 semanas.

Como se ha indicado anteriormente, el al menos un polipéptido descrito en el presente documento es de un autoantígeno y/o un antígeno tumoral universal, que está asociado con una amplia gama de tipos de cáncer. Por tanto, la eficacia de la presente invención no se limita a ningún tipo particular de cáncer. En la presente invención, el autoantígeno y/o un antígeno tumoral universal es hTERT y, por lo tanto, en principio, los componentes del kit, la composición o la composición farmacéutica se pueden administrar a un paciente que padece cualquier tipo de cáncer en el que el gen de la telomerasa está activo. Dichos cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, melanoma maligno, leucemias, linfomas, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino y carcinomas de las vías biliares. Sin embargo, ya que la enzima telomerasa se expresa en la gran mayoría de los cánceres, debe entenderse que la eficacia de la invención no se limita a ningún tipo particular de cáncer.

Que la telomerasa se expresa en la gran mayoría de los cánceres ha sido demostrado en estudios tales como el de Kim *et al.* Science. 23 de diciembre de 1994;266(5193):2011-5 y Bearss *et al.* Oncogene. 27 de diciembre de 2000;19(56):6632-41.

Kim *et al.* 1994 ha demostrado que, en células cultivadas que representan 18 tejidos humanos diferentes, 98 de 100 poblaciones inmortales y ninguna de 22 poblaciones mortales dieron positivo para la telomerasa. Los tejidos humanos de los que procedían las estirpes celulares inmortales que tienen actividad telomerasa incluyeron: piel, conjuntivo, adiposo, mama, pulmón, estómago, páncreas, ovario, cuello uterino, riñón, vejiga, colon, próstata, SNC, retina y sangre. Por tanto, la presente invención sería adecuada para usar contra cánceres procedentes de estos tejidos. De forma similar, 90 de 101 biopsias que representan 12 tipos de tumores humanos y ninguna de 50 tejidos somáticos normales fueron positivas para telomerasa. Los tipos de tumores humanos que presentaron actividad telomerasa incluyeron: carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, carcinoma epidermoide (de cabeza y cuello), tumor de Wilms, cáncer de mama (ductal y lobulillar, ganglio positivo), cáncer de mama (ganglio axilar negativo), cáncer de próstata, neoplasia intraepitelial prostática de tipo 3, hiperplasia benigna de próstata, neuroblastoma, tumores cerebrales, carcinoma microcítico de pulmón, rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma, neoplasias malignas hemáticas (incluidas la leucemia linfocítica aguda, la leucemia linfocítica crónica, linfoma (adulto)),

Bearss *et al.* 2000 ha demostrado además la presencia de actividad telomerasa en células tumorales extraídas directamente de pacientes de una amplia gama de tipos de cáncer. Estos tipos de tumores incluyeron: neoplasias malignas hemáticas (incluidas la leucemia mieloide aguda, la leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica (temprana), leucemia linfocítica crónica (tardía), mieloma, linfoma de bajo grado, linfoma de alto grado); mama; próstata; pulmón (incluyendo no microcítico y microcítico); colon; ovario; cabeza y cuello; riñón; melanoma; neuroblastoma; glioblastoma; carcinoma hepatocelular; gástrico; y vejiga.

Ha de comprenderse que, ya que la telomerasa se activa en los tipos de cáncer mencionados anteriormente, la presente invención es adecuada para usar contra uno cualquiera de estos tipos de cáncer (y de hecho cualquier tipo de cáncer en el que se active la telomerasa). Asimismo, es evidente que, ya que la activación de la telomerasa es una propiedad común compartida entre los tipos de cáncer, la presente invención no se limita a ningún tipo particular de cáncer.

Cabe señalar que algunos de los polipéptidos de la presente invención o divulgados en el presente documento (por ejemplo, el polipéptido de SEQ ID NO: 1) son más largos de los que normalmente se acomodarían en una molécula del MHC de clase I o de clase II. Se ha demostrado que los péptidos de esta longitud inducen respuestas inmunitarias más sólidas, por ejemplo, por grupos que trabajan en la vacunación contra el VPH y el cáncer de cuello uterino (Welters *et al.*, 2008). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que dichos polipéptidos, tras su administración a un paciente, son endocitados por las células, sometidos a degradación proteolítica en el proteosoma y después presentados en una molécula del MHC de clase I o clase II. Por lo tanto, dichos polipéptidos pueden dar lugar a una respuesta de linfocitos T restringida al MHC de clase I y/o al MHC de clase II. Debe apreciarse que esto se demuestra en la figura 6 (véase el ejemplo 6) porque diferentes clones de células CD4+ reactivos con la SEQ ID NO: 1 reconocen diferentes fragmentos peptídicos de este polipéptido de 30 unidades como resultado de la escisión proteolítica. También se debe apreciar que los polipéptidos más largos permanecen existentes dentro de un paciente durante un período de tiempo mayor que los polipéptidos más cortos y, por lo tanto, hay un período de tiempo más largo durante el cual pueden provocar una respuesta inmunitaria. Esto es particularmente significativo con respecto a aquellos polipéptidos que tienen una afinidad de unión al MHC relativamente baja.

También se debe apreciar que los individuos generalmente habrán desarrollado cierto grado de tolerancia inmunológica a polipéptidos de autoantígenos a través de un proceso mediante el cual los linfocitos T reactivos con dichos polipéptidos se destruyen en el timo del individuo durante el desarrollo de los linfocitos T. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, se desean polipéptidos de la presente invención con una afinidad de unión al MHC relativamente baja. Esto se debe a que los polipéptidos con menor afinidad de unión al MHC habrán estado expuestos a linfocitos T en maduración a un ritmo menor y, por lo tanto, es menos probable que todos los linfocitos T del individuo reactivos con el polipéptido se hayan eliminado del repertorio de linfocitos T del individuo. Por lo tanto, los polipéptidos que tienen una afinidad de unión al MHC relativamente baja son, en algunas realizaciones, capaces de superar la tolerancia inmunológica más fácilmente.

#### *Efecto sinérgico*

La mezcla de polipéptidos y el inhibidor del punto de control producen un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer. En el presente documento también se divulga que el al menos un polipéptido de un autoantígeno o antígeno tumoral universal, que tiene al menos 12 aminoácidos de longitud, la molécula de ácido nucleico, el receptor de linfocitos T, o el linfocito T que presenta el receptor de linfocitos T, como se describe en el presente documento, y el inhibidor del punto de control inmunitario producen un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer.

El efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer comprende: una reducción en el tiempo necesario por el sistema inmunitario del paciente para generar una respuesta inmunitaria medible contra al menos un polipéptido de la invención; la generación de una fuerte respuesta inmunitaria al al menos un polipéptido (es decir, un índice de estimulación, IE  $\geq 3$ ); y un resultado clínico mejorado (es decir, una respuesta parcial o completa (también conocida como remisión parcial o completa) o enfermedad estable). En algunas realizaciones, el efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer también comprende la inducción de una respuesta inmunitaria amplia (es decir, generar una respuesta inmunitaria contra 2, 3 o más componentes de la vacuna).

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la capacidad de el al menos un polipéptido de la invención para provocar una respuesta de linfocitos T CD4+ es de esencial importancia para el efecto sinérgico. Con referencia a la figura 1, se muestra el mecanismo por el cual se espera que el polipéptido de la presente invención provoque una respuesta de linfocitos T CD4+. Mediante la utilización de polipéptidos largos, se estimulan los linfocitos T CD4+. Estas células desempeñan un papel complejo en el microambiente tumoral y pueden interactuar directamente con las células tumorales y una serie de efectores inmunitarios, lo que lleva a la destrucción de las células tumorales. Las células tumorales muertas liberan más antígeno que a su vez es absorbido por las células presentadoras de antígeno, estimulando una segunda ola de inmunidad de linfocitos T dirigida a otros antígenos tumorales, un fenómeno llamado "propagación de epítomos".

La combinación del polipéptido capaz de provocar una respuesta de linfocitos T CD4+ y la inhibición del punto de control inmunitario da como resultado una respuesta inmunitaria que se produce rápidamente en una proporción elevada de pacientes, así como un aumento eficaz de respuestas inmunitarias bajas o no detectables en otros pacientes. Esto da como resultado una alta elevada de respuesta clínica (es decir, la proporción de pacientes con una respuesta parcial o completa (también conocida como remisión parcial o completa) o enfermedad estable). En particular, el polipéptido de la invención proporciona una respuesta inmunitaria específica del cáncer a pacientes que carecen de dicha respuesta, y también aumentará la respuesta inmunitaria espontánea débil o subóptima en los pacientes, ampliando así en gran medida el número de pacientes que pueden beneficiarse clínicamente de la inhibición del punto de control inmunitario. La inhibición del punto de control inmunitario elimina la influencia negativa del punto de control en la proliferación de linfocitos T y, por lo tanto, da como resultado una respuesta de linfocitos T más rápida y clínicamente eficaz en una proporción mayor de pacientes. Esto incluye convertir respuestas negativas al polipéptido de la invención en una respuesta positiva permitiendo una expansión clonal extendida mucho después de la terminación de la vacunación con el polipéptido.

Debe apreciarse que la presente invención es particularmente útil en los siguientes entornos clínicos. Primero, en

grupos de pacientes en los que el paciente tiene un tumor en el que las respuestas inmunitarias espontáneas generalmente están ausentes (es decir, indicaciones de tumores en las que la inhibición del punto de control inmunitario no ha logrado proporcionar beneficio clínico anteriormente) y en grupos de pacientes en los que sólo una pequeña fracción de los pacientes responde a la inhibición del punto de control inmunitario (por ejemplo, pacientes con melanoma maligno). Segundo, en grupos de pacientes en los que vacunas contra el cáncer anteriores han demostrado su capacidad para provocar respuestas inmunitarias a vacunas de péptidos largos y en pacientes en los que se pueden desarrollar vacunas contra el cáncer, pero no pueden proporcionar un beneficio clínico sustancial a pesar de su capacidad para inducir respuestas inmunitarias después de la vacunación. En una realización, la presente invención se utiliza en grupos de pacientes en los que la terapia del punto de control inmunitario actualmente tiene un beneficio clínico marginal o nulo y la invención provoca respuestas inmunitarias *de novo* después de la vacunación con la mezcla de polipéptidos.

### Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la invención se describirá de manera específica con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no limitan el alcance técnico de la invención.

### Materiales y métodos

#### Ensayo de respuesta de linfocitos T (proliferación por incorporación de 3H-timidina)

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) antes del inicio de la vacunación y en múltiples momentos después de la vacunación. Las PBMC se aislaron y congelaron como se describió anteriormente (Inderberg-Suso E. M. *et al.*, Oncoimmunology 2012 1(5):670-686. Los cultivos de linfocitos T generados a partir de PBMC antes y después de la vacunación, y después de una estimulación previa *in vitro* con el péptido de la vacuna se probaron posteriormente en un ensayo de proliferación de linfocitos T estandarizado utilizando la incorporación de 3H-timidina como se describió anteriormente (Inderberg-Suso E. M. *et al.*, Oncoimmunology 2012 1(5):670-686). Se utilizaron PBMC autólogas irradiadas como células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *antigen presenting cells*). Se incubaron linfocitos T (50000) con 50000 APC con y sin el antígeno en cuestión (por ejemplo, la combinación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 así como los polipéptidos individuales de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3). Los cultivos de linfocitos T se probaron por triplicado. El error estándar de la media (EEM) solía ser inferior al 10 %. Las respuestas masivas de linfocitos T se consideraron específicas de antígeno cuando el índice de estimulación (IE; respuesta con antígeno dividida por respuesta sin antígeno) fue igual o superior a 3 (SI  $\geq 3$ ).

#### Ensayo ELISPOT

Los ensayos ELISPOT de IFN- $\gamma$  se realizaron esencialmente como se describió anteriormente (Gjertsen M. K. *et al.* J Mol Med (Berl) 2003;81:43-50). El anticuerpo monoclonal contra IFN- $\gamma$  humano (Mabtech) se diluyó con PBS hasta una concentración final de 5  $\mu\text{g/ml}$ . Se recubrieron placas MultiScreen-HA de 96 pocillos (Millipore) con anticuerpo mediante la adición de 75  $\mu\text{l}$ /pocillo de la solución madre y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se almacenaron a temperatura ambiente durante 1 h antes de lavar los pocillos seis veces con 200  $\mu\text{l}$ /pocillo de PBS para eliminar el exceso de anticuerpo. Para bloquear la unión inespecífica, las placas se incubaron durante 1 a 2 h a 37 °C con 100  $\mu\text{l}$  por pocillo de medio CellGro DC más suero humano al 10 % (HS; Baxter). Se enumeraron PBMC autólogas descongeladas y lavadas y se añadieron a los pocillos prerrevestidos a 5  $\times 10^5$  células/pocillo. Los linfocitos T respondedores se recogieron, lavaron, enumeraron y transfirieron en medio CellGro DC (CellGenix) por triplicado a los pocillos que contenían PBMC autólogas a 1  $\times 10^5$  células por pocillo. Se incluyeron controles negativos con linfocitos T únicamente y PBMC únicamente y controles positivos con linfocitos T + PBMC + enterotoxina de *Staphylococcus* C3 (SEC3; Toxin Technologies). Después de una incubación durante la noche a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en una incubadora humidificada, las placas se lavaron seis veces con PBS. Entre el segundo y tercer lavado, las placas se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. A cada pocillo, se añadieron 75  $\mu\text{l}$  de una solución madre de 1  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo biotinilado contra IFN- $\gamma$  humano (Mabtech) y las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Después de seis lavados repetidos, las placas se incubaron durante 1 h con 75  $\mu\text{l}$  por pocillo de estreptavidina-ALP (Mabtech) de una solución madre (diluida 1:1000 en PBS más HSA al 1 %). Para eliminar el exceso de anticuerpo, los pocillos se lavaron de nuevo seis veces con PBS. A continuación, después de añadir 75  $\mu\text{l}$  de sustrato BCIP/NBT (Sigma-Aldrich) a cada pocillo, las placas se incubaron durante 5 a 20 min. Cuando aparecieron las manchas, se añadió agua para detener la reacción. Las manchas se enumeraron con un analizador automatizado, CTL IMMUNOSPOT S5 VERSA-02-9030 (Cellular Technology Ltd).

Ejemplo 1: Los polipéptidos que tienen las secuencias de las SEQ ID NO: 1 y 2 y una combinación de las SEQ ID NOS: 1, 2 y 3 son capaces de provocar una respuesta de linfocitos T CD4+

Respuestas de linfocitos T de sangre periférica en un paciente con melanoma que se había vacunado con las SEQ ID NO: 1, 2 y 3. Los linfocitos T se estimularon *in vitro* con las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 así como una combinación de los tres polipéptidos. Los ensayos de proliferación de linfocitos T y los ensayos ELISPOT se realizaron según la sección de materiales y métodos como se establece en el presente documento. Los resultados se presentan en las figuras 2A y 2B y en las tablas 3A a 3C a continuación. 719-20 se refiere a la SEQ ID NO: 1, 725 se refiere a la SEQ ID NO: 2, 728



se refiere a la SEQ ID NO: 3 y la mezcla hTERT1 se refiere a una combinación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3. Se calculó un índice de estimulación (IE) para todos los polipéptidos analizados en el ensayo de proliferación de linfocitos T. Se consideró positivo un IE  $\geq 3$ .

5

Tabla 3A: Resultados del ensayo de proliferación de linfocitos T

	n.º 02 ES			
	Semana 1	Semana 4	Semana 7	Semana 12
<b>719-20</b>	0,9	22,1	56,3	17,7
<b>725</b>	1,0	13,7	16,8	15,3
<b>728</b>	0,9	0,7	0,5	0,8
<b>mezcla hTert 1</b>	0,9	25,2	60,0	20,1

Tabla 3B: Resultados del ensayo ELISPOT

	T	APC	T+APC	Sec 3	719-20 725	728	mezcla hTert 1
Recuento de manchas promedio	0	0	1	115	182 196	1	163
Desviación típica	0,6	0	1	24	57 107	1	96

Tabla 3C: Sumario de datos

Punto temporal de la muestra	Respuesta inmunitaria Proliferación	Respuesta inmunitaria ELISPOT
Visita 1, semana 1	No	No realizado
Visita 8, semana 4	Sí	No realizado
Visita 10, semana 7	Sí	No realizado
Visita 13, semana 12	Sí	Sí

10

Con referencia a la figura 2A, se muestra que las SEQ ID NO: 1, 2, y la combinación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 provocaron una fuerte respuesta inmunitaria en el paciente con melanoma en las semanas 4, 7 y 12 después de la vacunación con una combinación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3. Este ensayo es el ensayo convencional para las respuestas de los linfocitos T CD4+. Con referencia a la figura 2B, se muestra que una respuesta inmunitaria positiva a las SEQ ID NO: 1, 2 y a la combinación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 se detectó mediante el ensayo ELISPOT en la semana 12 después de la vacunación en el paciente con melanoma. Este ensayo se ha desarrollado principalmente para medir las respuestas de los linfocitos T CD8+.

15

20

Por tanto, las SEQ ID NO: 1 y 2, y la combinación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 fueron capaces de provocar una respuesta de linfocitos T CD4+ en un paciente con melanoma.

Ejemplo 2: Inmunogenicidad de fragmentos polipeptídicos de un polipéptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1.

25

Se generaron linfocitos T CD4+ a partir de dos pacientes con melanoma (pacientes P7 y P9) y un paciente con cáncer de pulmón (paciente P5). A los pacientes no se les había administrado previamente una vacuna contra el cáncer. Los linfocitos T CD4+ se estimularon *in vitro* con la SEQ ID NO: 1 o fragmentos de la misma que comprenden 14 aminoácidos (como se establece en la tabla 4 a continuación). Se realizó un ensayo de proliferación de linfocitos T según la sección de materiales y métodos como se establece en el presente documento. Se consideró positivo un IE  $\geq 2$ . Los resultados se muestran en las figuras 3A a C.

30

Tabla 4: Fragmentos polipeptídicos de un polipéptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO.	SECUENCIA	NOMBRE DEL FRAGMENTO
1	ALFSLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHR	719-20
7	ALFSLNYERARRP	719-20-1
8	LFSLNYERARRPG	719-20-2
9	FSVLNYERARRPGL	719-20-3
10	SVLNYERARRPGLL	719-20-4
11	VLNYERARRPGLLG	719-20-5
12	LNTERARRPGLLGA	719-20-6
13	NYERARRPGLLGAS	719-20-7
14	YERARRPGLLGASV	719-20-8
15	ERARRPGLLGASVL	719-20-9
16	RARRPGLLGASVLG	719-20-10
17	ARRPGLLGASVLGL	719-20-11
18	RRPGLLGASVLGLD	719-20-12
19	RPGLLGASVLGLDD	719-20-13
20	PGLLGASVLGLDDI	719-20-14
21	GLLGASVLGLDDIH	719-20-15
22	LLGASVLGLDDIHR	719-20-16
23	LGASVLGLDDIHR	719-20-17

Con referencia a la figura 3A, se muestra la estimulación de clones de linfocitos T (clones 28-2 y 5-2) tomados del paciente con melanoma P7 por un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 y por los fragmentos peptídicos 719-20-13, 719-20-14, 719-20-15 y 719-20-16. Cada péptido provocó una fuerte respuesta de los clones 28-2 y 5-2.

5 El IE del clon 28-2 fue excepcionalmente elevado y muestra que estos péptidos pueden seleccionar clones de linfocitos T de actividad inusualmente elevada del repertorio de linfocitos T de pacientes con cáncer. Dado que ambos clones estaban restringidos por HLA-DQ6, estos resultados demuestran además que el repertorio de linfocitos T que reconocen estos péptidos presentados por una determinada molécula del HLA de clase II es complejo.

10 Con referencia a la figura 3B, se muestra la estimulación de clones de linfocitos T (clon 9 y 80) tomados del paciente P9 con melanoma por un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 y por los fragmentos peptídicos 719-20-2, 719-20-3, 719-20-4, 719-20-5, 719-20-6, 719-20-7, 719-20-8 y 719-20-9. Se observó una estimulación particularmente fuerte del clon 9 de linfocitos T del P9 con melanoma para los fragmentos peptídicos 719-20, 719-20-3, 719-20-4, 719-20-5, 719-20-6 y 719-20-7. Ambos clones de linfocitos T estaban restringidos por HLA-DR8, demostrando de nuevo que los linfocitos T que reconocen el mismo péptido presentado por la misma molécula del HLA de clase II son heterogéneas.

20 Con referencia a la figura 3C, se muestra la estimulación de un clon de linfocitos T (clon 109; restringido por HLA-DR8) tomado de un paciente P5 con cáncer de pulmón por un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 y por los fragmentos peptídicos 719-20-2, 719-20-4, 719-20-5 y 719-20-6. Cada péptido provocó una fuerte respuesta a partir del clon 109.

25 En conclusión, los fragmentos peptídicos de la SEQ ID NO: 1 estimularon con éxito clones de linfocitos T CD4+ a partir de muestras de pacientes. Asimismo, se reconocieron 12/17 fragmentos peptídicos analizados entre los cinco clones de linfocitos T analizados.

#### Ejemplo 3: Motivos de unión a MHC de clase II de la SEQ ID NO: 1.

30 Los motivos de unión a MHC de clase II de la SEQ ID NO: 1 y los fragmentos inmunogénicos de la secuencia se calcularon y se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5: Motivos de unión a MHC de clase II de la SEQ ID NO: 1 y fragmentos inmunogénicos de los mismos**

SEQ ID NO.	Secuencia	Motivo de unión a MHC
1	ALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRA	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
24	SVLNYERARRPGLLG	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
25	FSVLNYERARRPGLL	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
26	ARRPGLLGASVLGLD	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
27	RARRPGLLGASVLGL	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
28	VLNYERARRPGLLGA	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
29	RPGLLGASVLGLDDI	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)
30	VLNYERARRPGLLGA	Th (HLA-DR*01, 04, 07, 15)

35 Como se puede observar a partir de la tabla 5, el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y sus fragmentos inmunogénicos son capaces de unirse a una amplia gama de moléculas HLA (hay que tener en cuenta que en la tabla 5 solo se muestran aquellas que presentan epítomos Th). Por tanto, este polipéptido es capaz de generar respuestas inmunitarias en una población de pacientes muy amplia.

#### Ejemplo 4: Inmunogenicidad de fragmentos polipeptídicos de un polipéptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 2.

45 Se generaron linfocitos T CD4+ a partir de una paciente con melanoma (paciente P7) y una paciente con cáncer de ovario (paciente P1). A los pacientes no se les había administrado previamente una vacuna contra el cáncer. Los linfocitos T CD4+ se estimularon *in vitro* con la SEQ ID NO: 2 o fragmentos de la misma que comprenden 12 aminoácidos (como se establece en la tabla 6 a continuación). Se realizó un ensayo de proliferación de linfocitos T según la sección de materiales y métodos como se establece en el presente documento. Se consideró positivo un IE  $\geq 2$ . Los resultados se presentan en la figura 4.

Tabla 6: Fragmentos polipeptídicos de un polipéptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 2

SEQ ID NO.	SECUENCIA	NOMBRE DEL FRAGMENTO
2	RTFVLRVRAQDPPE	725
31	RTFVLRVRAQDP	725-1
32	TFVLRVRAQDPP	725-2
33	FVLRVRAQDPPP	725-3
34	VLRVRAQDPPE	725-4

Con referencia a la figura 4, se muestra la estimulación de linfocitos T tomados del paciente P7 con melanoma y de P1 con cáncer de ovario por un polipéptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 2 y por los fragmentos polipeptídicos 725-2 y 725-4.

Los fragmentos polipeptídicos de la SEQ ID NO: 2 estimularon con éxito los linfocitos T de las muestras de los pacientes. Asimismo, se reconocieron 2/4 de los fragmentos polipeptídicos analizados entre los pacientes con cáncer analizados.

Ejemplo 5: Un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 y fragmentos del mismo son capaces de provocar una respuesta de linfocitos T CD4+

Los linfocitos T CD4+ se generaron a partir de un paciente con cáncer de páncreas (paciente P1) y un paciente con glioblastoma (paciente P5) a quienes no se les había administrado una vacuna contra el cáncer. Los linfocitos T CD4+ se estimularon *in vitro* con la SEQ ID NO: 3 o fragmentos de la misma que comprenden 12 aminoácidos (como se establece en la tabla 7 a continuación). Se realizó un ensayo de proliferación de linfocitos T según la sección de materiales y métodos como se establece en el presente documento. Se consideró positivo un IE  $\geq 3$ . Los resultados se presentan en la figura 5.

Tabla 7: Fragmentos polipeptídicos de un polipéptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 3

SEQ ID NO.	SECUENCIA	NOMBRE DEL FRAGMENTO
3	AERLTSRVKALFSVL	728
35	AERLTSRVKALF	728-1
36	ERLTSRVKALFS	728-2
37	RLTSRVKALFSV	728-3
38	LTSRVKALFSVL	728-4

Con referencia a la figura 5, se muestra que un polipéptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 3 y fragmentos del mismo provocaron una respuesta de linfocitos T CD4+ en un paciente con cáncer de páncreas y otro con glioblastoma no vacunados. Se observó una estimulación particularmente fuerte de los linfocitos T CD4+ para el fragmento peptídico 728-2 en el paciente con cáncer de páncreas, mientras que todos los fragmentos estimularon fuertemente las células del paciente con glioblastoma.

En conclusión, la SEQ ID NO: 3 y fragmentos de la misma fueron capaces de estimular linfocitos T CD4+ en pacientes con cáncer de páncreas y glioblastoma no vacunados.

Ejemplo 6: Los fragmentos polipeptídicos de un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 son capaces de provocar una respuesta de linfocitos T CD4+

Se generaron clones de linfocitos T CD4+ específicos para la SEQ ID NO: 1 a partir de un paciente que se había vacunado con la combinación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y se estimularon con una biblioteca superpuesta de péptidos de 14 unidades de la SEQ ID NO: 1. La proliferación de clones de linfocitos T se midió después de la estimulación peptídica utilizando ensayos de respuesta de linfocitos T (proliferación mediante incorporación de 3H-timidina) según los materiales y métodos. Los datos se muestran en la figura 6.

Con referencia a la figura 6, se muestra que los clones de linfocitos T CD4+ específicos para la SEQ ID NO: 1 reconocieron diferentes fragmentos de 14 unidades del polipéptido de SEQ ID NO: 1 dependiendo de la restricción de HLA. Por tanto, la vacunación con la SEQ ID NO: 1 de longitud completa es capaz de producir una amplia respuesta de linfocitos T CD4+ porque se estimulan clones de linfocitos T con diferente restricción de HLA (por ejemplo, clones

de linfocitos T restringidos por HLA-DR y HLA-DQ).

En conclusión, los fragmentos de un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 fueron capaces de provocar una respuesta de linfocitos T CD4+ en clones de linfocitos T con diferentes restricciones por HLA.

#### Ejemplo 7: Datos de respuesta clínica de pacientes con melanoma maligno metastásico o irresecable que recibieron una vacuna contra el cáncer en combinación con ipilimumab

En un ensayo clínico se investigó el tratamiento combinado con un agente bloqueador anti-CTLA-4 y una vacuna contra el cáncer (que comprendía péptidos largos capaces de inducir una respuesta de linfocitos T colaboradores específicos del cáncer). En el ensayo (número EudraCT: 2013-005582-39), la combinación de ipilimumab y una vacuna contra el cáncer que comprende una mezcla de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 se investigó en pacientes con melanoma maligno metastásico o irresecable.

Ipilimumab es una inmunoglobulina monoclonal totalmente humana específica para el antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos humanos (CTLA-4, CD152), una molécula inmunomoduladora que se expresa en un subconjunto de linfocitos T activados. El mecanismo de acción propuesto para ipilimumab es la interrupción de la interacción de CTLA-4 con las moléculas coestimuladoras de B7 (CD80 o CD86) expresadas en células presentadoras de antígenos, lo que da como resultado la inhibición de la función moduladora descendente de CTLA-4.

La vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 es una vacuna terapéutica inyectable contra el cáncer actualmente en desarrollo para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Consiste en una mezcla de tres péptidos sintéticos, de 15 y 30 aminoácidos de largo, que representan fragmentos de la proteína de origen natural, una subunidad de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), y que son capaces de inducir una respuesta de linfocitos T colaboradores específicos del cáncer.

### **Ensayo clínico**

#### *Diseño*

Este fue un ensayo de intervención de fase I/IIa, sin ocultamiento, con un solo grupo que examina la seguridad y tolerabilidad de la combinación de ipilimumab y la vacuna contra el cáncer en pacientes con melanoma maligno metastásico o irresecable.

#### *Pauta de tratamiento*

Los pacientes recibieron ipilimumab y la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 junto con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Se administró ipilimumab cada 3 semanas hasta un total de 4 dosis. GM-CSF y la vacuna contra el cáncer se administraron 7, 5 y 3 días antes de la primera dosis de ipilimumab. La cuarta dosis de GM-CSF y la vacuna contra el cáncer se administraron 11 días después de la primera dosis de ipilimumab y después 3 días antes de cada dosis de ipilimumab y posteriormente cada 4 semanas para un total de hasta 9 dosis de vacuna.

#### *Resultados*

De los 14 primeros pacientes inscritos en este estudio, 12 fueron elegibles y tratados. Los pacientes tenían una edad media de 58,7 años (intervalo de 48 a 74). Eran cinco mujeres y siete hombres. Se recogieron datos de respuesta clínica con un tiempo de seguimiento de 5 a 14 meses desde el inicio del tratamiento y se muestran en la tabla 8. Con referencia a la tabla 8, seis de los doce pacientes tuvieron una respuesta clínica, tres de ellos tuvieron una respuesta parcial y tres presentaron la enfermedad estable.

**Tabla 8: Datos de respuesta clínica**

Mejor respuesta tumoral *					
N = 12	RC	RP	EE	EP	Muertes
Número de pacientes (%)	0	3 (25)	3 (25)	4 (33)	2 (17)
*Basado en evaluación clínica					

RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; EE: enfermedad estable; EP: enfermedad progresiva. La mejor respuesta tumoral es la mejor respuesta registrada durante el tiempo de observación.

#### *Discusión*

Los resultados descritos anteriormente dan una tasa de control de la enfermedad (la proporción de pacientes con

respuesta parcial o completa o enfermedad estable) del 50 %. Hodi *et al.* 2010 notificaron los resultados de un estudio de fase 3 en una población de pacientes similar donde la tasa de control de la enfermedad (mejor respuesta general) en el grupo de pacientes que recibió ipilimumab solo fue del 28,5 % (la mediana del tiempo de seguimiento fue de 27,8 meses) y la tasa de control de la enfermedad en el grupo de pacientes que recibió ipilimumab y la vacuna contra el

5 cáncer gp100 fue del 20,1 % (la mediana del tiempo de seguimiento fue de 21 meses) (Hodi *et al.* N Inglés J Med. 2010 363(8):711-23). Es importante destacar que, la tasa de respuesta parcial en el estudio actual fue del 25 %. Hodi *et al.* 2010 notificaron tasas de respuesta parcial del 5,5 % y del 9,5 % para el grupo de ipilimumab más Gp100 y el grupo de ipilimumab solo, respectivamente. Gp100 es una vacuna contra el cáncer que comprende péptidos de 9 unidades restringidos por HLA-A\*0201 procedentes de la proteína melanosomal, glucoproteína 100 (Gp100).

10 Por tanto, la tasa de control de enfermedades observada en el ensayo clínico anterior, donde los pacientes con melanoma maligno irresecable o metastásico recibieron una vacuna contra el cáncer que comprende tres péptidos largos de hTERT junto con ipilimumab, fue claramente mayor que la observada en una población de pacientes similar cuando se administró ipilimumab solo o junto con una vacuna contra el cáncer que comprende un péptido corto (9

15 unidades) procedente de gp100. En particular, la tasa de respuesta parcial del ensayo clínico anterior fue sustancialmente mayor que la notificada por Hodi *et al.* 2010.

Ejemplo 8: Datos de supervivencia general de pacientes con melanoma maligno irresecable o metastásico que recibieron una vacuna contra el cáncer junto con ipilimumab

#### 20 *Introducción*

Este ejemplo proporciona datos adicionales del ensayo clínico tal como se establece en el ejemplo 7.

#### 25 *Resultados*

De los 14 primeros pacientes inscritos en este estudio, 12 fueron elegibles y tratados. Los pacientes tenían una edad media de 58,7 años (intervalo de 48 a 74). Eran cinco mujeres y siete hombres.

30 La tasa de supervivencia general (SG) a los 18 y 12 meses desde la aleatorización fue del 75 % (9/12).

Aún no se había alcanzado la mediana de supervivencia general. Sin embargo, con datos de seguimiento disponibles para la supervivencia que varían de 18 a 28 meses, la mediana de supervivencia general fue de al menos 18 meses. En general, la supervivencia general se define como el tiempo transcurrido desde la aleatorización en el estudio clínico

35 hasta la muerte por cualquier causa.

#### *Discusión*

Hodi *et al.* 2010 notificaron los resultados de un estudio de fase 3 en una población de pacientes similar donde la tasa

40 de SG a 1 año fue del 46 % en el grupo de pacientes que recibió ipilimumab solo y del 44 % en el grupo de pacientes que recibió ipilimumab y la vacuna contra el cáncer gp100 (Hodi *et al.* N Engl J Med. 2010 363(8):711-23). Gp100 es una vacuna contra el cáncer que comprende péptidos de 9 unidades restringidos por HLA-A\*0201 procedentes de la proteína melanosomal, glucoproteína 100 (Gp100). Hodi informó una mediana de supervivencia general de 10,1 meses en el grupo de ipilimumab solo y de 10,0 meses en el grupo de ipilimumab más gp100. La mediana del tiempo de

45 seguimiento para la supervivencia fue de 27,8 meses y 21 meses en los grupos de pacientes que recibieron ipilimumab solo e ipilimumab más gp100, respectivamente.

Por tanto, la supervivencia general a 1 año y la mediana de supervivencia general en el ensayo clínico anterior, donde los pacientes con melanoma maligno irresecable o metastásico recibieron una vacuna contra el cáncer que comprendía tres péptidos largos de hTERT junto con ipilimumab, fueron claramente superiores a las observadas en una población de pacientes similar cuando se administró ipilimumab solo o junto con una vacuna contra el cáncer que comprendía un péptido corto (9 unidades) procedente de gp100.

50

Ejemplo 9: Inducción de respuestas inmunitarias en muestras de pacientes con cáncer de pulmón y de próstata que recibieron una vacuna contra el cáncer sola en comparación con pacientes con melanoma que recibieron una vacuna contra el cáncer junto con ipilimumab

55

La vacuna terapéutica contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 se ha investigado en dos ensayos clínicos de fase 1/2A en pacientes con cáncer de pulmón (número EudraCT: 2012-001852-20) y cáncer de próstata (número EudraCT: 2012-002411-26) respectivamente.

60

Se ha investigado el tratamiento combinado con el anticuerpo anti-CTLA-4 ipilimumab y la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 en un ensayo clínico en melanoma (número EudraCT: 2013-005582-39).

#### 65 *Pauta de tratamiento*

## Ensayos en cáncer de pulmón y próstata:

Los estudios fueron estudios de fase I/IIa sin ocultamiento de aumento de dosis de la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 en pacientes con cáncer de próstata metastásico sensible a andrógenos y cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) después de completar la radioterapia y/o quimioterapia, respectivamente. La vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y GM-CSF se administró en los días 1, 3 y 5, después en las semanas 2, 3, 4, 6 y 8 seguidas de vacunas mensuales hasta los 6 meses.

## Ensayo de melanoma:

Los pacientes con melanoma maligno metastásico o irresecable recibieron ipilimumab y la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 junto con GM-CSF. Se administró ipilimumab cada 3 semanas hasta un total de 4 dosis de acuerdo con el procedimiento convencional. La vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y GM-CSF se administró antes y entre los tratamientos de ipilimumab y posteriormente cada 4 semanas durante un total de hasta 9 dosis de vacuna. De manera más específica, la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y GM-CSF se administraron 7, 5 y 3 días antes de la primera dosis de ipilimumab. La cuarta dosis de GM-CSF y la vacuna contra el cáncer se administraron 11 días después de la primera dosis de ipilimumab y después 3 días antes de cada dosis de ipilimumab y posteriormente cada 4 semanas para un total de hasta 9 dosis de vacuna.

## Análisis de la respuesta inmunitaria

Las respuestas inmunitarias se midieron mediante un ensayo de respuesta de linfocitos T (proliferación por incorporación de 3H-timidina) utilizando muestras de sangre de pacientes recogidas antes, durante y después del tratamiento según los materiales y métodos. La respuesta específica de los linfocitos T se consideró positiva si la respuesta peptídica era al menos 3 veces el fondo (Índice de estimulación, IE  $\geq 3$ ) para al menos uno de los péptidos de la vacuna o la combinación de los péptidos. Cualquier paciente que desarrolló una respuesta de linfocitos T específica positiva contra cualquiera de los péptidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3 durante el estudio se definió como paciente que responde de manera inmunitaria.

## Resultados

Los datos de respuesta inmunitaria después de la vacunación con 300 microgramos de la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 estaban disponibles de 7 pacientes del estudio de cáncer de próstata y de 6 pacientes del estudio de cáncer de pulmón. También se dispuso de muestras de sangre de 11 pacientes del estudio sobre melanoma (es decir, 300 microgramos de la vacuna contra el cáncer junto con ipilimumab) para el análisis de la respuesta inmunitaria. Los datos se resumen en la figura 7.

Con referencia a la figura 7, se muestra el porcentaje de pacientes que desarrollaron una respuesta inmunitaria positiva contra la vacuna en diferentes momentos después de la vacunación. En general, 10/11 (91 %) pacientes en el ensayo de melanoma tuvieron una respuesta inmunitaria positiva. Para el único paciente que no tuvo una respuesta positiva, sólo estaba disponible una muestra de sangre posterior a la vacunación a las 4 semanas. En general, el 86 % de los pacientes de los grupos combinados de cáncer de próstata y de pulmón tuvieron una respuesta inmunitaria positiva. Los pacientes que recibieron el tratamiento combinado de la vacuna contra el cáncer e ipilimumab desarrollaron una respuesta inmunitaria más rápida que los pacientes que recibieron la vacuna contra el cáncer sola. A las cuatro semanas, el 55 % de los pacientes que recibieron la combinación de la vacuna contra el cáncer e ipilimumab tuvieron una respuesta inmunitaria, mientras que pasaron 10 semanas antes de que más de la mitad (54 %) de los pacientes que recibieron la vacuna contra el cáncer sola desarrollaran una respuesta inmunitaria. Dos pacientes en el estudio del melanoma, dos pacientes en el estudio de cáncer de próstata y un paciente en el estudio de cáncer de pulmón tuvieron una respuesta inmunitaria espontánea a uno de los péptidos de la vacuna, todos ellos reforzados con la vacunación.

Por tanto, los resultados de la figura 7 demuestran que los pacientes que recibieron el tratamiento combinado de la vacuna contra el cáncer e ipilimumab desarrollaron respuestas inmunitarias a los polipéptidos de la vacuna más rápidamente que aquellos pacientes que recibieron la vacuna contra el cáncer sola. En general, una mayor proporción de los pacientes que recibieron el tratamiento combinado de la vacuna contra el cáncer e ipilimumab desarrollaron una respuesta inmunitaria contra uno de los polipéptidos de la vacuna durante el transcurso del estudio, en comparación con los pacientes que recibieron la vacuna contra el cáncer sola.

## Ejemplo 10: La combinación de una vacuna contra el cáncer e ipilimumab produce un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer

La vacuna terapéutica contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 se ha investigado en dos ensayos clínicos de fase 1/2A en pacientes con cáncer de pulmón (número EudraCT: 2012-001852-20) y cáncer de próstata (número EudraCT: 2012-002411-26) respectivamente.

Se ha investigado el tratamiento combinado con el anticuerpo anti-CTLA-4 ipilimumab y la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 en un ensayo clínico en melanoma (número EudraCT.: 2013-005582-39).

#### *Pauta de tratamiento*

5

Ensayos en cáncer de pulmón y próstata:

10

Los estudios fueron estudios de fase I/IIa sin ocultamiento de aumento de dosis de la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 en pacientes con cáncer de próstata metastásico sensible a andrógenos y CPNM después de completar la radioterapia y/o quimioterapia, respectivamente. La vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y GM-CSF se administró en los días 1, 3 y 5, después en las semanas 2, 3, 4, 6, 8 y 10 seguidas de inyecciones mensuales hasta los 6 meses.

15

Ensayo de melanoma:

20

Los pacientes con melanoma maligno metastásico o irresecable recibieron ipilimumab y la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 junto con GM-CSF. Se administró ipilimumab cada 3 semanas hasta un total de 4 dosis de acuerdo con el procedimiento convencional. La vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y GM-CSF se administró antes y entre los tratamientos de ipilimumab y posteriormente cada 4 semanas durante un total de hasta 9 dosis de vacuna. De manera más específica, la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y GM-CSF se administraron 7, 5 y 3 días antes de la primera dosis de ipilimumab. La cuarta dosis de GM-CSF y la vacuna contra el cáncer se administraron 11 días después de la primera dosis de ipilimumab y después 3 días antes de cada dosis de ipilimumab y posteriormente cada 4 semanas para un total de hasta 9 dosis de vacuna.

25

#### *Análisis de la respuesta inmunitaria*

30

Las respuestas inmunitarias se midieron mediante un ensayo de respuesta de linfocitos T (proliferación por incorporación de 3H-timidina) utilizando muestras de sangre de pacientes recogidas antes, durante y después del tratamiento según lo establecido en materiales y métodos. La respuesta específica de los linfocitos T se consideró positiva si la respuesta peptídica era al menos 3 veces el fondo (Índice de estimulación, IE  $\geq 3$ ) para al menos uno de los péptidos de la vacuna o la combinación de los péptidos. Cualquier paciente que desarrolló una respuesta de linfocitos T específica positiva contra cualquiera de los péptidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3 durante el estudio se definió como paciente que responde de manera inmunitaria.

35

#### *Resultados*

Ensayos en cáncer de pulmón y próstata:

40

En la tabla 9A se muestran los datos combinados para la cohorte de dosis de 300 microgramos de los ensayos de cáncer de pulmón y próstata. Sólo se incluyen los datos de los pacientes que respondieron. Para los 11 pacientes que respondieron de los 13 pacientes vacunados, se necesitó un promedio de 7,6 inyecciones de vacuna contra el cáncer (intervalo de 6 a 11) por paciente para obtener una respuesta inmunitaria positiva contra al menos uno de los péptidos de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 en la vacuna contra el cáncer. Esto corresponde a una dosis promedio de 2,3 mg de vacuna contra el cáncer (intervalo de 1,8 a 3,3 mg) por paciente. La fuerza promedio (IE) de la respuesta inmunitaria máxima en este grupo de pacientes fue 15,5 (intervalo de 3,7 a 34,5).

45

**Tabla 9A: Datos de pacientes en ensayos clínicos de pulmón y próstata**

<b>Cáncer de próstata y pulmón</b>			
<b>N.º de paciente</b>	<b>N.º de inyecciones</b>	<b>Cantidad de péptido (mg)</b>	<b>RI máxima</b>
L1	11	3,3	3,7
L2	7	2,1	15,5
L3	7	2,1	3,8
L4	9	2,7	19,4
L5	7	2,1	6,4
L6	8	2,4	5,8
L7	6	1,8	34,5



(continuación)

<b>Cáncer de próstata y pulmón</b>			
<b>N.º de paciente</b>	<b>N.º de inyecciones</b>	<b>Cantidad de péptido (mg)</b>	<b>RI máxima</b>
P1	6	1,8	39
P2	8	2,4	4,7
P3	8	2,4	31,6
P4	7	2,1	6,2
<b>Promedio</b>	<b>7,6</b>	<b>2,3</b>	<b>15,5</b>
RI: respuesta inmunitaria; L1-7: pacientes con cáncer de pulmón; P1-4: pacientes con cáncer de próstata			

Ensayo de melanoma:

- 5 En este estudio se utilizó la misma dosis de vacuna contra el cáncer (300 microgramos por inyección). Los datos se muestran en la tabla 9B. Diez de los once pacientes de este grupo desarrollaron una respuesta inmunitaria positiva a la vacuna contra el cáncer después de la vacunación. El número promedio de inyecciones de vacuna contra el cáncer necesarias para obtener una respuesta inmunitaria positiva en los 10 pacientes fue de 5 (intervalo de 3 a 7). Esto corresponde a una dosis promedio de 1,5 mg de la vacuna contra el cáncer (intervalo de 0,9 a 2,1 mg) por paciente.
- 10 La fuerza promedio (IE) de la respuesta inmunitaria máxima en este grupo de pacientes fue 20,2 (intervalo de 3,9 a 56,3).

Tabla 9B: Datos de pacientes en el ensayo clínico de melanoma

<b>Melanoma e IPI</b>			
<b>N.º de paciente</b>	<b>N.º de inyecciones</b>	<b>Cantidad de péptido (mg)</b>	<b>RI máxima</b>
1	7	2,1	3,9
2	5	1,5	56,3
3	7	2,1	5,5
4	7	2,1	15,2
5	5	1,5	10,9
6	5	1,5	7,8
7	5	1,5	25,9
8	3	0,9	41,3
9	3	0,9	7,8
11	3	0,9	27,2
<b>Promedio</b>	<b>5,0</b>	<b>1,5</b>	<b>20,2</b>
RI: respuesta inmunitaria			

## 15 Discusión

- Los datos presentados en las tablas 9A y 9B demuestran claramente un efecto sinérgico cuando la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 se combina con el agente bloqueante CTLA-4 ipilimumab en el tratamiento del cáncer. Esto se manifiesta tanto por una reducción significativa del tiempo necesario por el sistema
- 20 inmunitario del paciente para generar una respuesta inmunitaria medible a la vacuna (resumida en la tabla 9C) como por la fuerza posterior de la respuesta inmunitaria. En pacientes con una masa tumoral en crecimiento, el tiempo es crítico y una respuesta inmunitaria temprana será esencial para controlar el tumor. Por tanto, la diferencia de tiempo entre 5 inyecciones (15 días) y 7,6 (8) inyecciones (36 días) es muy relevante. Otro parámetro de éxito importante es la fuerza de la respuesta inmunitaria. Es más probable que una respuesta inmunitaria fuerte tenga un impacto clínico
- 25 que una respuesta débil, por lo tanto, el IE máximo medio de 20,2 observado en el ensayo combinado se compara favorablemente con el IE máximo medio de 15,5 observado cuando la vacuna contra el cáncer se administró sola.

Tabla 9C: Sumario de datos del paciente en los ensayos clínicos de pulmón, próstata y melanoma

Tratamiento	Indicación	Número de inyecciones hasta la primera respuesta inmunitaria positiva (IE $\geq 3$ )	Cantidad de vacuna contra el cáncer (mg) inyectada hasta la primera respuesta inmunitaria positiva	Respuesta inmunitaria máxima (IE)
Vacuna contra el cáncer	próstata + pulmón	7,6	2,3	15,5
Vacuna contra el cáncer + ipi	melanoma	5	1,5	20,2

En conclusión, los datos del análisis del papel del bloqueo de CTLA-4 en combinación con una vacuna basada en péptidos largos (es decir, que comprende polipéptidos que tienen la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3) proporcionan por primera vez un ejemplo de un efecto sinérgico cuando el bloqueo de CTLA-4 se combina con una respuesta de linfocitos T inducida por una vacuna peptídica en pacientes con cáncer. Este efecto sinérgico comprendió una reducción en el tiempo que tardan los pacientes en generar una respuesta inmunitaria positiva a un péptido de la vacuna; una respuesta inmunitaria más fuerte; y una respuesta clínica mejorada (es decir, como se muestra en el ejemplo 7). En general, estos datos proporcionan una sólida justificación para un nuevo tipo de tratamiento con inhibidores del punto de control y vacunas contra el cáncer que se espera cambie aún más el cuadro clínico del tratamiento del cáncer.

Ejemplo 11: Inducción de una amplia respuesta inmunitaria en muestras de pacientes con melanoma que recibieron una vacuna contra el cáncer en combinación con ipilimumab.

La vacuna terapéutica contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 se ha investigado en dos ensayos clínicos de fase 1/2A en pacientes con cáncer de pulmón (número EudraCT: 2012-001852-20) y cáncer de próstata (número EudraCT: 2012-002411-26) respectivamente.

Se ha investigado el tratamiento combinado con el anticuerpo anti-CTLA4 ipilimumab y la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 en un ensayo clínico en melanoma (número EudraCT.: 2013-005582-39).

#### *Pauta de tratamiento*

Ensayos en cáncer de pulmón y próstata:

Los estudios fueron estudios de fase I/IIa sin ocultamiento de aumento de dosis de la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 en pacientes con cáncer de próstata metastásico sensible a andrógenos y CPNM después de completar la radioterapia y/o quimioterapia, respectivamente. La vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y GM-CSF se administró en los días 1, 3 y 5, después en las semanas 2, 3, 4, 6, 8 y 10 seguidas de inyecciones mensuales hasta los 6 meses. Hubo tres grupos de dosis diferentes con vacuna de 100, 300 y 700 microgramos, mientras que la dosis de adyuvante fue de 75 microgramos de GM-CSF.

Ensayo de melanoma:

Los pacientes con melanoma maligno metastásico o irresecable recibieron ipilimumab y la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 junto con GM-CSF. Se administró ipilimumab cada 3 semanas hasta un total de 4 dosis de acuerdo con el procedimiento convencional. La vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y GM-CSF se administró antes y entre los tratamientos de ipilimumab y posteriormente cada 4 semanas durante un total de hasta 9 dosis de vacuna. La dosis de la vacuna fue de 300 microgramos, mientras que la dosis del adyuvante fue de 75 microgramos de GM-CSF.

#### *Análisis de la respuesta inmunitaria*

Las respuestas inmunitarias se midieron mediante un ensayo de respuesta de linfocitos T (proliferación por incorporación de 3H-timidina) utilizando muestras de sangre de pacientes recogidas antes, durante y después del tratamiento según lo establecido en materiales y métodos. La respuesta específica de los linfocitos T se consideró positiva si la respuesta peptídica era al menos 3 veces mayor que el fondo (índice de estimulación, IE  $\geq 3$ ). Se midieron las respuestas inmunitarias para cada péptido individual de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

#### *Resultados*

La fracción de pacientes con una respuesta inmunitaria positiva para todos los péptidos individuales de SEQ ID NO: 1, 2 o 3 después de la vacunación se presenta en la tabla 10 a continuación.

Tabla 10

Estudio clínico	Fracción de pacientes que responden a los tres péptidos de la vacuna
Cáncer de pulmón	4/18 (22 %)
Cáncer de próstata	3/21 (14 %)
Melanoma maligno	3/11 (27 %)

### Discusión

- 5 Como se analiza en el ejemplo 9, el 91 % de los pacientes con melanoma que recibieron el tratamiento combinado de la vacuna contra el cáncer e ipilimumab desarrollaron una respuesta inmunitaria contra uno de los polipéptidos de la vacuna. El presente ejemplo demuestra además que una amplia respuesta inmunitaria se desarrolló en pacientes con melanoma que recibieron el tratamiento combinado de la vacuna contra el cáncer e ipilimumab. Esto se manifiesta por una fracción mayor de pacientes que desarrollan una respuesta inmunitaria contra los tres péptidos de vacunación de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 cuando la vacunación se combinó con el agente bloqueador de CTLA4 ipilimumab en comparación con cuando se administró solo la vacuna (es decir, en pacientes con cáncer de próstata y pulmón). Por lo tanto, los datos presentados en la tabla 10 demuestran además un efecto sinérgico cuando la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 se combina con el agente bloqueante CTLA-4 ipilimumab en el tratamiento del cáncer. Se sabe que una respuesta inmunitaria amplia se asocia con un resultado clínico favorable (Kenter *et al.* N. Engl. J. Med. 5 de noviembre de 2009;361(19):1838-47).

En conclusión, los datos del ejemplo 11 proporcionan evidencia adicional de un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer, en forma de inducción de una amplia respuesta inmunitaria, cuando la vacuna contra el cáncer que comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 se combina con el agente bloqueante CTLA-4 ipilimumab.

- 20 En general, los datos de los ejemplos antes mencionados demuestran que la combinación de una vacuna contra el cáncer de péptidos largos contra un autoantígeno con un anticuerpo anti-CTLA-4 da como resultado las siguientes ventajas en comparación con la administración de la vacuna sola: aumenta el número de pacientes que responden a la vacuna (91 % de los pacientes evaluables); las respuestas aparecen antes y son más fuertes, lo que requiere menos vacunas; y hay una mayor proporción de pacientes capaces de generar una respuesta inmunitaria contra los 3 componentes de la vacuna (es decir, una respuesta inmunitaria amplia). Esta amplificación de la respuesta a la vacuna da como resultado un mayor beneficio clínico cuando se administra la combinación en comparación con cuando se administra ipilimumab solo.

- 30 Anexo de listado de secuencias

SEQ ID NO en el listado de secuencias	Secuencia	Notas
1	ALFSLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHR	Corresponde a las posiciones de aminoácidos 660 a 689 en la proteína hTERT
2	RTFVLVRVRAQDPPE	Corresponde a las posiciones de aminoácidos 691 a 705 en la proteína hTERT
3	AERLTSRVKALFSVL	Corresponde a las posiciones de aminoácidos 651 a 665 en la proteína hTERT
4	RLTSRVKALFSVLNY	Corresponde a las posiciones de aminoácidos 653 a 667 en la proteína hTERT
5	EARPALLTSRLRFIPK	Corresponde al péptido GV1001
6	MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQGGPAAFRALVAQCCLVCVPW DARPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALDGGGPPPEAFTTSVR SYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHL LARCALFVLVAPSCAYQVCGPPPLYQLGA ATQARPPPHASGPPRRRLGCERAMNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGASRSLLPLKPRRR	Secuencia de aminoácidos de hTERT

(continuación)

SEQ ID NO en el listado de secuencias	Secuencia	Notas
	<p>GAAPERTPVGGGSAHPGRTGSPDRGFCVSPARPAEEATSLGALSGTRHSHPSVG</p> <p>RQHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVVAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRL</p> <p>VETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVT</p> <p>PAAGVCAREKPGGSVAAPEEEDTPRRLVQLLRQHSSPWQVYGVFVRACLRRLVPPGLWGS</p> <p>RHNERFLRNTKKFISLGHAKLSLQELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEI</p> <p>LAKFLHNLMSVYVWELLRSFFVVTETTFQKNRLFFYRKSWSKLQSIGIRQHLKRVQLRE</p> <p>LSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPINMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKA</p> <p>LFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAMRTFVLRVRAQDPPPELVFVKVDVTGAYDTI</p> <p>PQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHL</p> <p>QETSPLRDAVWIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPOGSIILSTL</p> <p>LCSLCYGDMENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNL</p> <p>RKTVVNFPEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTF</p> <p>NRGFKAGRNMRRKLFGLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLP</p> <p>FHQQVMKNPTFFLRVISDTASLCYSIILKAKNAGNSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLL</p> <p>KLTRHRTVYVPLLGSLRTAQQLSRKLPGTTLTAAEAANPALPSDFKTILD</p> <p>ALFSVLNYERARRP</p>	
7		<p>Fragmento de la SEQ ID</p> <p>NO: 1 - Corresponde a las</p> <p>posiciones de aminoácidos</p> <p>660 a 673 en la proteína</p> <p>hTERT</p>

(continuación)

SEQ ID NO en el listado de secuencias	Secuencia	Notas
8	LFSVLNYERARRPG	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 661 a 674 en la proteína hTERT
9	FSVLNYERARRPGL	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 662 a 675 en la proteína hTERT
10	SVLNYERARRPGLL	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 663 a 676 en la proteína hTERT
11	VLNYERARRPGLLG	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 664 a 677 en la proteína hTERT
12	LNYERARRPGLLGA	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 665 a 678 en la proteína hTERT
13	NYERARRPGLLGAS	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 666 a 679 en la proteína hTERT
14	YERARRPGLLGASV	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 667 a 680 en la proteína hTERT
15	ERARRPGLLGASVL	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 668 a 681 en la proteína hTERT

(continuación)

SEQ ID NO en el listado de secuencias	Secuencia	Notas
16	RARRPGLLGASVLG	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 669 a 682 en la proteína hTERT
17	ARRPGLLGASVLGL	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 670 a 683 en la proteína hTERT
18	RRPGLLGASVLGLD	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 671 a 684 en la proteína hTERT
19	RPGLLGASVLGLDD	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 672 a 685 en la proteína hTERT
20	PGLLGASVLGLDDI	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 673 a 686 en la proteína hTERT
21	GLLGASVLGLDDIH	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 674 a 687 en la proteína hTERT
22	LLGASVLGLDDIHR	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 675 a 688 en la proteína hTERT
23	LGASVLGLDDIHRA	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 676 a 689 en la proteína hTERT

(continuación)

SEQ ID NO en el listado de secuencias	Secuencia	Notas
24	SVLNVERARRPGLLG	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 663 a 677 en la proteína hTERT
25	FSVLNVERARRPGLL	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 662 a 676 en la proteína hTERT
26	ARRPGLLGASVLGLD	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 670 a 684 en la proteína hTERT
27	RARRPGLLGASVLGL	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 669 a 683 en la proteína hTERT
28	VLNVERARRPGLLGA	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 664 a 678 en la proteína hTERT
29	RPGLLGASVLGLDDI	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 671 a 685 en la proteína hTERT
30	VLNVERARRPGLLGA	Fragmento de la SEQ ID NO: 1 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 664 a 678 en la proteína hTERT
31	RTFVLRVRAQDP	Fragmento de la SEQ ID NO: 2 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 691 a 702 en la proteína hTERT



(continuación)

SEQ ID NO en el listado de secuencias	Secuencia	Notas
32	TFVLRVRAQDPPP	Fragmento de la SEQ ID NO: 2 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 692 a 703 en la proteína hTERT
33	FVLRVRAQDPPP	Fragmento de la SEQ ID NO: 2 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 693 a 704 en la proteína hTERT
34	VLRVRAQDPPPE	Fragmento de la SEQ ID NO: 2 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 694 a 705 en la proteína hTERT
35	AERLTSRVKALF	Fragmento de la SEQ ID NO: 3 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 651 a 662 en la proteína hTERT
36	ERLTSRVKALFS	Fragmento de la SEQ ID NO: 3 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 652 a 663 en la proteína hTERT
37	RLTSRVKALFSV	Fragmento de la SEQ ID NO: 3 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 653 a 664 en la proteína hTERT
38	LTSRVKALFSVL	Fragmento de la SEQ ID NO: 3 - Corresponde a las posiciones de aminoácidos 654 a 665 en la proteína hTERT

## REIVINDICACIONES

1. Una mezcla de polipéptidos para usar en medicina en donde la mezcla de polipéptidos se administra a un paciente de manera simultánea, por separado o de manera secuencial con un inhibidor del punto de control inmunitario,

en donde la mezcla de polipéptidos comprende:

- i) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico;
- ii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico; y
- iii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico,

en donde cada polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud, y

en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:

- un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo;
- un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y/o
- un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

2. La mezcla de polipéptidos para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la mezcla de polipéptidos y el inhibidor del punto de control inmunitario se administran con una diferencia de 4 meses entre sí.

3. Un inhibidor del punto de control inmunitario para usar en medicina en donde el inhibidor del punto de control inmunitario se administra a un paciente de manera simultánea, por separado o de manera secuencial con una mezcla de polipéptidos,

en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:

- un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo;
- un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y/o
- un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y

en donde la mezcla de polipéptidos comprende:

- i) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico;
- ii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico; y
- iii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico,

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

4. El inhibidor del punto de control inmunitario para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el inhibidor del punto de control inmunitario y la mezcla de polipéptidos se administran con una diferencia de 4 meses entre sí.

5. La mezcla de polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o el inhibidor del punto de control inmunitario de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, para usar en el tratamiento o vacunación contra el cáncer.

6. Una composición, combinación o kit adecuado para el tratamiento o vacunación contra el cáncer, que comprende:

a) una mezcla de polipéptidos que comprende:

- i) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico;
- ii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia

con el polipéptido o el fragmento inmunogénico; y

iii) un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 3 o un fragmento inmunogénico del mismo que comprende al menos 12 aminoácidos o una secuencia que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o el fragmento inmunogénico,

5 en donde cada polipéptido tiene menos de 100 aminoácidos de longitud; y  
b) un inhibidor del punto de control inmunitario, en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:

10 un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo;  
un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y/o  
un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

15 7. La mezcla de polipéptidos para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5, el inhibidor del punto de control inmunitario para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o la composición, combinación o kit de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

20 8. La mezcla de polipéptidos para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 7, el inhibidor del punto de control inmunitario para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o 7, o la composición, combinación o kit de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab o tremelimumab.

25 9. La mezcla de polipéptidos para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5, el inhibidor del punto de control inmunitario para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o la composición, combinación o kit de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

30 10. La mezcla de polipéptidos para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 9, el inhibidor del punto de control inmunitario para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o 9, o la composición, combinación o kit de acuerdo con la reivindicación 6 o 9, en donde el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab o pembrolizumab.

35 11. La mezcla de polipéptidos para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5, el inhibidor del punto de control inmunitario para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o la composición, combinación o kit de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

40 12. La mezcla de polipéptidos para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 u 11, el inhibidor del punto de control inmunitario para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 u 11, o la composición, combinación o kit de acuerdo con la reivindicación 6 u 11, en donde el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab (MPDL3280A), durvalumab (MEDI4736) o BMS-936559 (MDX-1105).

45 13. La mezcla de polipéptidos para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5, el inhibidor del punto de control inmunitario para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o la composición, combinación o kit de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el inhibidor del punto de control inmunitario es un primer y un segundo inhibidor del punto de control inmunitario,

50 en donde el primer inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y  
en donde el segundo inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

55 14. La mezcla de polipéptidos para usar de acuerdo con la reivindicación 13, el inhibidor del punto de control inmunitario para usar de acuerdo con la reivindicación 13, o la composición, combinación o kit de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el primer inhibidor del punto de control inmunitario es ipilimumab y en donde el segundo inhibidor del punto de control inmunitario es nivolumab.

60 15. La mezcla de polipéptidos para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 7 a 14, el inhibidor del punto de control inmunitario para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o 7 a 14, o la composición, combinación o kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en donde al menos un polipéptido está unido a otra sustancia.

65 16. La mezcla de polipéptidos para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 7 a 15 o el inhibidor del punto de control inmunitario para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o 7 a 15, en donde la mezcla de polipéptidos y/o el inhibidor del punto de control inmunitario se administra al paciente de

manera simultánea, por separado o de manera secuencial con un ingrediente terapéutico adicional.

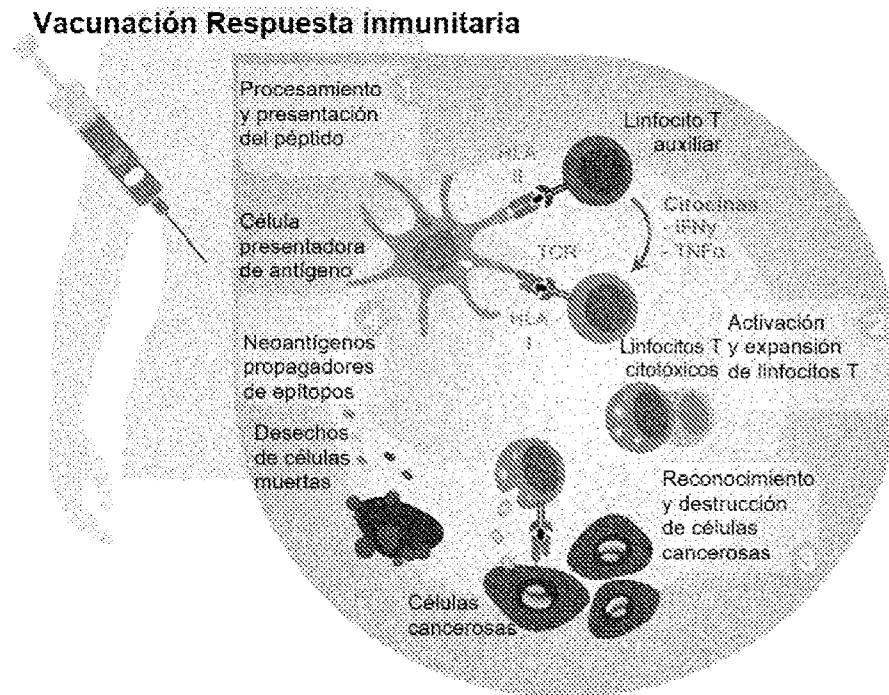


Figura 1

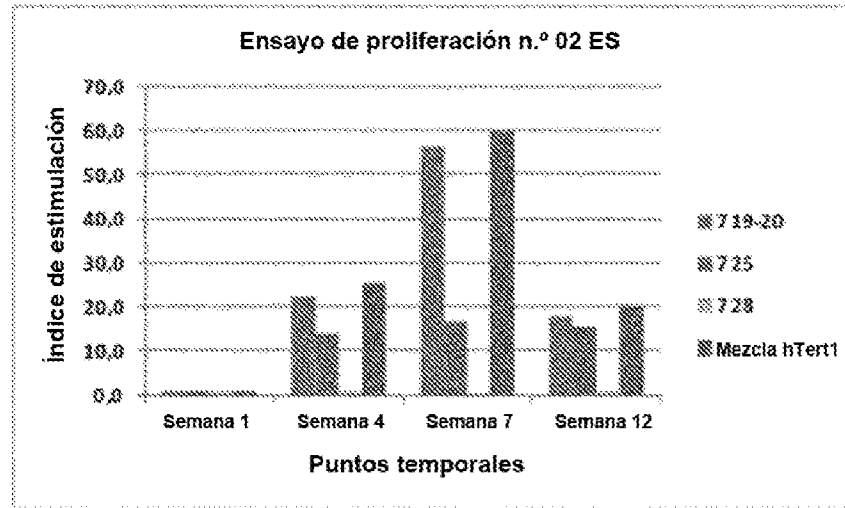


Figura 2A

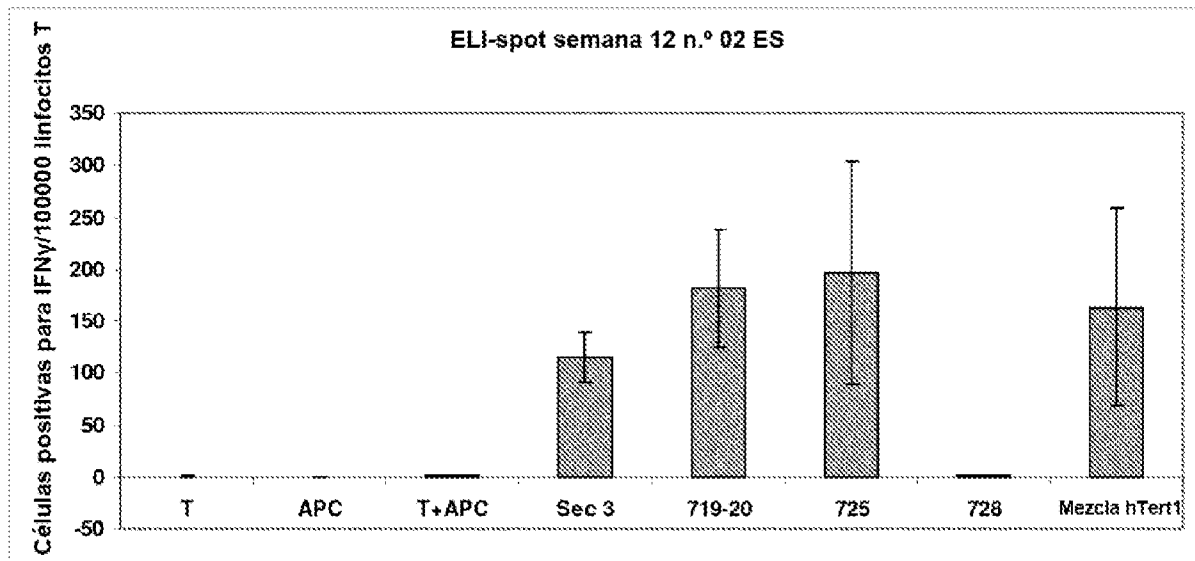


Figura 2B

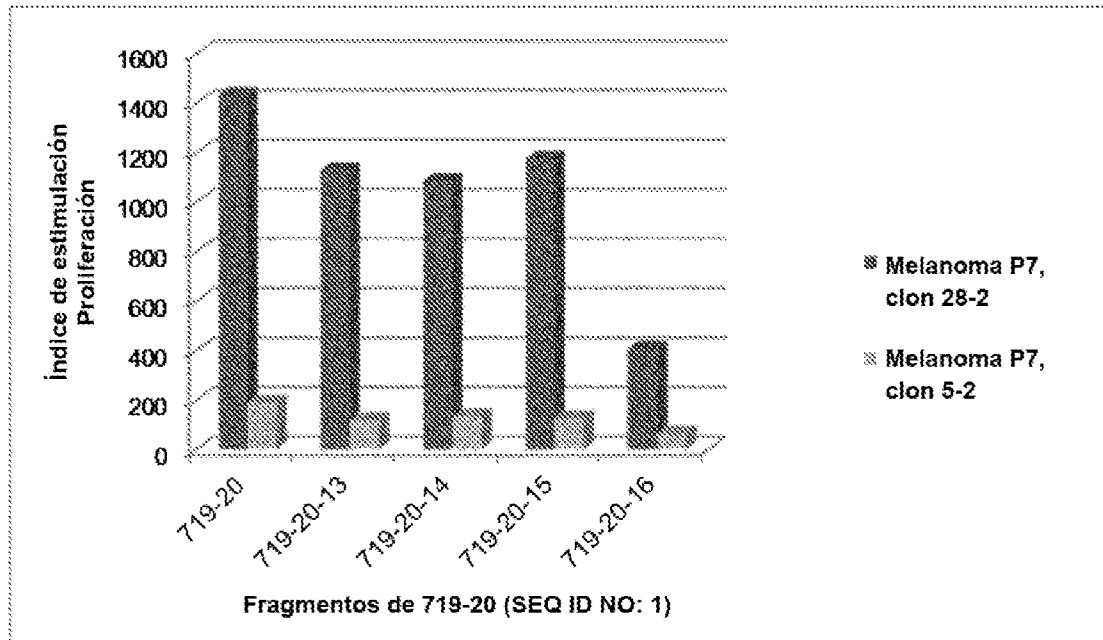


Figura 3A

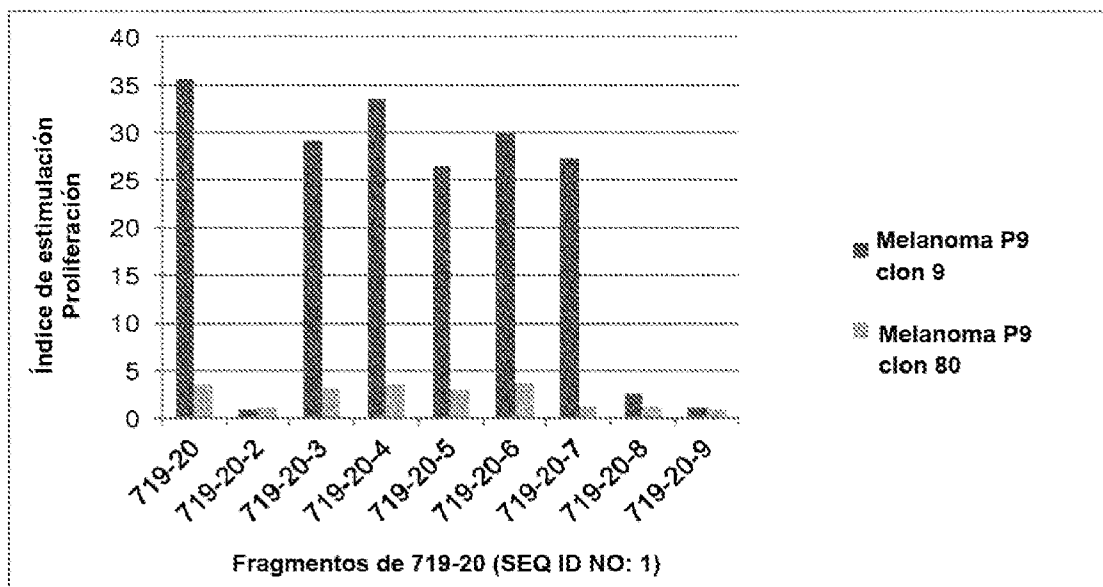


Figura 3B

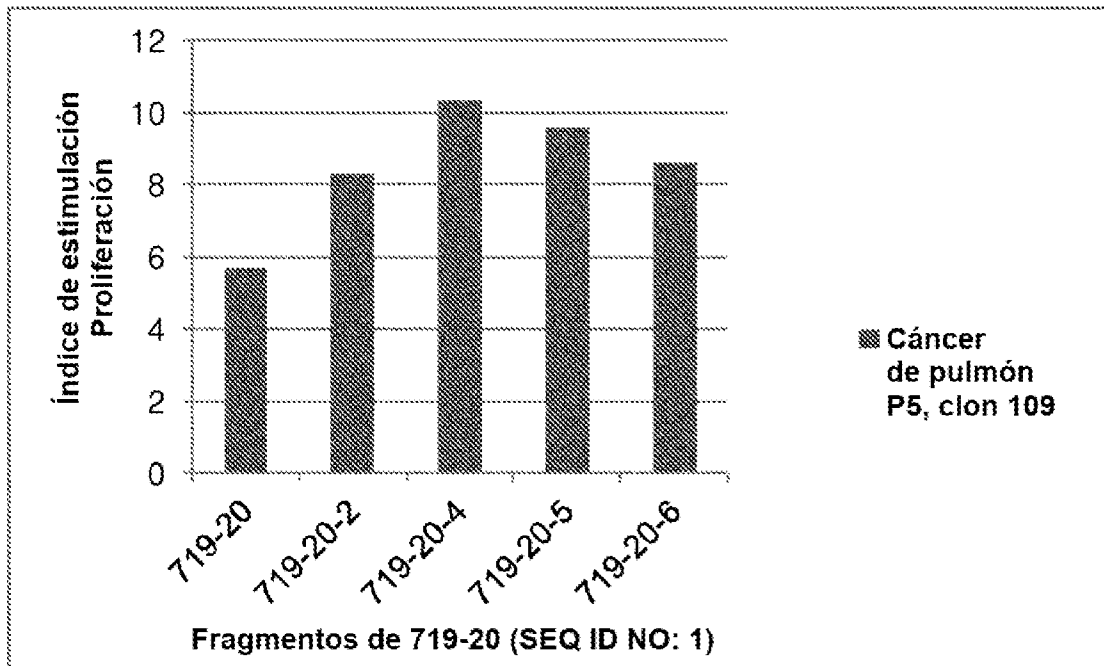


Figura 3C



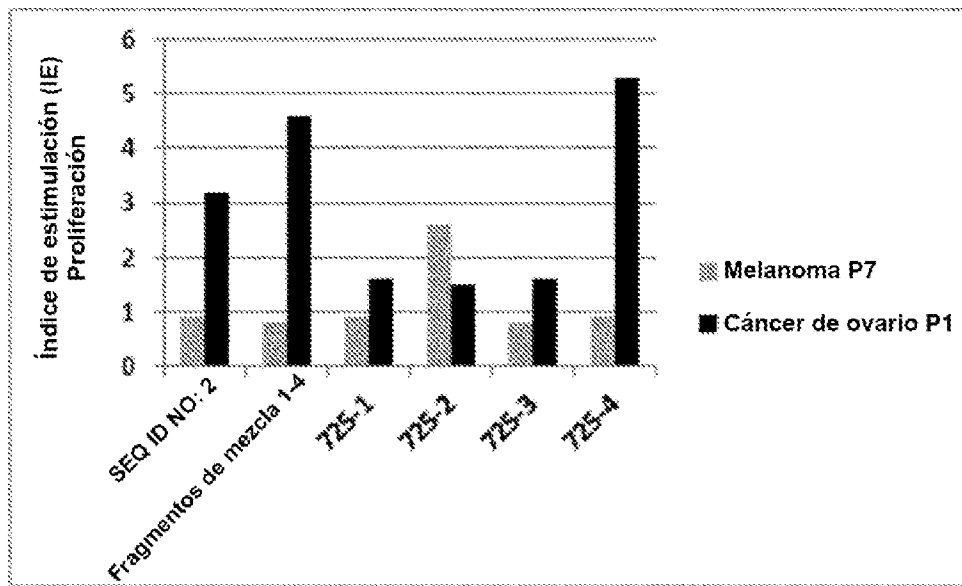


Figura 4

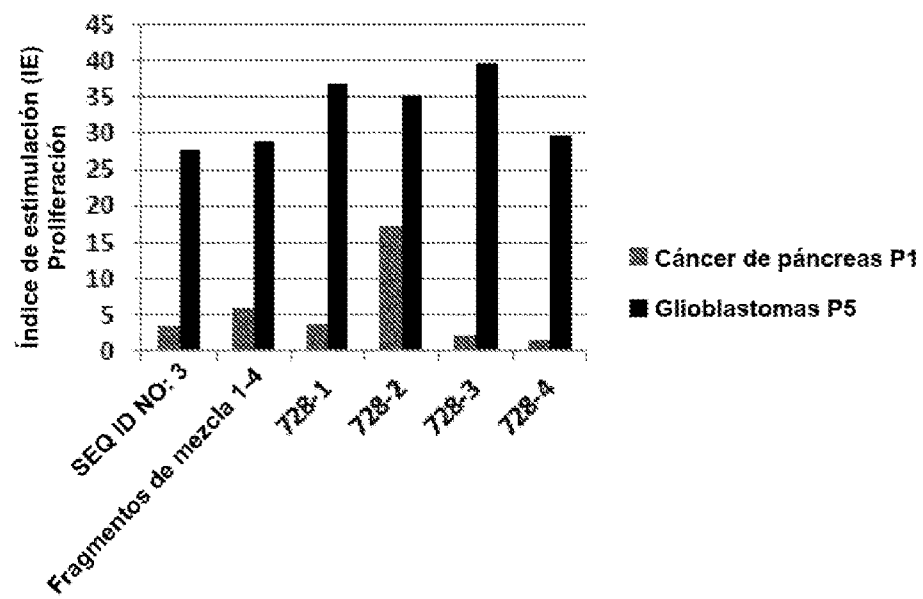


Figura 5

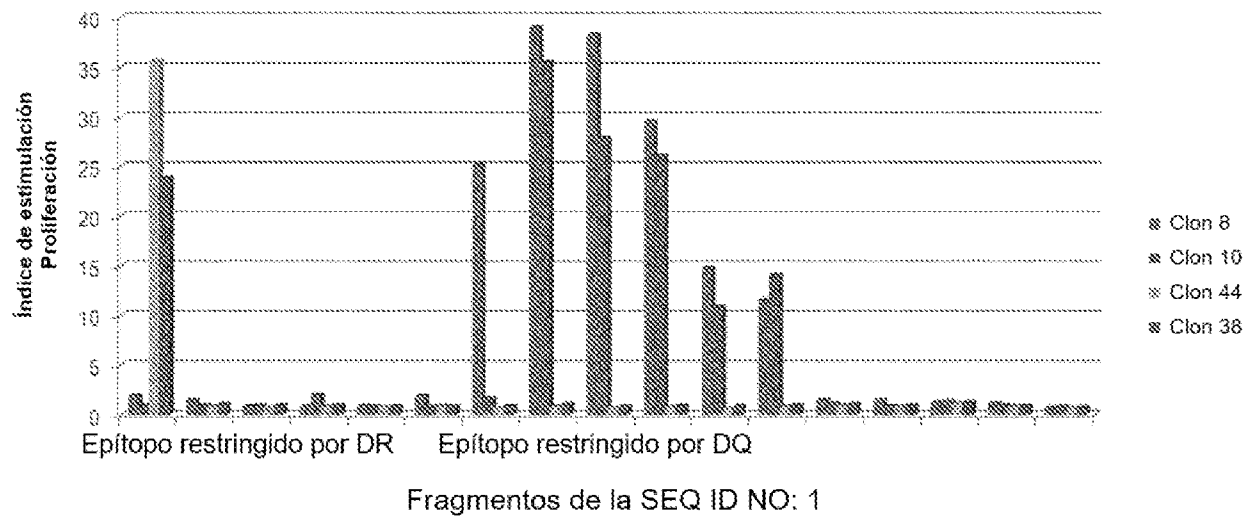


Figura 6

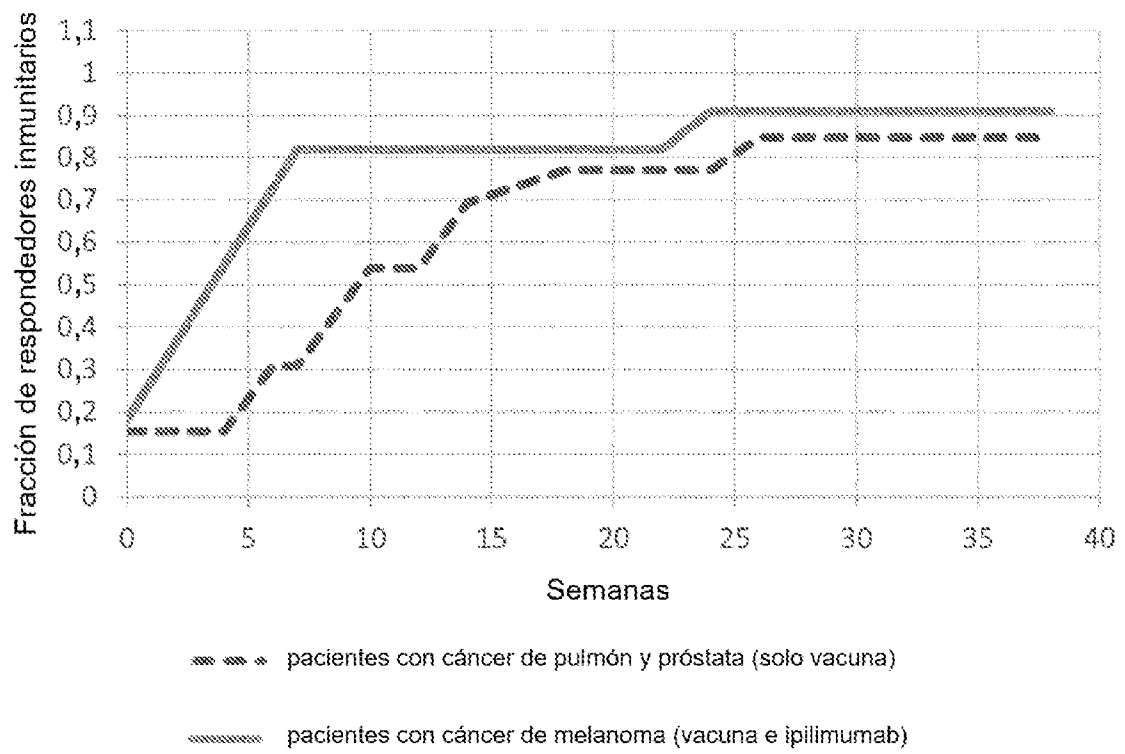


Figura 7