

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 085**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2017** **PCT/EP2017/073954**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2018** **WO18055060**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2017** **E 17780656 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024** **EP 3515476**

54 Título: **Fusión que comprende un péptido de penetración celular, un multiepitopo y un agonista peptídico de TLR para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

21.09.2016 WO PCT/EP2016/072475

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.10.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DEROUAZI, MADIHA y
BELNOUE, ELODIE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 983 085 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

Fusión que comprende un péptido de penetración celular, un multiepitopo y un agonista peptídico de TLR para el tratamiento de cáncer

La presente invención se refiere al campo de la vacunación y a vacunas para la prevención y/o el tratamiento del cáncer colorrectal (CRC).

Cáncer colorrectal (CRC) A nivel mundial, el CRC es una enfermedad común y letal y el tercer cáncer más comúnmente diagnosticado, tercero en hombres y segundo en mujeres, con más de 1,36 millones de casos nuevos y aproximadamente 694.000 muertes produciéndose en 2012. El riesgo de desarrollar CRC está influenciado por factores humanos, ambientales y genéticos (Cancer, I.A.f.R.o. GLOBACAN 2012. 2012 [consultado el 5 de julio de 2015]; Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx). Aunque la incidencia del CRC es más predominante en el hombre que en la mujer, se ve más afectado por la edad y el estilo de vida. De hecho, más del 90 % de los pacientes diagnosticados con CRC tienen 50 años o más (Prevention, C.f.D.C.a. What Are the Risk Factors for Colorectal Cancer?2015 [consultado el 5 de julio de 2015]) mientras que 2/3 de los casos se produjeron en países desarrollados. Existe evidencia de que el consumo de carne en general y más específicamente de carnes rojas o el consumo de bebidas alcohólicas que están conduciendo a la obesidad generalizada, están aumentando significativamente los riesgos de CRC (Stewart, B. y C. Wild, World Cancer Report 2014, B. Stewart y C. Wild, Editores. 2014, International Agency for Research on Cancer: Ginebra). Otros dos factores influyen significativamente en los riesgos de desarrollar cáncer colorrectal: enfermedad hereditaria e inflamatoria intestinal. La poliposis adenomatosa familiar (FAP), por ejemplo, está aumentando significativamente los riesgos de CRC en personas menores de 50 años (Burt, R.W., J.A. DiSario y L. Cannon-Albright, Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. Annu Rev Med, 1995. 46: p. 371-9). FAP, como MAP (poliposis asociada a MUTYH) (Sieber, O.M., *et al.*, Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. N Engl J Med, 2003. 348(9): p. 791-9) o síndrome de Lynch (Lynch, H.T., *et al.*, Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. Gastroenterology, 1993. 104(5): p 1535-49), se asocian a mutaciones genéticas que predisponen a los pacientes a heredar múltiples adenomas de colon (Dennis J Ahnen, D.M., FA. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. 2015 [consultado el 9 de julio de 2015]; Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors>). La influencia de enfermedades como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn en el desarrollo de un CRC está bien documentada. El impacto de la colitis ulcerosa está relacionado, por ejemplo, con un aumento del riesgo de 3 a 15 veces (Ekbom, A., *et al.*, Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. N Engl J Med, 1990. 323(18): p. 1228-33). Aunque hay menos datos sobre la enfermedad de Crohn, hay riesgos relativos similares asociados a esta enfermedad. Para pacientes con antecedentes familiares en términos de CRC, poliposis adenomatosa o enfermedad inflamatoria intestinal, se recomienda encarecidamente la detección temprana (Jemal, A., *et al.*, Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 2011. 61(2): p. 69-90).

Como en muchos cánceres, el tiempo de supervivencia del paciente con CRC depende del estadio de desarrollo de la enfermedad. Los pacientes con estadios tempranos (Estadio 0, I y II) tienen buen pronóstico (más del 75 %). Los estadios III tienen una tasa de supervivencia más heterogénea (del 90 % al 50 %) dependiendo de la invasión del tumor en los tejidos periféricos. Finalmente, solo el estadio IV muestra un efecto rápido y significativo en el tiempo de supervivencia del paciente: Solo aproximadamente el 10 % de los pacientes sobreviven más de 60 meses después del diagnóstico.

Los tratamientos existentes se basan generalmente en una cirugía seguida o no de una quimioterapia bien establecida, radioterapia y/o terapia dirigida (Moertel, C.G., Chemotherapy for colorectal cancer. N Engl J Med, 1994. 330(16): p. 1136-42; Meyerhardt, J.A. y R.J. Mayer, Systemic therapy for colorectal cancer. N Engl J Med, 2005. 352(5): p. 476-87). Dependiendo del estadio de progresión de la enfermedad, los tratamientos existentes permiten una tasa de supervivencia del 30 % al 95 % dos años después del diagnóstico. Todas las estrategias de tratamiento del CRC en fase temprana se inician con cirugía, combinada o no con régimen adicional. La decisión sobre el régimen terapéutico de seguimiento depende de la fase de progresión de la enfermedad identificada durante los resultados preliminares del cribado.

Para CRC avanzado, generalmente se recomienda el uso de quimioterapia o terapia dirigida como tratamiento de primera línea. Los regímenes más comúnmente usados son FOLFOX, CapeOX o FOLFIRI. Estos tratamientos pueden usarse en combinación con uno de los siguientes fármacos biológicos recomendados al VEGF (Genentech bevacizumab/Avastin® o Regeneron-Sanofi aflibercept/Zaltrap®) o EGFR (Merck-Serono cetuximab/Erbix®). Podrían proponerse otras terapias dirigidas como tratamiento independiente de primera línea. El anticuerpo monoclonal EGFR de Amgen (panitumumab/Vectibix®) y, más recientemente, el inhibidor de la quinasa de molécula pequeña Regorafenib de Bayer (Stivarga®) han demostrado su capacidad para aumentar el tiempo de supervivencia general de los pacientes con CRC. Si la enfermedad ya se ha extendido de manera importante a otros órganos, puede usarse el anticuerpo monoclonal VEGF Ramucirumab (Cyramza®) de Eli Lilly. Para el estadio IV, puede usarse radiación para aliviar síntomas tales como el dolor.

Aunque la quimioterapia del CRC está bien establecida (Moertel, C.G., Chemotherapy for colorectal cancer. N Engl J

Med, 1994. 330(16): p. 1136-42) el impulso hacia estrategias más eficaces y menos sujetas a efectos secundarios evolucionó de manera importante en las últimas décadas, concretamente para el CRC en estadio IV (Gallagher, D.J. y N. Kemeny, Metastatic colorectal cancer: from improved survival to potential cure. *Oncology*, 2010. 78(3-4): p. 237-48). Los primeros ensayos se dirigieron a la terapia adyuvante complementaria. Sin embargo, después de muchos años, el valor de la terapia posoperatoria basada en 5-FU sigue siendo controvertido, en particular para pacientes con CRC en estadio II (Meyerhardt, J.A. y R.J. Mayer, Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2005. 352(5): p. 476-87).

En ese contexto, las inmunoterapias se han evaluado cuidadosamente. El sistema inmunitario puede reconocer y hasta cierto punto eliminar las células tumorales, sin embargo, esta respuesta antitumoral suele ser de baja amplitud e ineficiente. Impulsar esta débil respuesta antitumoral con vacunación terapéutica ha sido un objetivo buscado desde hace mucho tiempo en la terapia contra el cáncer. Por lo tanto, modular el sistema inmunitario para mejorar las respuestas inmunitarias se ha convertido en un enfoque terapéutico prometedor en oncología, ya que puede combinarse con tratamientos convencionales.

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

Globalmente, las vacunas contra el cáncer han demostrado hasta ahora una eficacia clínica muy limitada. De hecho, a finales de 2011, entre los 300 ensayos clínicos de vacunas contra el cáncer en curso, solo se informaron 19 ensayos de fase III (*globaldata*, 2012). Entre ellos, están NeuVax, una vacuna peptídica para el cáncer de mama, Stimuvax, una vacuna basada en liposomas para el carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) y el cáncer de mama, TG4010, una vacuna basada en vaccinia para NSCLC y GSK1572932A, un liposoma adyuvantado para NSCLC. Estas cuatro vacunas contra el cáncer se basan en tecnologías diferentes y tienen en común que se dirigen a un único antígeno.

Las vacunas terapéuticas contra el cáncer pueden dividirse en dos categorías principales: vacunas personalizadas (autólogas) y estandarizadas, y además clasificadas dependiendo de la plataforma tecnológica. Las vacunas personalizadas actuales incluyen vacunas de lisados tumorales así como vacunas basadas en células dendríticas (en lo sucesivo en el presente documento basadas en células). Para las últimas, la carga de antígeno puede producirse con un pulso usando lisados tumorales o bien con transfección con ARN extraído de los tumores. En este caso, los antígenos son específicos del tumor o asociados, pero no claramente definidos. Las células dendríticas también pueden cargarse con antígenos definidos, ya sea con pulso peptídico o usando una proteína como la fosfatasa ácida prostática (PAP) usada para diseñar la vacuna Provenge®. Sin embargo, el proceso de fabricación de estas terapias basadas en células requiere mucho tiempo y trabajo, mientras que los criterios de calidad son difíciles de alcanzar y mantener. La inmunomonitorización crea más complicaciones. Por otra parte, la mayoría de las vacunas autólogas contra el cáncer no permiten controlar las identidades o las cantidades de los antígenos usados, a diferencia de las vacunas definidas y estandarizadas.

A diferencia de la terapia basada en células (APC, linfocitos T, CAR, lisados), las vacunas de subunidades (proteínas o péptidos) permiten el desarrollo de una vacuna estandarizada con una producción más fácil y una reproducibilidad lote a lote significativamente mejor que puede administrarse a una amplia gama de pacientes. Adicionalmente, los antígenos están completamente definidos, lo que permite una mejor inmunomonitorización y reduce el riesgo de efectos no deseados del componente de la vacuna.

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

Para las vacunas basadas en proteínas, los resultados de dirigirse a MAGE-A3 con una vacuna basada en proteína de fusión recombinante se han esperado con entusiasmo después de datos prometedores de fase II en melanoma metastásico (Kruit WH, Suci S, Dreno B, Mortier L, Robert C, Chiarion-Sileni V, *et al.* Selection of immunostimulant AS15 for active immunization with MAGE-A3 protein: results of a randomized phase II study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group in Metastatic Melanoma. *Journal of clinical oncology: revista oficial de la American Society of Clinical Oncology* 2013;31 (19):2413-20) y de cáncer de pulmón no microcítico (NSLC)(Vansteenkiste J, Zielinski M, Linder A, Dahabreh J, Gonzalez EE, Malinowski W, *et al.* Adjuvant MAGE-A3 immunotherapy in resected non-small-cell lung cancer: phase II randomized study results. *Journal of clinical oncology: revista oficial de la American Society of Clinical Oncology* 2013;31(19):2396-403). Sin embargo, en 2013 el ensayo de fase III DERMA en melanoma (NCT00796445) no cumplió su primer criterio de valoración coprincipal,

seguido en 2014 con una parada del estudio MAGRIT de fase III en NSCL (NCT00480025). A pesar de estos resultados clínicos tan decepcionantes, es innegable que las vacunas basadas en proteínas presentan muchas ventajas.

También en el contexto del cáncer colorrectal, los avances científicos en inmunología tumoral condujeron a una mejor comprensión de la respuesta inmunitaria antitumoral a través de vías celulares y humorales (Smith, C.L., et al.; Immunotherapy of colorectal cancer. *Br Med Bull*, 2002. 64: p. 181-2001; Koido, S., et al., Immunotherapy for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2013. 19(46): p. 8531-42) y ayudaron a identificar mejor los antígenos tumorales. Este progreso abrió nuevas perspectivas para las inmunoterapias en el CRC. Las inmunoterapias pasivas tales como los anticuerpos demostraron ser las primeras terapias dirigidas para el tratamiento del CRC. Gracias a su capacidad de poder interactuar con la vía de crecimiento tumoral a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o inhibir el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), anticuerpos tales como cetuximab, panitumumab y bevacizumab recibieron la aprobación de la FDA para el tratamiento del CRC respectivamente en 2004, 2006 y 2009.

Desafortunadamente, los ensayos clínicos de terapia de transferencia celular adoptiva (ACT) para el CRC han arrojado malos resultados hasta ahora. De hecho, la limitada población de pacientes para tratamientos con células T modificadas y no modificadas parece ser un obstáculo importante. De forma similar, el efecto secundario observado en pacientes tratados con células T fusionadas con receptores de antígenos quiméricos (CAR), no logró demostrar que la ACT es un tratamiento seguro y eficiente (Koido, S., et al., Immunotherapy for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2013. 19(46): p. 8531-42; Xiang, B., et al., Colorectal cancer immunotherapy. *Discov Med*, 2013. 15(84): p. 301-8). Por lo tanto, sumado a los inconvenientes habituales de ACT en términos de viabilidad y coste y la memoria de la respuesta inmunitaria, parece bloquear la opción de ACT por el momento.

Más recientemente, los resultados positivos del ensayo clínico de fase III sobre la supervivencia de los pacientes con aflibercept, permitió que esta proteína de fusión anti-VEGF fuera aprobada por la FDA para el cáncer colorrectal metastásico (mCRC) (Clarke, J.M. y H.I. Hurwitz, Ziv-aflibercept: binding to more than VEGF-A—does more matter? *Nat Rev Clin Oncol*, 2013. 10(1): p. 10-1). Esta aprobación de terapia dirigida allana el camino para las inmunoterapias sin anticuerpos. Hasta ahora, no se han aprobado inmunoterapias activas ni inmunomoduladores para el CRC. Estructuralmente, la gran mayoría de las moléculas analizadas para detectar el CRC son moléculas pequeñas, en general inhibidores de quinasa o anticuerpos (respectivamente el 52 % y el 28 %).

En general, se administra una vacuna terapéutica contra el cáncer a pacientes con cáncer para fortalecer la capacidad de su sistema inmunitario para reconocer y destruir las células tumorales. El objetivo principal de una vacuna terapéutica contra el cáncer es generar células T asesinas (también llamadas linfocitos T citotóxicos) específicas para las células tumorales. Para ello y para lograr una potente respuesta inmunitaria, la vacuna debe contener moléculas llamadas antígenos que también están presentes en el tumor y que deben administrarse a las células presentadoras de antígenos (APC), especialmente células dendríticas (DC), para permitir que se inicie la inmunidad contra el cáncer. Las DC procesan estos antígenos tumorales en pequeños péptidos que se presentan sobre la superficie celular y expresan moléculas de MHC de clase I o MHC de clase II a los linfocitos T. Los péptidos que después son reconocidos por los linfocitos T y de ese modo inducen su estimulación se denominan epítomos. La presentación por moléculas de MHC de clase I y MHC de clase II permite la activación de dos clases de linfocitos T, linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) y linfocitos T auxiliares CD4⁺ (T_h), respectivamente. Además, para activarse completamente, además del reconocimiento de antígenos, los linfocitos T requieren una segunda señal, la señal coestimuladora, que no es específica de antígeno y se obtiene mediante la interacción entre moléculas coestimuladoras expresadas en la superficie de las APC y los linfocitos T. Por lo tanto, dos requisitos principales para una vacuna terapéutica contra el cáncer eficaz son la especificidad de los antígenos tumorales y la capacidad de administrarlos de manera eficiente a las DC.

Tomado en conjunto, la inducción de una respuesta inmunitaria específica del tumor requiere por lo tanto tres etapas principales: (i) debe administrarse un antígeno a las células dendríticas, que lo procesarán en epítomos, (ii) las células dendríticas deben recibir una señal de activación adecuada y (iii) las células dendríticas cargadas de antígeno tumoral activadas deben generar respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T en los órganos linfoides.

Dado que las células tumorales pueden escapar del sistema inmunitario regulando negativamente la expresión de antígenos individuales (escape inmunológico pasivo), la administración de antígenos multiepitópicos proporciona una ventaja. De hecho, las vacunas basadas en proteínas permiten la administración de antígenos multiepitópicos a células presentadoras de antígenos (APC) tales como las células dendríticas (DC) sin la limitación de la restricción a un solo alelo del MHC. Otro punto fuerte es la presentación de epítomos de larga duración descrita recientemente en células dendríticas cargadas con proteínas (van Montfoort N, Camps MG, Khan S, Filippov DV, Weterings JJ, Griffith JM, et al. Antigen storage compartments in mature dendritic cells facilitate prolonged cytotoxic T lymphocyte cross-priming capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106(16):6730-5). Adicionalmente, las proteínas requieren absorción y procesamiento por parte de las DC para lograr una presentación restringida por MHC de sus epítomos constituyentes. Esto reduce el riesgo de inducir tolerancia periférica como se ha demostrado después de la vacunación con péptidos cortos que no tienen requisitos de procesamiento tan estrictos (Toes RE, Offringa R, Blom RJ, Melief CJ, Kast WM. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

1996;93(15):7855-60).

Sin embargo, la mayoría de las proteínas solubles generalmente se degradan en los endolisosomas y tienen una mala presentación cruzada en las moléculas del MHC de clase I y, por lo tanto, son poco inmunogénicas para las respuestas de linfocitos T CD8⁺ (Rosalia RA, Quakkelaar ED, Redeker A, Khan S, Camps M, Drijfhout JW, *et al.* Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *European journal of immunology* 2013;43(10):2554-65). Por otra parte, aunque las DC maduras son más potentes que las DC inmaduras para cebar y provocar respuestas de linfocitos T (Apetoh L, Locher C, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. Harnessing dendritic cells in cancer. *Semin Immunol.* 2011; 23:42-49), pierden la capacidad de captar eficientemente antígenos exógenos, particularmente para antígenos restringidos al MHC de clase II (Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392:245-252). Como resultado, las DC pulsadas con péptidos como vacunas tienen varias limitaciones. Por ejemplo, la degradación de péptidos, el rápido recambio del MHC de clase I y la disociación del péptido de las moléculas del MHC de clase I durante la preparación y la inyección de DC/péptidos pueden dar como resultado semividas cortas de los complejos MHC de clase I/péptido en la superficie de las DC, lo que lleva a respuestas débiles de los linfocitos T.

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

Por otra parte, las vacunas de subunidades (péptidos o proteínas) son poco inmunogénicas. Por lo tanto, en el contexto de la vacuna terapéutica contra el cáncer, es obligatorio añadir un adyuvante potente a la vacuna para aumentar el nivel de moléculas coestimuladoras en las DC y, por lo tanto, aumentar la respuesta del sistema inmunitario a los antígenos diana. Los adyuvantes logran esta tarea imitando componentes microbianos conservados que el sistema inmunitario reconoce naturalmente. Incluyen, lipopolisacárido (LPS), componentes de las paredes celulares bacterianas y ácidos nucleicos tales como ARN bicatenario (ARNbc), ADN monocatenario (ADNbc) y ADN que contiene dinucleótido CpG no metilado. Su presencia junto con la vacuna puede aumentar considerablemente la respuesta inmunitaria innata al antígeno. Adicionalmente, este adyuvante debería promover una respuesta inmunitaria adaptativa con CTL y tipo Th1 polarizado en lugar de una respuesta inmunitaria humoral que resulte en la producción de anticuerpos. Se han evaluado diferentes adyuvantes, y un número limitado ha obtenido la aprobación regulatoria para su uso humano. Estos incluyen Alumbre, MPL (monofosforil lípido A) y ASO₄(Alumbre y MPL) en EE.UU. y MF59 (emulsión de aceite en agua), ASO₄, liposomas en Europa (Lim, Y.T., Vaccine adjuvant materials for cancer immunotherapy and control of infectious disease. *Clin Exp Vaccine Res*, 2015. 4(1): p. 54-8).

Recientemente, los ligandos del Receptor Tipo Toll (TLR) están surgiendo como una clase prometedora de adyuvantes (Baxevasis, C.N., I.F. Voutsas y O.E. Tsitsilonis, Toll-like receptor agonists: current status and future perspective on their utility as adjuvants in improving anticancer vaccination strategies. *Immunotherapy*, 2013. 5(5): p. 497-511). Por lo tanto, un avance significativo en los estudios de vacunas contra el cáncer fue incluir diversos agonistas de TLR en las formulaciones de vacunas, incluyendo TLR-3 (poli I:C), TLR-4 (monofosforil lípido A; MPL), TLR-5 (flagelina), TLR-7 (imiquimod) y TLR-9 (CpG) (Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev.* 2011; 239:178-196). Los tipos de señalización y citocinas producidas por las células inmunitarias después de la estimulación con TLR controlan la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg. La estimulación de células inmunitarias tales como las DC y los linfocitos T mediante la mayoría de los adyuvantes basados en TLR produce citocinas proinflamatorias y promueve las respuestas T Th1 y CD8⁺ (Manicassamy S, Pulendran B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol.* 2009; 21:185-193).

La conjugación de la vacuna con un ligando de TLR es un enfoque atractivo que ofrece varias ventajas sobre las vacunas no conjugadas incluyendo (i) absorción preferencial por parte de las células inmunitarias que expresan el

TLR, (ii) mayor respuesta inmunitaria y (iii) menor riesgo de inducir tolerancia periférica. De hecho, todas las células presentadoras de antígeno cargadas con el antígeno se activarán simultáneamente. Diferentes grupos exploraron este enfoque con varios ligandos de TLR unidos principalmente químicamente a la vacuna peptídica o proteica (Zom GG, Khan S, Filippov DV, Ossendorp F. TLR ligand-peptide conjugate vaccines: toward clinical application. *Adv Immunol.* 2012;114:177-201). Como el enlace químico al péptido se realiza fácilmente, los ligandos de TLR más investigados para la vacuna conjugada son los agonistas de TLR2 Pam2Cys y Pam3Cys (Fujita, Y. y H. Taguchi, Overview and outlook of Toll-like receptor ligand-antigen conjugate vaccines. *Ther Deliv.* 2012. 3(6): p. 749-60).

El documento US 2012/231030 A1 se refiere a polipéptidos aislados que comprenden: (i) un dominio de transducción de proteínas constituido por ZEBRA o un fragmento del mismo que retiene la capacidad de internalización, (ii) al menos un epítipo CD4⁺; y (iii) al menos un epítipo CD8⁺. También se refiere a células presentadoras de antígenos cargadas con dichos polipéptidos y al uso de las mismas en inmunoterapia incluyendo la prevención y/o el tratamiento de cánceres.

Derouazi *et al.*, *Cancer Research*, 75(15), 2015 (pp. 3020-3027) estudian vacunas novedosas basadas en péptidos que penetran las células que inducen inmunidad antitumoral mediada por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ robusta. La proteína recombinante se fusiona con Z12, un péptido novedoso de penetración celular que promueve la carga eficiente de proteínas en la maquinaria de procesamiento de antígenos de las células dendríticas.

El documento EP 2 476 440 A1 se dirige a composiciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades inducidas por el VPH. También se refiere a conjugados inmunogénicos que comprenden una región inmunogénica de la proteína E7 del virus del papiloma humano y la región EDA de fibronectina, así como a composiciones que comprenden dichos conjugados. Además, el documento EP 2 476 440 A1 se dirige a células dendríticas obtenidas mediante estimulación con dichos conjugados y composiciones.

El documento WO 2015/073632 A1 describe composiciones variantes de anexina II, en particular fragmentos polipeptídicos de la anexina II, que pueden acoplarse covalentemente a otros componentes, por ejemplo, antígenos, restos de direccionamiento, restos estabilizantes o segundos adyuvantes. Pueden usarse para inmunoterapia.

Sin embargo, hasta la fecha, la mayoría de los ensayos de vacunas contra el cáncer han demostrado una eficacia limitada. Una explicación es la falta de una terapia que pueda simultáneamente (i) estimular la inmunidad mediada por linfocitos T citotóxicos multiepitópicos, (ii) inducir linfocitos T_h y (iii) promover la memoria inmunológica. Estos tres parámetros son esenciales para generar inmunidad antitumoral potente duradera. De hecho, los CTL específicos para diferentes epítopos permitirán la destrucción de más células cancerosas dentro de una masa tumoral heterogénea y evitarán el crecimiento de variantes con pérdida de antígeno (escape inmune del tumor). Los linfocitos T_h participan en el mantenimiento de la inmunidad celular duradera y la infiltración tumoral por linfocitos T_h también es una etapa esencial para el reclutamiento y la función de los CTL CD8⁺. La memoria inmunológica es fundamental para proteger contra la recaída tumoral.

En vista de lo anterior, es el objeto de la presente invención superar los inconvenientes de las vacunas contra el cáncer actuales descritos anteriormente y proporcionar un complejo novedoso para aplicaciones de inmunoterapia contra el cáncer colorrectal que represente una vacuna más potente, que tenga actividad antitumoral mejorada para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer colorrectal.

Este objeto se logra por medio de la materia objeto expuesta a continuación y en las reivindicaciones adjuntas.

. Debe entenderse que la terminología usada en el presente documento no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se definan de otra manera, todos los términos y expresiones técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende normalmente un experto en la materia.

En lo sucesivo, se describirán los elementos de la presente invención.

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

Debe considerarse que los términos "un", "una", "el", "la" y referencias similares usadas en el contexto de descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) abarcan tanto el singular como el plural, salvo que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. La mención de intervalos de valores en el presente documento solo pretende servir como método abreviado para referirse

individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva ha de interpretarse como una indicación de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

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

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

Complejos de acuerdo con la presente invención

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

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

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

en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2,

en donde el agonista del péptido TLR es un agonista del péptido TLR2 y/o un agonista del péptido TLR4, y

en donde el complejo es un polipéptido o una proteína, en particular un polipéptido recombinante o una proteína recombinante.

Un complejo de este tipo para su uso de acuerdo con la presente invención proporciona (i) estimulación simultánea de la inmunidad mediada por linfocitos T citotóxicos multiepitópicos, (ii) inducción de linfocitos T_H y (iii) promoción de la memoria inmunológica. De esta manera, un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención proporciona una vacuna potente, en particular, que tiene actividad antitumoral mejorada.

El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un polipéptido o una proteína, en particular un polipéptido recombinante o una proteína recombinante, preferentemente una proteína de fusión recombinante o un polipéptido de fusión recombinante. El término "recombinante" como se usa en el presente documento significa que (aquí: el polipéptido o la proteína) no se produce de forma natural. En consecuencia, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, que es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante, normalmente comprende los componentes a) a c), en donde los componentes a) a c) son de diferentes orígenes, es decir, no se producen de forma natural en esta combinación.

En el contexto de la presente invención, es decir, a lo largo de la presente solicitud, los términos "péptido", "polipéptido", "proteína" y las variaciones de estos términos se refieren a péptido, oligopéptido, oligómero o proteína incluyendo proteína de fusión, respectivamente, que comprende al menos dos aminoácidos unidos entre sí preferentemente mediante un enlace peptídico normal o, como alternativa, mediante un enlace peptídico modificado, tal como, por ejemplo, en el caso de péptidos isostéricos. Un péptido, un polipéptido o una proteína pueden estar compuestos por L-aminoácidos y/o D-aminoácidos. Preferentemente, un péptido, un polipéptido o una proteína están compuestos (completamente) por L-aminoácidos o (completamente) por D-aminoácidos, formando de esta manera "secuencias peptídicas retro-inversas". La expresión "secuencias (peptídicas) retro-inversas" se refiere a un isómero de una secuencia peptídica lineal en que se invierte la dirección de la secuencia y se invierte la quiralidad de cada resto de aminoácido (véanse, por ejemplo, Jameson *et al.*, Nature, 368, 744-746 (1994); Brady *et al.*, Nature, 368, 692-693 (1994)). En particular, los términos "péptido", "polipéptido", "proteína" también incluyen "peptidomiméticos" que se definen como análogos peptídicos que contienen elementos estructurales no peptídicos, cuyos péptidos son capaces de imitar o antagonizar la acción o acciones biológicas de un péptido original natural. Un peptidomimético carece de características peptídicas clásicas tales como enlaces peptídicos enzimáticamente escindibles. En particular, un péptido, un polipéptido o una proteína pueden comprender aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos definidos por el código genético además de estos aminoácidos, o pueden estar compuestos por aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos definidos por el código genético. En particular, un péptido, un polipéptido o una proteína en el contexto de la presente invención pueden estar igualmente compuestos por aminoácidos modificados mediante procesos naturales, tales como procesos de maduración postraduccional o mediante procesos químicos, que son bien conocidos por una persona experta en la materia. Estas modificaciones están completamente detalladas en la bibliografía. Estas modificaciones pueden aparecer en cualquier parte del polipéptido: en la cadena principal peptídica, en la cadena de aminoácidos o incluso en los extremos carboxi o amino terminales. En particular, un péptido o un polipéptido puede estar ramificado después de una ubiquitinación o ser cíclico con o sin ramificación. Este tipo de modificación puede ser el resultado de procesos postraduccionales naturales o sintéticos que son bien conocidos por una persona experta en la materia. Los términos "péptido", "polipéptido", "proteína" en el contexto de la presente invención en particular

también incluyen péptidos, polipéptidos y proteínas modificados. Por ejemplo, las modificaciones de péptido, polipéptido o proteína pueden incluir acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, fijación covalente de un nucleótido o de derivado de nucleótido, fijación covalente de un lípido o de un derivado lipídico, la fijación covalente de un fosfatidilinositol, reticulación covalente o no covalente, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, glucosilación incluyendo pegilación, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesos proteolíticos, fosforilación, prenilación, racemización, senellilolación, sulfatación, adición de aminoácidos tales como arginilación o ubiquitinación. Dichas modificaciones se detallan completamente en la bibliografía (Proteins Structure and Molecular Properties (1993) 2ª Ed., T. E. Creighton, Nueva York; Post-translational Covalent Modifications of Proteins (1983) B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York; Seifter *et al.* (1990) Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. 182: 626-646 y Rattan *et al.*, (1992) Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci, 663: 48-62). En consecuencia, los términos "péptido", "polipéptido", "proteína" incluyen preferentemente, por ejemplo, lipopéptidos, lipoproteínas, glucopéptidos, glucoproteínas y similares.

Sin embargo, en una realización particularmente preferida, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un polipéptido o una proteína "clásicos", de tal manera que un polipéptido o una proteína "clásicos" se componen normalmente de aminoácidos seleccionados de los 20 aminoácidos definidos por el código genético, enlazados entre sí por un enlace peptídico normal.

Como el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un polipéptido o una proteína, se prefiere que comprenda al menos 50, al menos 60, al menos 70, preferentemente al menos 80, al menos 90, más preferentemente al menos 100, al menos 110, incluso más preferentemente al menos 120, al menos 130, en particular preferentemente al menos 140 o lo más preferentemente al menos 150 restos de aminoácidos.

Componente a) - Péptido de penetración celular

El CPP permite un suministro eficiente, es decir, transporte y carga, en particular de al menos un antígeno o epítipo antigénico, en las células presentadoras de antígenos (APC), en particular en las células dendríticas (DC) y, por lo tanto, en la maquinaria de procesamiento de antígenos de las células dendríticas.

La expresión "péptidos de penetración celular" ("CPP") se usa generalmente para designar péptidos cortos que son capaces de transportar diferentes tipos de moléculas de carga a través de la membrana plasmática y, por lo tanto, facilitan la absorción celular de diversas cargas moleculares (desde partículas nanométricas hasta pequeñas moléculas químicas y grandes fragmentos de ADN). La "internalización celular" de la molécula de carga unida al péptido de penetración celular significa generalmente el transporte de la molécula de carga a través de la membrana plasmática y, por lo tanto, la entrada de la molécula de carga en la célula. Dependiendo del caso particular, la molécula de carga puede, a continuación, liberarse en el citoplasma, dirigirse a un orgánulo intracelular o presentarse además en la superficie celular. La capacidad de penetración celular, o internalización, del péptido de penetración celular o del complejo que comprende dicho péptido de penetración celular, de acuerdo con la invención puede comprobarse mediante métodos convencionales conocidos por un experto en la materia, incluyendo citometría de flujo o microscopía de fluorescencia de células vivas y fijadas, inmunocitoquímica de células transducidas con dicho péptido o complejo y transferencia Western.

Los péptidos de penetración celular tienen normalmente una composición de aminoácidos que contiene una alta abundancia relativa de aminoácidos cargados positivamente tales como lisina o arginina o tienen una secuencia que contiene un patrón alterno de aminoácidos polares/cargados y aminoácidos hidrófobos no polares. Estos dos tipos de estructuras se denominan policationicas o anfipáticas, respectivamente. Los péptidos que penetran las células son de diferentes tamaños, secuencias de aminoácidos y cargas, pero todos los CPP tienen una característica común que es la capacidad de translocar la membrana plasmática y facilitar el suministro de diversas cargas moleculares al citoplasma o a un orgánulo de una célula. En la actualidad, las teorías de la translocación de CPP distinguen tres mecanismos de entrada principales: penetración directa en la membrana, entrada mediada por endocitosis y translocación mediante la formación de una estructura transitoria. La transducción de CPP es un área de investigación en curso. Los péptidos de penetración celular han encontrado numerosas aplicaciones en medicina como agentes de administración de fármacos en el tratamiento de diferentes enfermedades incluyendo cáncer e inhibidores de virus, así como agentes de contraste para el marcaje celular y la formación de imágenes.

Normalmente, los péptidos de penetración celular (CPP) son péptidos de 8 a 50 restos que tienen la capacidad de cruzar la membrana celular y entrar en la mayoría de los tipos celulares. Como alternativa, también se les llama dominio de transducción de proteínas (PTD), lo que refleja que su origen se encuentra en las proteínas naturales. Frankel y Pabo, al mismo tiempo que Green y Lowenstein, describieron la capacidad del activador transcripcional transactivante del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-TAT) de penetrar en las células (Frankel, A.D. y C.O. Pabo, Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. Cell, 1988. 55(6): p. 1189-93). En 1991, se describió la transducción en células neurales del homeodominio Antennapedia (dominio de unión al ADN) de *Drosophila melanogaster* (Joliot, A., *et al.*, Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1991. 88(5): p. 1864-8). En 1994, el primer péptido CPP de 16 unidades monoméricas llamado Penetratina, que tiene la secuencia de aminoácidos RQIKIYFQNRMRKWK (SEQ ID NO: 1) se caracterizó a partir de

la tercera hélice del homeodominio de Antennapedia (Derossi, D., *et al.*, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, 1994. 269(14): p. 10444-50), seguido en 1998 de la identificación del dominio mínimo de TAT, que tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2) requerida para la transducción de proteínas (Vives, E., P. Brodin y B. Lebleu, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 1997. 272(25): p. 16010-7). Durante las últimas dos décadas, se describieron decenas de péptidos de diferentes orígenes incluyendo proteínas víricas, por ejemplo, VP22 (Elliott, G. y P. O'Hare, Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 1997. 88(2): p. 223-33) y ZEBRA (Rothe, R., *et al.*, Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. *J Biol Chem*, 2010. 285(26): p. 20224-33), o de venenos, por ejemplo, melitina (Dempsey, C.E., The actions of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1990. 1031(2): p. 143-61), mastoporano (Konno, K., *et al.*, Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum* micado). *Toxicon*, 2000. 38(11): p. 1505-15), maurocalcina (Esteve, E., *et al.*, Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. *J Biol Chem*, 2005. 280(13): p. 12833-9), crotamina (Nascimento, F.D., *et al.*, Crotonamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, 2007. 282(29): p. 21349-60) o buforina (Kobayashi, S., *et al.*, Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. *Biochemistry*, 2004. 43(49): p. 15610-6). También se diseñaron CPP sintéticos incluyendo la poliarginina (R8, R9, R10 y R12) (Futaki, S., *et al.*, Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*, 2001. 276(8): p. 5836-40) o transportano (Pooga, M., *et al.*, Cell penetration by transportan. *FASEB J*, 1998. 12(1): p. 67-77). Cualquiera de los CPP anteriormente descritos puede usarse como péptido de penetración celular, es decir, como componente a), en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. En particular, el componente a), es decir, el CPP, en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender el dominio mínimo de TAT, que tiene la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2). En particular, el componente a), es decir, el CPP, en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender penetratina que tiene la secuencia de aminoácidos RQIKIYFQNRMRKWK (SEQ ID NO: 1).

Diversos CPP, que puede usarse como péptido de penetración celular, es decir, como componente a), en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, también se desvelan en la revisión: Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 17 (15-16): 850-60, 2012. En otras palabras, los CPP desvelados en Milletti, F., 2012, Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 17 (15-16): 850-60 pueden usarse como péptido de penetración celular, es decir, como componente a), en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. Esto incluye en particular CPP catiónicos, CPP anfipáticos y CPP hidrófobos, así como CPP derivados de proteínas de unión a heparano, a ARN y a ADN (consúltese la Tabla 1 de Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 17 (15-16): 850-60, 2012), CPP derivados de péptidos señal (consúltese la Tabla 2 de Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 17 (15-16): 850-60, 2012), CPP derivados de péptidos antimicrobianos (consúltese la Tabla 3 de Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 17 (15-16): 850-60, 2012), CPP derivados de proteínas víricas (consúltese la Tabla 4 de Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 17 (15-16): 850-60, 2012), CPP derivados de diversas proteínas naturales (consúltese la Tabla 5 de Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 17 (15-16): 850-60, 2012) y CPP diseñados y CPP derivados de bibliotecas de péptidos (consúltese la Tabla 6 de Milletti, F., Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 17 (15-16): 850-60, 2012).

Preferentemente, el péptido de penetración celular, que está comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención,

- i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y/o
- ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el resto 170 al resto 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con SEQ ID NO: 3, en donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han sustituido, se han eliminado y/o se han añadido sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de secuencia de dicho fragmento.

De esta manera, se prefiere que el péptido de penetración celular, que está comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención,

- i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y
- ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el resto 170 al resto 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con SEQ ID NO: 3, en donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han sustituido, se han eliminado y/o se han añadido sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de secuencia de dicho fragmento.

Dichos CPP preferidos se desvelan en el documento WO 2014/041505.

El término "ZEBRA" (también conocido como Zta, Z, EB1 o BZLF1) generalmente significa el activador transcripcional de la cremallera de leucina básica (bZIP) del virus de Epstein-Barr (EBV). El dominio mínimo de ZEBRA, que exhibe propiedades de penetración celular, se ha identificado que abarca desde el resto 170 hasta el resto 220 de ZEBRA. La secuencia de aminoácidos de ZEBRA se desvela con el número de registro del NCBI YP_401673 y comprende 245 aminoácidos representados en SEQ ID NO: 3:

MMDPNSTSEDVKFTDPYQVPFVQAFDQATRVYQDLGGPSQAPLPCVLWPVLPEPLPQQQL
...TAYHVVSTAPTGSWESAPQAPENAYQAYAAPQLFFVSDITQNNQQTNQAGGEAPQPGDNST...

VQTAAAVVFACPGANQCGQLADIGVPQPAPVAAPARRTRKPKQPESLEECDSELEIKRYKNR
VASRKCRAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLULKQMCPSLDVDSHPRTPDVLHEDLLNF

(SEQ ID NO: 3 - ZEBRA amino acid sequence (natural sequence from Epstein - Barr virus
(EBV)) (YP_401673))

Recientemente, se describió que un CPP derivado de la proteína vírica ZEBRA transduce cargas de proteínas a través de membranas biológicas mediante (i) translocación directa y (ii) endocitosis mediada por balsas lipídicas (Rothe R, Liguori L, Villegas-Mendez A, Marques B, Grunwald D, Drouet E, *et al.* Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. The Journal of biological chemistry 2010;285(26):20224-33). Los presentes inventores suponen que estos dos mecanismos de entrada deberían promover la presentación restringida tanto del MHC de clase I como II de los antígenos de carga a linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente. En consecuencia, dicho CPP puede suministrar péptidos multiepitópicos a las células dendríticas (DC) y, posteriormente, promover la activación de linfocitos CTL y Th y la función antitumoral. Un CPP tal puede, por lo tanto, suministrar eficazmente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención a las células presentadoras de antígenos (APC) y conducir a una presentación restringida de MHC multiepitópico de clase I y II.

En el contexto de la presente invención, la expresión "MHC de clase I" designa una de las dos clases primarias de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Las moléculas del MHC de clase I (también denominadas "MHC I") se encuentran en cada célula nucleada del cuerpo. La función del MHC de clase I es mostrar un epítipo a las células citotóxicas (CTL). En seres humanos, las moléculas del MHC de clase II consisten en dos cadenas polipeptídicas, α - y β 2-microglobulina (b2m). Solo la cadena α es polimórfica y está codificada por un gen HLA, mientras que la subunidad b2m no es polimórfica y está codificada por el gen de la Beta-2 microglobulina. En el contexto de la presente invención, la expresión "MHC de clase II" designa la otra clase primaria de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Las moléculas del MHC de clase II (también denominadas "MHC II") se encuentran solo en unos pocos tipos de células especializadas, incluyendo macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, todas las cuales son células presentadoras de antígenos (APC) dedicadas.

Preferentemente, la variante de secuencia de un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA como se describe anteriormente comparte, en particular a lo largo de toda su longitud, al menos el 70 %, al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el fragmento del dominio mínimo de ZEBRA como se describió anteriormente sin anular la capacidad de penetración celular del péptido de penetración celular. En particular, un "fragmento" del dominio mínimo de ZEBRA como se define anteriormente debe entenderse preferentemente como una secuencia truncada del mismo, es decir, una secuencia de aminoácidos, que está N-terminal, C-terminal y/o intrasecuencialmente truncada en comparación con la secuencia de aminoácidos de la secuencia nativa. Por otra parte, tal "fragmento" del dominio mínimo de ZEBRA tiene preferentemente una longitud de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente de 15 a 45 aminoácidos en total.

En consecuencia, la expresión "variante de secuencia" como se usa en el contexto de la presente invención, es decir, a lo largo de la presente solicitud, se refiere a cualquier alteración en una secuencia de referencia. La expresión "variante de secuencia" incluye variantes de secuencia de nucleótidos y variantes de secuencia de aminoácidos. Preferentemente, una secuencia de referencia es cualquiera de las secuencias enumeradas en la "Tabla de secuencias y números de SEQ ID" (Listado de secuencias), es decir, SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 94. Preferentemente, una variante de secuencia comparte, en particular a lo largo de toda la longitud de la secuencia, al menos el 70 %, al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, por lo que la identidad de secuencia se calcula

como se describe a continuación. En particular, una variante de secuencia conserva la función específica de la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se calcula como se describe a continuación. En particular, una variante de secuencia de aminoácidos tiene una secuencia alterada en que uno o más de los aminoácidos en la secuencia de referencia está eliminado o sustituido, o uno o más aminoácidos están insertados en la secuencia de la secuencia de aminoácidos de referencia. Como resultado de las alteraciones, la variante de secuencia de aminoácidos tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % idéntica a la secuencia de referencia. Por ejemplo, las secuencias variantes que son menos el 90 % idénticas no tendrán más de 10 alteraciones, es decir, cualquier combinación de eliminaciones, inserciones o sustituciones, por 100 aminoácidos de la secuencia de referencia.

En el contexto de la presente invención, una secuencia de aminoácidos "que comparte una identidad de secuencia" de al menos, por ejemplo, el 95 % a una secuencia de aminoácidos de consulta de la presente invención, pretende significar que la secuencia de la secuencia de aminoácidos sujeto es idéntica a la secuencia de consulta excepto que la secuencia de aminoácidos sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. En otras palabras, para obtener una secuencia de aminoácidos que tenga una secuencia de al menos el 95 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de consulta, hasta el 5 % (5 de 100) de los restos de aminoácidos en la secuencia sujeto pueden insertarse o sustituirse por otro aminoácido o eliminarse, preferentemente dentro de las definiciones anteriores de variantes o fragmentos. Lo mismo, por supuesto, se aplica también de manera similar a secuencias de ácidos nucleicos.

Para secuencias (de aminoácidos o de ácidos nucleicos) sin correspondencia exacta, puede determinarse un "% de identidad" de una primera secuencia con respecto a una segunda secuencia. En general, estas dos secuencias a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "huecos" en una o ambas secuencias, para mejorar el grado de alineación. A continuación puede determinarse un % de identidad en toda la longitud de cada una de las secuencias que se comparan (la denominada alineación global), que es particularmente adecuado para secuencias de longitud igual o similar, o sobre longitudes definidas más cortas (la denominada alineación local), que es más adecuada para secuencias de longitudes desiguales.

Los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. El porcentaje al que dos secuencias son idénticas puede determinarse, por ejemplo, usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, pero no limitante, de un algoritmo matemático que puede usarse es el algoritmo de Karlin *et al.* (1993), PNAS USA, 90:5873-5877. Dicho algoritmo está integrado en la familia de programas BLAST, por ejemplo, el programa BLAST o NBLAST (véase también Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215, 403-410 o Altschul *et al.* (1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402), accesible a través de la página de inicio del NCBI en el sitio web ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson (1990), Methods Enzymol. 183, 63-98; Pearson y Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 2444-2448.). Mediante estos programas pueden identificarse secuencias que son idénticas a otras secuencias hasta cierto punto. Adicionalmente, los programas disponibles en el paquete de análisis de secuencias de Wisconsin, versión 9.1 (Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Res., 387-395), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, pueden usarse para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología o identidad entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT usa el algoritmo de "homología local" de (Smith y Waterman (1981), J. Mol. Biol. 147, 195-197) y encuentra la mejor región individual de similitud entre dos secuencias.

Más preferentemente, los fragmentos del péptido de penetración celular de acuerdo con la invención o las variantes de los mismos como se describe anteriormente conservan además la capacidad de dicho péptido para presentar una molécula de carga tal como antígenos o epítopos antigénicos en la superficie de una célula, tal como una célula presentadora de antígenos, en el contexto de moléculas del MHC de clase I y/o del MHC de clase II. La capacidad de un péptido de penetración celular o complejo que comprende dicho péptido de penetración celular para presentar una molécula de carga tal como antígenos o epítopos antigénicos en la superficie de una célula en el contexto de moléculas del MHC de clase I y/o del MHC de clase II puede comprobarse mediante métodos convencionales conocidos por un experto en la materia, incluyendo la capacidad de estimular la proliferación y/o la función de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ restringidos al MHC con especificidad por estos epítopos.

El péptido de penetración celular preferido, que

- i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y/o
- ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el resto 170 al resto 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con SEQ ID NO: 3, en donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han sustituido, se han eliminado y/o se han añadido sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de dicho fragmento

comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un aminoácido sustituido de forma conservativa en comparación con la secuencia de referencia, lo que significa que un determinado resto de aminoácido se sustituye por un resto con características fisicoquímicas similares.

Generalmente, las sustituciones de uno o más aminoácidos presentes en la secuencia de aminoácidos de referencia deben realizarse de forma conservativa. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un resto alifático por otro, tales como Ile, Val, Leu o Ala por otro, o sustituciones de un resto polar por otro, tales como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Otras de dichas sustituciones conservativas, por ejemplo, las sustituciones de regiones enteras que tienen propiedades de hidrofobicidad similares, son bien conocidas (Kyte y Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157(1):105- 132). Las sustituciones de uno o más L-aminoácidos por uno o más D-aminoácidos deben considerarse sustituciones conservativas en el contexto de la presente invención. Las sustituciones de aminoácidos ilustrativas se presentan en la Tabla 1 a continuación:

(Tabla 1)

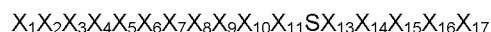
| Restos originales | Ejemplos de sustituciones |
|-------------------|------------------------------|
| Ala (A) | Val, Leu, Ile, Gly |
| Arg (R) | His, Lys |
| Asn (N) | Gln |
| Asp (D) | Glu |
| Cys (C) | Ser |
| Gln (Q) | Asn |
| Glu (E) | Asp |
| Gly (G) | Pro, Ala |
| His (H) | Lys, Arg |
| Ile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

En particular preferentemente, el péptido de penetración celular preferido, que

- i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y/o
- ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el resto 170 al resto 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con SEQ ID NO: 3, en donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han sustituido, se han eliminado y/o se han añadido sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de dicho fragmento

comprende una Cys (C) sustituida en una Ser (S), en el equivalente de la posición 189 con respecto a la secuencia de aminoácidos ZEBRA de SEQ ID NO: 3.

De esta manera, se prefiere que un péptido de penetración celular tal preferido tenga una secuencia de aminoácidos que comprenda una secuencia de acuerdo con la siguiente fórmula general (I):



con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos que están sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, en donde

- X_1 , es K, R o H, preferentemente X_1 , es K o R;
- X_2 es R, K o H, preferentemente X_2 es R o K;

X₃ es Y, W o F, preferentemente X₃ es Y, W o F;
 X₄ es K, R o H, preferentemente X₄ es K o R;
 X₅ es N o Q;
 X₆ es R, K o H, preferentemente X₆ es R o K;
 5 X₇ es V, I, M, L, F o A, preferentemente X₇ es V, I, M o L;
 X₈ es A, V, L, I o G, preferentemente X₈ es A o G;
 X₉ es S o T;
 X₁₀ es R, K o H, preferentemente X₁₀ es R o K;
 X₁₁ es K, R o H, preferentemente X₁₁ es K o R;
 10 X₁₃ es R, K o H, preferentemente X₁₃ es R o K;
 X₁₄ es A, V, L, I o G, preferentemente X₁₄ es A o G;
 X₁₅ es K, R o H, preferentemente X₁₅ es K o R;
 X₁₆ es F, L, V, I, Y, W o M, preferentemente X₁₆ es F, Y o W; y
 X₁₇ es K, R o H, preferentemente X₁₇ es K o R.

15 Preferentemente, un péptido tal, un polipéptido o una proteína están compuestos (completamente) por L-aminoácidos o (completamente) por D-aminoácidos, formando de esta manera "secuencias peptídicas retro-inversas". La expresión "secuencias (peptídicas) retro-inversas" se refiere a un isómero de una secuencia peptídica lineal en que se invierte la dirección de la secuencia y se invierte la quiralidad de cada resto de aminoácido (véanse, por ejemplo, Jameson *et al.*, Nature, 368, 744-746 (1994); Brady *et al.*, Nature, 368, 692-693 (1994)).

20 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₁ es K.

25 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₂ es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₃ es Y.

30 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₄ es K.

35 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₅ es N.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₆ es R.

40 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₇ es V.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₈ es A.

45 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₉ es S.

50 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₁₀ es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₁₁ es K.

55 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₁₃ es R.

En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₁₄ es A.

60 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₁₅ es K.

65 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde X₁₆ es F.

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

5 En una realización particular, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención es como se define de forma genérica anteriormente por la fórmula general (I), en donde el aminoácido en la posición equivalente a la posición 12 con respecto a la fórmula general (I) es una Ser (S).

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

- 10 i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y/o
 ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el resto 170 al resto 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con SEQ ID NO: 3, en donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han sustituido, se han
 15 eliminado y/o se han añadido sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, o una variante de dicho fragmento

comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 4 - 13 o variantes de secuencia de las mismas sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferentemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos
 20 sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido.

25 CPP1 (Z11):
 KRYKNRVASRKCRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLKQMC (SEQ ID NO: 4)

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

30 CPP3 (Z13):
 KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLK
 (SEQ ID NO: 6)

35 CPP4 (Z14):
 KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAK
 (SEQ ID NO: 7)

40 CPP5 (Z15):
 KRYKNRVASRKSRAKFK
 (SEQ ID NO: 8)

45 CPP6 (Z16):
 QHYREVAAAKSSSEND
 (SEQ ID NO: 9)

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

50 CPP8 (Z18):
 REVAAAKSS END RLRLK
 (SEQ ID NO: 11)

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

60 CPP10 (Z20):
 VASRKSRAKFK
 (SEQ ID NO: 13)

De esta manera, se prefiere particularmente un péptido de penetración celular, que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13), SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14), SEQ ID NO: 8 (CPP5/Z15) o SEQ ID NO: 11 (CPP8/Z18) o variantes de secuencia de las mismas sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferentemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de
 65

penetración celular de dicho péptido. Por otra parte, se prefiere más un péptido de penetración celular, que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) o SEQ ID NO: 7 (CPP4/Z14) o variantes de secuencia de las mismas sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferentemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido.

Por otra parte, lo más preferido es un péptido de penetración celular, que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) o variantes de secuencia de las mismas sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, preferentemente variantes de secuencia que tienen 0, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos sustituidos, eliminados y/o añadidos sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido. En consecuencia, lo más preferido es que el péptido de penetración celular comprenda o consista en un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos el 70 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos el 75 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 80 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos el 85 % de identidad de secuencia, aún más preferentemente al menos el 90 % de identidad de secuencia, en particular preferentemente al menos el 95 % de identidad de secuencia, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia. En este contexto, una "variante de secuencia funcional" es una variante de secuencia en la que se mantiene la capacidad de penetración celular de dicho péptido.

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

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

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

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

Un experto en la materia entenderá que la secuencia de aminoácidos primaria del péptido de penetración celular de la invención puede modificarse además postraduccionalmente, tal como por glucosilación o fosforilación, sin apartarse de la invención.

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

- (i) una señal de localización nuclear (NLS). Tales señales son bien conocidas por la persona experta y se describen en Nair *et al.* (2003, Nucleic Acids Res. 31(1): 397-399)
- (ii) un péptido de direccionamiento, incluyendo péptidos de asentamiento de tumores tales como aquellos descritos en Kapoor *et al.* (2012, PLoS ONE 7(4): e35787) y listados en <http://crdd.osdd.net/raghava/tumorhope/general.php?>

Preferentemente, el péptido de penetración celular de acuerdo con la invención está enlazado a un antígeno o epítipo antigénico y facilita la internalización celular de dicho antígeno o epítipo antigénico.

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

Componente b) - Antígeno /epítipo antigénico

El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende como componente b) al menos un antígeno o epítipo antigénico, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2.

Como se usa en el presente documento, un "antígeno" es cualquier sustancia estructural que sirve como una diana para los receptores de una respuesta inmunitaria adaptativa, en particular como una diana para anticuerpos, receptores de linfocitos T y/o receptores de linfocitos B. Un "epítipo", también conocido como un "determinante antigénico", es la parte (o fragmento) de un antígeno que es reconocido por el sistema inmunitario, en particular por

anticuerpos, receptores de linfocitos T y/o receptores de linfocitos B. Por lo tanto, un antígeno tiene al menos un epítipo, es decir, un único antígeno tiene uno o más epítipos. En el contexto de la presente invención, el término "epítipo" se usa principalmente para designar epítipos de linfocitos T, que se presentan sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos, donde se unen al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Los epítipos de linfocitos T presentados por las moléculas del MHC de clase I son normalmente, pero no exclusivamente, péptidos entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, mientras que las moléculas del MHC de clase II presentan péptidos más largos, generalmente, pero no exclusivamente, entre 12 y 25 aminoácidos de longitud.

En el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, el al menos un antígeno o epítipo antigénico es un epítipo ASCL2. Además, el al menos un antígeno puede seleccionarse del grupo que consiste en: (i) un péptido, un polipéptido o una proteína, (ii) un polisacárido, (iii) un lípido, (iv) una lipoproteína o un lipopéptido, (v) un glucolípido, (vi) un ácido nucleico y (vii) un fármaco de molécula pequeña o una toxina. Por lo tanto, el al menos un antígeno o epítipo antigénico puede ser un péptido, una proteína, un polisacárido, un lípido, una combinación de los mismos incluyendo lipoproteínas y glucolípidos, un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARNip, ARNhc, oligonucleótidos antisentido, ADN señuelo, plásmido) o un fármaco de molécula pequeña (por ejemplo, ciclosporina A, paclitaxel, doxorubicina, metotrexato, ácido 5-aminolevulínico), o cualquier combinación de los mismos, en particular si el complejo inventivo comprende más de un antígeno o epítipo antigénico.

Se entiende que el complejo que comprende un epítipo de ASCL2 puede comprender al menos un antígeno o epítipo antigénico adicional, por ejemplo, al menos uno, es decir, uno o más, péptidos, polipéptidos o proteínas enlazados entre sí y/o al menos uno, es decir, uno o más, ácidos nucleicos, por ejemplo, donde cada uno codifica un péptido o polipéptido. También el al menos un antígeno o epítipo antigénico puede ser una combinación de una proteína, un lípido y/o un polisacárido incluyendo lipoproteínas y glucolípidos. Por lo tanto, en particular si el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende más de un antígeno o epítipo antigénico, es decir, un antígeno o epítipo antigénico adicional distinto de un epítipo de ASCL2, puede comprender más de un péptido, un polipéptido o una proteína, más de un polisacárido, más de un lípido, más de una lipoproteína, más de un glucolípido, más de un ácido nucleico, más de un fármaco o toxina de molécula pequeña o una combinación de los mismos.

El complejo para su uso de acuerdo con la invención comprende al menos un antígeno o epítipo antigénico que comprende uno o más epítipos de un antígeno asociado a cáncer/tumor, un antígeno específico de cáncer/tumor, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2.

Más preferentemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico comprende o consiste en al menos un epítipo de cáncer/tumor, en particular al menos un epítipo tumoral, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2. Lo más preferentemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico comprende o consiste en al menos un epítipo de cáncer/tumor, en particular al menos un epítipo tumoral.

Se prefiere particularmente que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprenda solo tales antígeno o antígenos o epítipo o epítipos antigénicos, que son antígeno o antígenos asociados a cáncer/tumor, antígeno o antígenos específicos de cáncer/tumor y/o epítipo o epítipos de cáncer/tumor; en particular, que son antígeno o antígenos asociados a tumores, antígeno o antígenos específicos de tumores y/o epítipo o epítipos de tumores.

Como se usa en el presente documento, "epítipo de cáncer" significa un epítipo de un antígeno asociado al cáncer o de un antígeno específico del cáncer. En consecuencia, "epítipo tumoral" significa un epítipo de un antígeno asociado a un tumor o de un antígeno específico de un tumor. Dichos epítipos suelen ser específicos de (o asociados a) un determinado tipo de cáncer/tumor. En particular, los antígenos asociados al cáncer/tumor (también relacionados con el cáncer/tumor) son antígenos, que se expresan por ambas, células cancerosas/tumorales y células normales. En consecuencia, esos antígenos normalmente están presentes desde el nacimiento (o incluso antes). En consecuencia, existe la posibilidad de que el sistema inmunitario haya desarrollado autotolerancia a esos antígenos. Los antígenos específicos de cáncer/tumor, por el contrario, son antígenos, que se expresan específicamente por células cancerosas/tumorales, pero no por las células normales. Los antígenos específicos de cáncer/tumor incluyen en particular neoantígenos. En general los neoantígenos son antígenos, que no estaban presentes antes y son, por lo tanto, "nuevos" para el sistema inmunitario. Los neoantígenos suelen deberse a mutaciones somáticas. En el contexto de cáncer/tumores, los neoantígenos específicos de cáncer/tumores normalmente no estaban presentes antes de que se desarrollara el cáncer/tumor y los neoantígenos específicos del cáncer/tumor normalmente están codificados por mutaciones genéticas somáticas en las células cancerosas/células tumorales. Dado que los neoantígenos son nuevos para el sistema inmunitario, el riesgo de autotolerancia de esos antígenos es considerablemente menor en comparación con los antígenos asociados al cáncer o a tumores. Sin embargo, cada conjunto de mutaciones específicas de tumor de cada cáncer parece ser único. En consecuencia, en el contexto de la presente invención se prefiere que tales antígenos específicos de cáncer/tumor, en particular neoantígenos, se identifiquen en un sujeto diagnosticado con cáncer colorrectal mediante métodos conocidos por el experto, por ejemplo, secuenciación del genoma del cáncer. Después de la identificación, los respectivos neoantígenos específicos de cáncer/tumor y/o epítipos neoantigénicos específicos de cáncer/tumor se usan en un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención.

Preferentemente, un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende uno o más epítomos asociados a cáncer/tumor y/o uno o más antígenos asociados a cáncer/tumor (pero preferentemente ningún epítomo específico de cáncer/tumor), en donde el complejo de acuerdo con la invención comprende un epítomo de ASCL2. También se prefiere que un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprenda uno o más epítomos específicos de cáncer/tumor y/o uno o más antígenos específicos de cáncer/tumor (pero preferentemente ningún epítomo asociado a cáncer/tumor), en donde el complejo de acuerdo con la invención comprende un epítomo de ASCL2. Un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención también puede comprender preferentemente ambos, (i) uno o más epítomos asociados a cáncer/tumor y/o uno o más antígenos asociados a cáncer/tumor y (ii) uno o más epítomos específicos de cáncer/tumor y/o uno o más antígenos específicos de cáncer/tumor, en donde el complejo comprende un epítomo de ASCL2.

En particular, el cáncer/tumor con el que los antígenos o epítomos antigénicos están asociados o para el cual los antígenos o epítomos antigénicos son específicos es cáncer colorrectal como se describe en el presente documento. Por lo tanto, los antígenos son preferentemente antígenos asociados a CRC o específicos de CRC y los epítomos son preferentemente epítomos asociados a CRC o específicos de CRC.

Los epítomos de cáncer/tumor adecuados pueden recuperarse, por ejemplo, de bases de datos de epítomos de cáncer/tumor, por ejemplo, de van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. *Cancer Immunol* 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, en donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por los linfocitos T CD4+ o CD8+ se clasifican en cuatro grupos principales en función de su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (TANTIGEN versión 1.0, 1 de dic de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>). Los ejemplos de epítomos de cáncer/tumor incluyen, por ejemplo, epítomos derivados de TRP2, epítomos derivados del antígeno de melanoma de la glucoproteína 100 (gp100), epítomos derivados del antígeno de la glucoproteína 70 (gp70), epítomos de survivina, epítomos de IEa, IL13ra2, EphA2 (receptor 2 de efrina tipo A), fragmentos inmunogénicos de los mismos y fusiones de dichos antígenos y/o fragmentos. Adicionalmente, los ejemplos de epítomos de cáncer/tumor incluyen epítomos de neoantígenos, tales como, por ejemplo, un neoantígeno de la línea celular tumoral MC-38 descrito por Yadav *et al.* *Nature*. 27 de nov de 2014;515(7528):572-6. Como se ha descrito anteriormente, los neoantígenos son antígenos, que están completamente ausentes del genoma humano normal. En comparación con los autoantígenos no mutados, los neoantígenos son relevantes para el control tumoral, ya que la calidad del conjunto de células T disponible para estos antígenos no se ve afectada por la tolerancia de los linfocitos T centrales. En particular, los neoantígenos pueden basarse en genomas tumorales individuales. Los neoantígenos potenciales pueden predecirse mediante métodos conocidos por la persona experta, tales como secuenciación del genoma del cáncer o tecnologías de secuenciación profunda que identifican mutaciones dentro de la parte codificante de proteínas del genoma (del cáncer).

Los ejemplos específicos de antígenos asociados a cáncer/tumores, en particular relacionados con tumores o específicos de tejido útiles en un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención distintos de ASCL2 incluyen, pero no se limitan a, los siguientes antígenos: Her-2/neu, SPAS-1, TRP-2, tirosinasa, Melan A/Mart-1, gp100, BAGE, GAGE, gangliósido GM2, quinesina 2, factor modulador del elemento TATA 1, proteína tumoral D52, MAGE D, ING2, HIP-55, factor antiapoptótico TGF-1, HOM-Mel-40/SSX2, antígeno epitelial (LEA 135), antígeno DF31MUC1 (Apostolopoulos *et al.*, 1996 *Immunol. Cell. Biol.* 74: 457-464; Pandey *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55: 4000-4003), MAGE-1, HOM-Mel-40/SSX2, NY-ESO-1, EGFR, CEA, EphA2, EphA4, PCDGF, HAAH, Mesotelina; EPCAM; NY-ESO-1, glucoproteína MUC1 y NIUC10 mucinas p5 (especialmente versiones mutadas), EGFR, antígeno sérico asociado al cáncer (CASA) y antígeno del cáncer 125 (CA 125) (Kierkegaard *et al.*, 1995, *Gynecol. Oncol.* 59: 251-254), la glucoproteína epitelial 40 (EGP40) (Kievit *et al.*, 1997, *Int. J. Cancer* 71: 237-245), antígeno del carcinoma epidermoide (SCC) (Lozza *et al.*, 1997 *Anticancer Res.* 17: 525-529), cathepsina E (Mota *et al.*, 1997, *Am. J. Pathol.* 150: 1223-1229), tirosinasa en melanoma (Fishman *et al.*, 1997 *Cancer* 79: 1461-1464), antígeno nuclear celular (PCNA) de cavernomas cerebrales (Notelet *et al.*, 1997 *Surg. Neurol.* 47: 364-370), un autoantígeno asociado a tumores de 35 kD en el carcinoma papilar de tiroides (Lucas *et al.*, 1996 *Anticancer Res.* 16: 2493-2496), CDC27 (incluyendo la forma mutada de la proteína), antígenos de triosafosfato isomerasa, 707-AP, antígeno micobacteriano A60 (Macs *et al.*, 1996, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122: 296-300), Anexina II, AFP, ART-4, BAGE, β -catenina/m, BCL-2, bcr-abl, bcr-abl p190, bcr-abl p210, BRCA-1, BRCA-2, CA 19-9 (Tolliver y O'Brien, 1997, *South Med. J.* 90: 89-90; Tsuruta *et al.*, 1997 *Urol. Int.* 58: 20-24), CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK-4/m, CEA (Huang *et al.*, *Exper Rev. Vaccines* (2002)1:49-63), CT9, CT10, Cyp-B, Dek-cain, DAM-6 (MAGE-B2), DAM-10 (MAGE-B1), EphA2 (Zantek *et al.*, *Cell Growth Differ.* (1999) 10:629-38; Carles-Kinch *et al.*, *Cancer Res.* (2002) 62:2840-7), EphA4 (Cheng *et al.*, 2002, *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:75-85), antígeno de Thomsen-Friedenreich asociado a tumores (Dahlenborg *et al.*, 1997, *Int. J. Cancer* 70: 63-71), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, GnT-V, gp100 (Zajac *et al.*, 1997, *Int. J. Cancer* 71: 491-496), HAGE, HER2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, hTERT, ICE, inhibidores de la apoptosis (por ejemplo, survivina), antígeno de adenocarcinoma KH-1 (Deshpande y Danishefsky, 1997, *Nature* 387: 164-166), KIAA0205, K-ras, LAGE, LAGE-1, LDLR/FUT, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-6, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE D, MART-1, MART-1/Melan-A (Kawakami y Rosenberg, 1997, *Int. Rev. Immunol.* 14: 173-192), MC1R, MDM-2, Miosina/m, MUC1, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, polimerasa neo-poliA, NA88-A, NY-ESO-1, NY-ESO-1a (CAG-3), PAGE-4, PAP, Proteinasa 3 (Molldrem *et al.*, *Blood* (1996) 88:2450-7; Molldrem *et al.*, *Blood* (1997) 90:2529-34), P15, p190, Pm1/RAR α , PRAME, PSA, PSM, PSMA,

RAGE, RAS, RCAS1, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SP17, SPAS-1, TEL/AML1, TPI/m, Tirosinasa, TARP, TRP-1 (gp75), TRP-2, TRP-2/INT2, WT-1 y, proteínas NY-ESO-ORF2 y CAMEL traducidas alternativamente, derivadas de los genes NY-ESO-1 y LAGE-1. En un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención está comprendido un epítipo del antígeno ASCL2 (homólogo 2 de Achaete-scute). Muchos otros antígenos de cáncer son bien conocidos en la técnica.

Preferentemente, el antígeno de cáncer/tumoral o el epítipo de cáncer/tumoral es un antígeno de cáncer/tumoral recombinante o un epítipo de cáncer/tumoral recombinante. Un antígeno de cáncer/tumoral tal recombinante o un epítipo de cáncer/tumoral recombinante pueden diseñarse introduciendo mutaciones que cambian (añaden, eliminan o sustituyen) aminoácidos particulares en la secuencia de aminoácidos general del antígeno de cáncer/tumoral nativo o del epítipo de cáncer/tumoral nativo. La introducción de mutaciones no altera tanto el antígeno canceroso/tumoral ni el epítipo canceroso/tumoral como para que no pueda aplicarse universalmente en un sujeto mamífero, y preferentemente en un sujeto humano o canino, pero lo cambia lo suficiente como para que la secuencia de aminoácidos resultante rompa la tolerancia o se considere un antígeno extraño para generar una respuesta inmunitaria. Otra manera puede ser crear un antígeno tumoral/cáncer recombinante de consenso o un epítipo tumoral/cáncer que tenga al menos el 85 % y hasta el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con su correspondiente antígeno tumoral/cáncer nativo o epítipo tumoral/cáncer nativo; preferentemente al menos el 90 % y hasta el 98 % de identidad de secuencia; más preferentemente al menos el 93 % y hasta el 98 % de identidad de secuencia; o incluso más preferentemente al menos el 95 % y hasta el 98 % de identidad de secuencia. En algunos casos, el antígeno de cáncer/tumoral recombinante o el epítipo de cáncer/tumoral recombinante tienen el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con su correspondiente antígeno de cáncer/tumoral nativo o epítipo de cáncer/tumoral. El antígeno de cáncer/tumoral nativo es el antígeno normalmente asociado con el cáncer o tumor canceroso particular. Dependiendo del antígeno de cáncer/tumoral, la secuencia consenso del antígeno de cáncer/tumoral puede ser entre especies de mamíferos o dentro de subtipos de una especie o entre cepas o serotipos víricos. Algunos antígenos de cáncer/tumoral no varían mucho de la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre del antígeno de cáncer/tumoral. Los enfoques mencionados anteriormente pueden combinarse de tal manera que el antígeno canceroso/tumoral recombinante final o el epítipo canceroso/tumoral tenga un porcentaje de similitud con la secuencia de aminoácidos del antígeno canceroso nativo como se analizó anteriormente. Preferentemente, sin embargo, la secuencia de aminoácidos de un epítipo de un antígeno de cáncer/tumoral como se describe en el presente documento no está mutada y, por lo tanto, es idéntica a la secuencia del epítipo de referencia.

Como se usa en el presente documento, "epítipo patógeno" (no reivindicado; solo con fines ilustrativos) significa un epítipo de una proteína antigénica, un polisacárido antigénico, un lípido antigénico, una lipoproteína antigénica o un glucolípido antigénico de un patógeno que incluye virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos multicelulares. Proteínas antigénicas, polisacáridos, lípidos, lipoproteínas o glucolípidos de patógenos incluyen, en el presente documento, proteínas, polisacáridos, lípidos, lipoproteínas y glucolípidos, respectivamente, de patógenos responsables de enfermedades que pueden ser una diana de la vacunación incluyendo, por ejemplo, Amebiasis, Carunco, Úlcera de Buruli (*Mycobacterium ulcerans*), Diarrea asociada a calicivirus, Diarrea por *Campylobacter*, Cáncer de cuello uterino (virus del papiloma humano), Enfermedades genitales asociadas a *Chlamydia trachomatis*, Cólera, Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Fiebre del dengue, Difteria, Fiebre hemorrágica del Ébola, Diarrea enterotoxigénica por *Escherichia coli* (ETEC), Cáncer gástrico (*Helicobacter pylori*), Gonorrea, Enfermedades asociadas al estreptococo del grupo A, Enfermedades asociadas al estreptococo del grupo B, Neumonía por *Haemophilus influenzae* B y enfermedad invasiva, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Diarrea por Hepatitis E, Úlceras genitales por herpes simple tipo 2, VIH/SIDA, Anquilostomiasis, Gripe, Encefalitis japonesa, Fiebre de Lassa, Leishmaniasis, Leptospirosis, Cáncer de hígado (Hepatitis B), Cáncer de hígado (Hepatitis C), Enfermedad de Lyme, Paludismo, Fiebre hemorrágica de Marburgo, Sarampión, Paperas, Carcinoma nasofaríngeo (virus de Epstein-Barr), Meningitis por *Neisseria meningitidis*, Neumonía asociada a parainfluenza, Tosferina, Peste, Poliomieltis, Infección del sistema nervioso causada por un rhabdovirus (*rabies*), Neumonía por virus respiratorio sincicial (VSR), Fiebre del valle del Rift, Diarrea por rotavirus, Rubeola, Esquistosomiasis, Síndrome respiratorio agudo grave (SARS), Shigelosis, Viruela, Enfermedades asociadas a *Staphylococcus aureus*, Cáncer de estómago (*Helicobacter pylori*), *Streptococcus pneumoniae* y enfermedades invasivas, Tétanos, Encefalitis transmitida por garrapatas, Tracoma, Tuberculosis, Tularemia, Fiebre tifoidea, Enfermedad asociada al virus del Nilo Occidental, Fiebre amarilla.

Preferentemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico se presentará en la superficie celular en un contexto del MHC de clase I y/o del MHC de clase II y/o en un contexto de CD1, por lo que se prefiere la presentación en la superficie celular en un contexto de MHC de clase I y/o MHC de clase II. La expresión "presentación de epítipo en el contexto del MHC de clase I" se refiere en particular a un epítipo CD8⁺ que se encuentra en el surco de una molécula de MHC de clase I en la superficie de una célula. La expresión "presentación de epítipo en el contexto del MHC de clase II" se refiere en particular a un epítipo CD4⁺ que se encuentra en el surco de una molécula de MHC de clase II en la superficie de una célula. La expresión "presentación de epítipo en el contexto de CD1" se refiere en particular a un epítipo lipídico que se encuentra en el surco de un grupo de moléculas de diferenciación 1 en la superficie de una célula.

Ventajosamente, el complejo para su uso de acuerdo con la invención comprende un péptido de penetración celular y al menos un antígeno o epítipo antigénico, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2 y permite el

transporte y la presentación de dichos epítomos en la superficie celular de células presentadoras de antígenos en un contexto de MHC de clase I y MHC de clase II, y es, por lo tanto, útil en vacunación e inmunoterapia.

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

Las expresiones "epítomo CD4⁺" o "epítomo restringido a CD4⁺", como se usan en el presente documento, designan un epítomo reconocido por un linfocito T CD4⁺, consistiendo dicho epítomo en particular en un fragmento de antígeno que se encuentra en el surco de una molécula de MHC de clase II. Un solo epítomo CD4⁺ comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención consiste preferentemente en aproximadamente 12-25 aminoácidos. También puede consistir en, por ejemplo, aproximadamente 8-25 aminoácidos o aproximadamente 6-100 aminoácidos.

Las expresiones "epítomo CD8⁺" o "epítomo restringido a CD8⁺", como se usan en el presente documento, designan un epítomo reconocido por un linfocito T CD8⁺, consistiendo dicho epítomo en particular en un fragmento de antígeno que se encuentra en el surco de una molécula de MHC de clase I. Un solo epítomo CD8⁺ comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención consiste preferentemente en aproximadamente 8-11 aminoácidos. También puede consistir en, por ejemplo, aproximadamente 8-15 aminoácidos o aproximadamente 6-100 aminoácidos.

Preferentemente, el al menos un antígeno puede comprender o el al menos un epítomo antigénico puede consistir en un epítomo CD4⁺ y/o un epítomo CD8⁺ correspondiente a determinante o determinantes antigénicos de un antígeno asociado a cáncer/tumor, un antígeno específico de cáncer/tumor o una proteína antigénica de un patógeno. Más preferentemente, el al menos un antígeno puede comprender o el al menos un epítomo antigénico puede consistir en un epítomo CD4⁺ y/o un epítomo CD8⁺ correspondiente a determinante o determinantes antigénicos de un antígeno asociado a cáncer/tumor o un antígeno específico de cáncer/tumor. Lo más preferentemente, el al menos un antígeno puede comprender o el al menos un epítomo antigénico puede consistir en un epítomo CD4⁺ y/o un epítomo CD8⁺ correspondiente a determinante o determinantes antigénicos de un antígeno asociado a tumor o un antígeno específico de tumor.

También se prefiere que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprenda al menos dos antígenos o epítomos antigénicos, en donde al menos un antígeno o epítomo antigénico comprende o consiste en un epítomo CD4⁺ y al menos un antígeno o epítomo antigénico comprende o consiste en un epítomo CD8⁺. Ahora se establece que los linfocitos T_h (CD4⁺) desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria antitumoral tanto en la concesión de licencias de DC como en el reclutamiento y mantenimiento de CTL (CD8⁺) en el sitio del tumor. Por lo tanto, un complejo para su uso de acuerdo con la presente invención que comprende al menos dos antígenos o epítomos antigénicos, en donde al menos un antígeno o epítomo antigénico comprende o consiste en un epítomo CD4⁺ y al menos un antígeno o epítomo antigénico comprende o consiste en un epítomo CD8⁺, proporciona una respuesta inmunitaria integrada que permite el cebado simultáneo de CTL y linfocitos T_h y, por lo tanto, es preferible a la inmunidad contra un solo epítomo CD8⁺ o solo un epítomo CD4⁺. Por ejemplo, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender preferentemente un epítomo Ealfa-CD4⁺ y un epítomo gp100-CD8⁺.

Preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos antígenos o epítomos antigénicos, en donde el complejo comprende un epítomo de ASCL2, en donde los al menos dos antígenos o epítomos antigénicos comprenden o consisten en al menos dos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más, epítomos CD4⁺ y/o al menos dos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más, epítomos CD8⁺. De esta manera, los al menos dos antígenos o epítomos antigénicos son preferentemente antígenos o epítomos antigénicos diferentes, más preferentemente los al menos dos antígenos o epítomos antigénicos son diferentes entre sí pero se refieren al mismo tipo de tumor. Una vacuna multiantigénica (i) evitará el sobrecrecimiento de variantes con pérdida de antígeno, (ii) se dirigirá a diferentes células tumorales dentro de una masa tumoral heterogénea y (iii) evitará la variabilidad tumoral de un paciente a otro. Por lo tanto, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende en particular preferentemente al menos dos antígenos o epítomos antigénicos, en particular con al menos dos epítomos CD8⁺ y al menos dos epítomos CD4⁺. Un complejo de este tipo para su uso de acuerdo con la presente invención induce CTL CD8 multiepitópicos y linfocitos T_h CD4 que funcionan sinérgicamente para contrarrestar las células tumorales y promover una inmunidad antitumoral eficiente. Los linfocitos T_h también participan en el mantenimiento de una inmunidad celular duradera que se controló después de la vacunación. Un complejo tal para su uso de acuerdo con la presente invención induce respuestas inmunitarias policlonales, multiepitópicas y linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ polifuncionales y, por lo tanto, actividad antitumoral eficaz.

Preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos antígenos o epítomos antigénicos, en donde el complejo comprende un epítomo de ASCL2, más preferentemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos tres antígenos o epítomos antigénicos, incluso más preferentemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos cuatro antígenos o epítomos antigénicos, en particular preferentemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos cinco antígenos o epítomos antigénicos y lo más preferentemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos seis antígenos o epítomos antigénicos. Los antígenos

o epítomos antigénicos comprendidos por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención pueden ser iguales o diferentes, preferentemente los antígenos o epítomos antigénicos comprendidos por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención son diferentes entre sí. Preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos un epítopo CD4⁺ y al menos un epítopo CD8⁺.

Preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende más de un epítopo CD4⁺, en donde el complejo comprende un epítopo de ASCL2, por ejemplo, dos o más epítomos CD4⁺ del mismo antígeno o de diferentes antígenos, y preferentemente sin epítopo CD8⁺. También se prefiere que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprenda más de un epítopo CD8⁺, por ejemplo, dos o más epítomos CD8⁺ del mismo antígeno o de diferentes antígenos, y preferentemente sin epítopo CD4⁺. Lo más preferentemente, sin embargo, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende (i) al menos un epítopo CD4⁺, por ejemplo, dos o más epítomos CD4⁺ del mismo antígeno o de diferentes antígenos y (ii) al menos un epítopo CD8⁺, por ejemplo, dos o más epítomos CD8⁺ del mismo antígeno o de diferentes antígenos.

Por ejemplo, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítopo de ASCL2, puede comprender preferentemente un epítopo gp100-CD8⁺, un epítopo Ealfa-CD4⁺ y un epítopo CD4⁺ adicional y un epítopo CD8⁺ adicional. Aún más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender un polipéptido o proteína que comprende un epítopo gp100-CD8⁺ y un epítopo Ealfa-CD4⁺. Por ejemplo, dicho polipéptido o proteína comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 14 o variantes de secuencia de la misma como se define anteriormente:

ESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPFAKF ASFEAQGALA
NIAVDKANLD VEQLSINF EKLTEWTGS

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

Por ejemplo, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítopo de ASCL2, también puede comprender un epítopo gp70-CD8⁺ y/o un epítopo gp70-CD4⁺. En particular, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender un polipéptido o proteína que comprende un epítopo gp70-CD8⁺ y/o un epítopo gp70-CD4⁺. Por ejemplo, dicho polipéptido o proteína comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 43 o variantes de secuencia de la misma como se define anteriormente:

VTYHSPSYAYHQFERRAILNRLVQFIKDR

SEQ ID NO: 43 (Carga Mad8 que comprende un epítopo gp70-CD8⁺ y uno gp70-CD4⁺)

Por ejemplo, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítopo de ASCL2, puede comprender preferentemente al menos un epítopo de survivina, tal como un epítopo CD8⁺ de survivina y/o un epítopo CD4⁺ de survivina. Más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender un polipéptido o proteína que comprende un epítopo CD8⁺ de survivina y/o un epítopo CD4⁺ de survivina. Más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender un polipéptido o proteína que comprende más de un epítopo CD8⁺ de survivina y/o más de un epítopo CD4⁺ de survivina, tal como dos epítomos CD8⁺ de survivina diferentes. Por ejemplo, dicho polipéptido o proteína comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 44 o variantes de secuencia de la misma como se define anteriormente:

NYRIATFKNWPFLDCAMEELTVSEFLKLDQR

SEQ ID NO: 44 (carga Mad11 que comprende un epítopo 1 CD8⁺ de survivina y un epítopo 2 CD8⁺ de survivina)

Por ejemplo, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítopo de ASCL2, puede comprender preferentemente un epítopo de un neoantígeno. Aún más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender un polipéptido o proteína que comprende un epítopo de un neoantígeno, tal como el neoantígeno de la línea celular tumoral MC-38 identificado por Yadav *et al.* Nature. 27 de nov de 2014;515(7528):572-6. Por ejemplo, dicho polipéptido o proteína comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 42 o variantes de secuencia de la misma como se define anteriormente:

HLELASMTNMELMSSIV

SEQ ID NO: 42 (carga Mad9 que comprende el epítopo de un neoantígeno como se describe por Yadav *et al.* Nature. 27 de nov de 2014;515(7528):572-6).

Por ejemplo, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítopo de ASCL2, puede comprender preferentemente más de uno, por ejemplo, dos o tres, epítomos de

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

LFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTNMELMSSIVVISASIIVFNLLELEG

SEQ ID NO: 63 (carga Mad12 que comprende el epítipo de un neoantígeno como se describe por Yadav *et al.* Nature. 27 de nov de 2014;515(7528):572-6).

Preferentemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un péptido, un polipéptido o una proteína. Algunos ejemplos de antígeno o epítipo antigénico de naturaleza peptídica, polipeptídica o proteica útiles en la invención, incluyen antígenos de cáncer/tumorales o epítomos antigénicos de los mismos. También se describen antígenos de alergia o epítomos antigénicos de los mismos, autoantígenos autoinmunitarios o epítomos antigénicos de los mismos, antígenos patógenos o epítomos antigénicos de los mismos y antígenos o epítomos antigénicos de los mismos de virus, preferentemente de citomegalovirus (CMV), virus variólico ortopox, virus ortopox alastrim, virus parapox ovis, virus del molusco contagioso, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus del herpes B, virus de la varicela zóster, virus de la pseudorrabia, virus de la citomegalia humana, virus del herpes humano 6, virus del herpes humano 7, virus de Epstein-Barr, virus del herpes humano 8, virus de la hepatitis B, virus chikungunya, virus O'nyong'nyong, rubivirus, virus de la hepatitis C, virus de GB C, virus del Nilo Occidental, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalomiелitis ovina, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis japonesa B, virus de Powassan, virus FSME, SARS, coronavirus asociado a SARS, coronavirus humano 229E, coronavirus humano Oc43, Torovirus, virus linfotrópico de linfocitos T humanos tipo I, virus linfotrópico de linfocitos T humanos tipo II, VIH (SIDA), es decir, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 o virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2, virus de la gripe, virus de Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus de Tacaribe, virus de Junín, virus de Machupo, virus de la enfermedad de Borna, virus de Bunyamwera, virus de la encefalitis de California, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de la fiebre del flebotomo, virus de la Toscana, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus Hazara, virus de Khasan, virus de Hantaan, virus de Seúl, virus de Prospect Hill, virus Puumala, virus de Dobrava-Belgrado, virus de Tula, virus sin nombre, virus del lago Victoria de Marburgo, virus del ébola de Zaire, virus del ébola de Sudán, virus del Ébola de Costa de Marfil, virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus de la gripe C, virus paragripal, parásito de la malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*), virus de Marburgo, virus del sarampión, virus de las paperas, virus sincicial respiratorio, metapneumovirus humano, virus de la estomatitis vesicular de Indiana, virus de la rabia, virus de Mokola, virus de Duvenhage, Lyssavirus del murciélago europeo 1 + 2, Lyssavirus del murciélago australiano, adenovirus A-F, virus del papiloma humano, virus del condiloma 6, virus del coriloma 11, virus del polio, virus adenoasociado 2, rotavirus, orbivirus, varicela incluyendo varicela zoster, etc., o antígenos o epítomos antigénicos de leishmania, típanosomas, amibes, bacterias, etc. o pueden seleccionarse de epítomos o de variantes de los antígenos o epítomos antigénicos anteriores. Preferentemente, los epítomos así como las variantes de antígenos como se definen anteriormente exhiben una homología o identidad de secuencia de aproximadamente el 10 %, en particular al menos el 10 %, aproximadamente el 20 %, en particular al menos el 20 %, aproximadamente el 30 %, en particular al menos el 30 %, aproximadamente el 40 %, en particular al menos el 40 %, aproximadamente el 50 %, en particular al menos el 50 %, aproximadamente el 60 %, en particular al menos el 60 %, aproximadamente el 70 %, en particular al menos el 70 %, aproximadamente el 80 %, en particular al menos el 80 %, aproximadamente el 90 %, en particular al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % con uno de los antígenos o secuencias antigénicas como se muestra o se describe anteriormente. En este contexto, la definición de epítomos y variantes se aplica de manera similar como se define.

Los ejemplos de antígenos o epítomos antigénicos (no reivindicados) en la categoría de péptido, polipéptido o proteína incluyen una combinación de múltiples epítomos de glioma tales como aquellos descritos en Novellino *et al.* (2005, Cancer Immunol Immunother, 54(3):187-207), Vigneron *et al.* (2013, Cancer Immun.13:15). Sin embargo, un complejo individual también puede comprender solo un subconjunto, es decir, uno o más de todos de dichos epítomos de glioma. En un caso tal preferentemente diferentes complejos comprenden diferentes subconjuntos de todos dichos epítomos de glioma, de tal manera que, por ejemplo, una vacuna que comprende tales complejos diferentes comprende todos dichos epítomos de glioma pero distribuidos en los diferentes complejos.

Por otra parte, un complejo para su uso de acuerdo con la invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, también puede comprender al menos un antígeno o epítipo antigénico, en donde dicho antígeno o epítipo antigénico es un polisacárido, un lípido, una lipoproteína y/o un glucolípido, en particular un epítipo polisacárido, lipídico, lipoproteico y/o glucolípido.

En particular, el complejo para su uso de acuerdo con la invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, puede comprender al menos un antígeno o epítipo antigénico, en donde dicho antígeno o epítipo antigénico es polisacárido, lipídico, lipoproteico y/o glucolípido.

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

Preferentemente, dichos epítopos lipídicos se presentarán en la superficie celular en un contexto CD1 (grupo de diferenciación 1).

5 El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítopo de ASCL2, también puede comprender al menos un antígeno o epítopo antigénico, en donde dicho antígeno o epítopo antigénico es un fármaco o toxina de molécula pequeña.

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

15 El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítopo de ASCL2, comprende al menos un antígeno o epítopo antigénico, preferentemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende más de un antígeno o epítopo antigénico, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más antígenos o epítopos antigénicos, más preferentemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende (al menos) dos o tres antígenos o epítopos antigénicos, incluso más preferentemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende (al menos) cuatro o cinco antígenos o epítopos antigénicos.

20 Si más de un antígeno o epítopo antigénico está comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención se entiende que dicho antígeno o epítopo antigénico en particular también está unido covalentemente en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, a otro antígeno o epítopo antigénico y/o a un componente a), es decir, un péptido de penetración celular y/o a un componente c), es decir, un agonista peptídico de TLR.

25 Los diversos antígenos o epítopos antigénicos comprendidos por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítopo de ASCL2, pueden ser iguales o diferentes. Preferentemente, los diversos antígenos o epítopos antigénicos comprendidos por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención son diferentes entre sí, proporcionando de esta manera un complejo multiantigénico y/o multiepitópico.

30 Por otra parte, se prefiere que más de un antígeno o epítopo antigénico, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más antígenos o epítopos antigénicos, se coloquen consecutivamente en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. Esto significa en particular que todos los antígenos y/o epítopos antigénicos que componen el complejo están dispuestos en un tramo, que no se interrumpe por el componente a), es decir, un péptido de penetración celular, ni por el componente c), es decir, un agonista peptídico de TLR. Más bien, el componente a) y el componente c) están situados en el complejo, por ejemplo, antes o después de tal tramo de todos los antígenos y/o epítopos antigénicos. Sin embargo, los antígenos y/o epítopos antigénicos colocados consecutivamente de tal manera pueden unirse entre sí, por ejemplo, mediante un espaciador o un enlazador como se describe a continuación, que no es ni el componente a), es decir, un péptido de penetración celular, ni el componente c), es decir, un agonista peptídico de TLR.

45 Por otra parte, también se prefiere que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítopo de ASCL2, comprenda uno o más epítopos de un antígeno. En consecuencia, el complejo comprende preferentemente uno o más epítopos de uno o más antígenos. Por ejemplo, el complejo puede comprender uno o más epítopos de un primer antígeno y uno o más epítopos de un segundo antígeno; o el complejo puede comprender uno o más epítopos de un primer antígeno, uno o más epítopos de un segundo antígeno y uno o más epítopos de un tercer antígeno; o el complejo puede comprender uno o más epítopos de un primer antígeno, uno o más epítopos de un segundo antígeno, uno o más epítopos de un tercer antígeno y uno o más epítopos de un cuarto antígeno; y así sucesivamente. En una realización preferida, el complejo comprende más de un epítopo de uno o más antígenos; más preferentemente los epítopos antigénicos del mismo antígeno se colocan consecutivamente (o superpuestos) en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. Esto significa en particular que todos los epítopos antigénicos del mismo antígeno comprendido por el complejo están dispuestos en un tramo, que no se interrumpe por el componente a), es decir, un péptido de penetración celular, ni por el componente c), es decir, un agonista peptídico de TLR, ni por ningún otro epítopo antigénico (es decir, epítopos de otro antígeno).

55 Como alternativa, sin embargo, los diversos antígenos y/o epítopos antigénicos también pueden colocarse de cualquier otra manera en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, con el componente a) y/o el componente c) colocado entre dos o más antígenos y/o epítopos antigénicos, es decir, con uno o más antígenos y/o epítopos antigénicos colocados entre el componente a) y el componente c) (o viceversa) y, opcionalmente, uno o más antígenos y/o epítopos antigénicos situados en el otro extremo respectivo del componente a) y/o del componente c).

65 Se entiende que varios antígenos o epítopos antigénicos diferentes relacionados con el cáncer colorrectal pueden estar comprendidos ventajosamente en un único complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. Como alternativa, un número de antígenos o epítopos antigénicos diferentes relacionados con el cáncer colorrectal pueden distribuirse en subconjuntos de antígenos o epítopos antigénicos diferentes, en particular subconjuntos que se

complementan entre sí en el contexto del cáncer colorrectal y que están compuestos por diferentes complejos de acuerdo con la presente invención, por lo que dichos complejos diferentes que comprenden diferentes subconjuntos pueden administrarse ventajosamente de forma simultánea, por ejemplo, en una sola vacuna, a un sujeto que lo necesita.

Preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende al menos un epítipo tumoral, que es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, CEA, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART e IL13Ralfa2. Más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende al menos un epítipo tumoral, que es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, CEA, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART e IL13Ralfa2. Esos antígenos son particularmente útiles en el contexto del cáncer colorrectal. También se prefiere que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprenda al menos un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, CEA, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART e IL13Ralfa2, o un fragmento de los mismos, o una variante de secuencia de un antígeno tumoral o una variante de secuencia de un fragmento del mismo. También se prefiere que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprenda al menos un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, CEA, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART e IL13Ralfa2, o un fragmento de los mismos, o una variante de secuencia de un antígeno tumoral o una variante de secuencia de un fragmento del mismo. Como se usa en el presente documento, un "fragmento" de un antígeno comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos del antígeno, preferentemente al menos 15 aminoácidos consecutivos del antígeno, más preferentemente al menos 20 aminoácidos consecutivos del antígeno, incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos consecutivos del antígeno y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos consecutivos del antígeno. Una "variante de secuencia" es como se define anteriormente, más específicamente, una variante de secuencia tiene una secuencia (de aminoácidos) que es al menos del 70 %, preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % idéntica a la secuencia de referencia. Una variante de secuencia "funcional" significa en el contexto de un antígeno/fragmento de antígeno/epítipo, que la función del epítipo o epítopos, por ejemplo, comprendida por el antígeno (fragmento), no se ve perjudicada ni suprimida. Preferentemente, sin embargo, la secuencia de aminoácidos del epítipo o epítopos, por ejemplo, comprendida por el antígeno (fragmento) de cáncer/tumoral como se describe en el presente documento, no está mutada y, por lo tanto, es idéntica a la secuencia del epítipo de referencia.

Como se ha descrito anteriormente, los epítopos de cáncer/tumor adecuados de esos antígenos se conocen a partir de la bibliografía o pueden identificarse usando bases de datos de epítopos de cáncer/tumor, por ejemplo, de van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immunol 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, en donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por los linfocitos T CD4+ o CD8+ se clasifican en cuatro grupos principales en función de su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (TANTIGEN versión 1.0, 1 de dic de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

EpCAM

Ep-Cam es una glucoproteína que media la adhesión celular. La secuencia de aminoácidos de EpCAM se muestra a continuación:

```

MAPPPQVLAFCLLAAATATFAAAQEECVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKL
AAKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNNDCGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNT

AGVRRTDKDTETCSERVRTYWIIEELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENN
VITIDL VQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSSKKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYV
DEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVISRKKRMAYEKAIEKEMGEMHRELNA
[SEQ ID NO: 47]

```

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 47 o un fragmento o una variante de la misma como se describe en el presente documento.

El experto en la materia conoce varios epítomos de EpCAM. Un epítomo de EpCAM preferido, que está preferentemente comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítomo de ASCL2, incluye el siguiente epítomo (la secuencia del epítomo que se muestra a continuación es un fragmento de la secuencia de EpCAM anterior y, por lo tanto, se muestra en la secuencia EpCAM anterior subrayada; la siguiente secuencia de epítomos puede referirse a un epítomo o más de un epítomo (superpuesto):

GLKAGVIAV

[SEQ ID NO: 48]

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítomo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 48 o un fragmento o una variante de la misma como se describe en el presente documento.

HER-2/neu

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

MELAAALCRWGULLALLPPGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMRLHLYQCCQVVGQNL
 LTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNNQVRQVPLQRLRIVRGTTQLFEDNYALAVLDNGDPLN
 NTTPVTGASPCGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTUIDTNR
 SRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGCCARCKGPIPTDCCHIEQCAAGCTGPKH
 SDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTYFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTL
 VCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFAGCKKIFGSLAF
 LPESFDCGPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAY
 SLTLQCLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDEC
 VGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVFECEVLQGLPREYVNRHCLPCH
 PECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFECVARCPSCGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQP
 CPINCTHSCVDLDDKGCPEAEQASPLTSHSAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLL
 QETELVEPLTPSGAMPNQAAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVL
 ENTSPKANKEILDEAYVMAGVCSPIVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGS
 QDLLNWCMIKAGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEHAD
 CGKVPIKWMALLESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQ
 PPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSFSSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSL
 LEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGCDLTLGLEPSEEE
 APRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPLOQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLT
 CSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLPKNGVVKDVFAGGAVENPE
 YLTPQGGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVVPV

[SEQ ID NO: 70]

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítomo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 70 o un fragmento o una variante de la misma como se describe en el presente documento. Como se ha descrito anteriormente, los epítomos de cáncer/tumor adecuados de Her-2 se conocen a partir de la bibliografía o pueden identificarse usando bases de datos de epítomos de cáncer/tumor, por ejemplo, de van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den

Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>, en donde los antígenos tumorales humanos reconocidos por los linfocitos T CD4+ o CD8+ se clasifican en cuatro grupos principales en función de su patrón de expresión, o de la base de datos "Tantigen" (TANTIGEN versión 1.0, 1 de dic de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

Mucina-1 (MUC-1)

MUC-1 es una mucina epitelial humana, que actúa sobre la adhesión celular. La secuencia de aminoácidos de MUC-1 se muestra a continuación:

MTPGTQSPFFLLLLLVLTIVVTGSGHASSTPGCEKETSATQRSSVPSSSTEKNVSMSSVLSSHSP
GSGSSTTQCQDVT LAPATEPASGSAATWGCQDVTSPVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAP
GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST
APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH
GVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV
SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAP
DTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTR
PAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP
GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST
APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH
GVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGV
SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAP
DTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNR
PALGSTAPPVHNVTASGASGASSTLVHNGTSARATTTASKSTPFSIPSHISDTPPTLASHSTK
TDASSTHHSSVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSDYYQELQRDISEMFL
QIYKQCGFLCLSNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVS
DVPFPTSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLALAVCQCRRKNYQQLDIIPARDTYHP
MSEYPTYHTHGRYVPPSSSTRSPYEKVSAGNGCGSSLSYTNPAVAATSANL
[SEQ ID NO: 49]

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 49 o un fragmento o una variante de la misma como se describe en el presente documento.

El experto en la materia conoce varios epítipos de MUC-1. Los epítipos MUC-1 preferidos, que están preferentemente comprendidos por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, incluyen los siguientes epítipos (las secuencias de epítipos que se muestran a continuación son fragmentos de la secuencia MUC-1 anterior y, por lo tanto, se muestra en la secuencia MUC-1 anterior subrayada; cada una de las siguientes secuencias de epítipos puede referirse a un epítipo o más de un epítipo (superpuesto):

GSTAPPVHN
[SEQ ID NO: 50]
TAPPAHGVTS
[SEQ ID NO: 51]

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 50 y/o una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 51.

TOMM34

TOMM34 está implicado en la importación de proteínas precursoras a las mitocondrias. Muchos epítomos del mismo son conocidos por la persona experta.

RNF 43

RNF43 es una ubiquitina ligasa E3 de tipo RING y se predice que contenga un dominio transmembrana, un dominio asociado a proteasa, un ectodominio y un dominio RING citoplasmático. Se cree que RNF43 regula negativamente la señalización Wnt y la expresión de RNF43 da como resultado un aumento en la ubiquitinación de los receptores encrespados, una alteración en su distribución subcelular, lo que resulta en niveles reducidos en la superficie de estos receptores. Muchos epítomos del mismo son conocidos por la persona experta.

KOC1

KOC1, también conocida como proteína 3 de unión a ARNm del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2BP3), es una proteína de unión a ARNm. Sin embargo, no hay datos de expresión disponibles.

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)/Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), originalmente conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF), es una proteína señal producida por las células que estimula la vasculogénesis y la angiogénesis. Es parte del sistema que restablece el suministro de oxígeno a los tejidos cuando la circulación sanguínea es inadecuada. La función normal del VEGF es crear nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario, nuevos vasos sanguíneos después de una lesión, músculo después del ejercicio y nuevos vasos (circulación colateral) para evitar los vasos bloqueados. Hay tres subtipos principales de receptores de VEGF (VEGFR), en concreto VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3.

Subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (βHCG)

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona producida por el embrión después de la implantación. Algunos tumores cancerosos producen esta hormona; por lo tanto, los niveles elevados medidos cuando la paciente no está embarazada pueden conducir a un diagnóstico de cáncer. La hCG es heterodimérica con una subunidad α (alfa) idéntica a la de la hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y subunidad β (beta) que es exclusiva de la hCG. La subunidad β de la gonadotropina hCG (beta-hCG) contiene 145 aminoácidos y está codificada por seis genes altamente homólogos.

Survivina

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

```
MCAPTLPFAWQPFLLKDHRISTFKNWPFLEGCCTPERMAEAGFHCPTENEPDLAQCFKEL
EGWEPDDDDPIEFHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTIGFELDRERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKK
VRRALFQLAAMD
[SEQ ID NO: 52]
```

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítomo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52 o un fragmento o una variante de la misma como se describe en el presente documento.

El experto en la materia conoce varios epítomos de survivina. Un epítomo de survivina preferido, que está preferentemente comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, incluye el siguiente epítomo (la secuencia del epítomo que se muestra a continuación es un fragmento de la secuencia de survivina anterior y, por lo tanto, se muestra en la secuencia de survivina anterior subrayada; la siguiente secuencia de epítomos puede referirse a un epítomo o más de un epítomo (superpuesto):

```
RISTFKNWPF
[SEQ ID NO: 53]
```

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítomo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 53.

En consecuencia, se prefiere que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende un epítipo de survivina. Más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos (preferentemente al menos 15 aminoácidos, más preferentemente al menos 20 aminoácidos, incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos), o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia). Aún más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 53. Lo más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia).

Antígeno carcinoembrionario (CEA)

El CEA es una glucoproteína de adhesión intracelular. El CEA normalmente se produce en el tejido gastrointestinal durante el desarrollo fetal, pero la producción se detiene antes del nacimiento. Por lo tanto, el CEA está normalmente presente solo en niveles muy bajos en la sangre de adultos sanos. La secuencia de aminoácidos de CEA se muestra a continuación:

```
MESPSAPPHRWCI PWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTISTPFNVAEGKEVLLLVHNL PQHLFGY
SWYKGERVDGNRQIHGYVIGTQQATPGPAYSCREIHPNASLLIQNIIQN DTCFYTLHVIKSDLV
NEEATGQFRVYPPEPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLS
NGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSC
HAASNPPAQYSWFVNGTFQQTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTITVTITVYAEF
PKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLISVTRN
DVGPEYECGIONKLSVDHSDPVILNVLYGPDPTISPSYTYRPGVNL SLSCHAASNPPAQYSW
LIDGNIQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVED
KDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNCQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNS
VSANRSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSQYSWRINGIPQQTQVL
FIKITPNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPLSAGATVGIMIGVLVGVAL
```

[SEQ ID NO: 54]

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 54 o un fragmento o una variante de la misma como se describe en el presente documento.

El experto en la materia conoce varios epítopos de CEA. Los epítopos de CEA preferidos, que están preferentemente comprendidos por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, incluyen los siguientes epítopos (las secuencias de epítopos que se muestran a continuación son fragmentos de la secuencia de CEA anterior y, por lo tanto, se muestra en la secuencia de CEA anterior subrayada; cada una de las siguientes secuencias de epítopos puede referirse a un epítipo o más de un epítipo (superpuesto):

YLSGANLNL
[SEQ ID NO: 55]

SWRINGIPQQ
[SEQ ID NO: 56]

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 56.

En consecuencia, se prefiere que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende un epítipo de CEA. Más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 54, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos (preferentemente al menos 15 aminoácidos, más preferentemente al menos 20 aminoácidos, incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos), o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia). Aún más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 56. Lo más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 96 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia).

Receptor beta 2 del factor de crecimiento transformante (TGFβR2)

Los receptores de TGFβ son receptores de serina/treonina quinasa de paso único. Existen en varias isoformas diferentes. TGFβR2 es una proteína transmembrana que tiene un dominio de proteína quinasa, forma un complejo heterodimérico con otra proteína receptora y se une al TGF-beta. Este complejo receptor/ligando fosforila proteínas, que después ingresan al núcleo y regulan la transcripción de un subconjunto de genes relacionados con la proliferación celular.

P53

P53 es una proteína supresora de tumores que tiene un papel en la prevención de la mutación del genoma. P53 tiene muchos mecanismos de función anticancerígena y desempeña un papel en apoptosis, estabilidad genómica e inhibición de la angiogénesis. En su papel anticancerígeno, p53 funciona a través de varios mecanismos: activa las proteínas reparadoras del ADN cuando el ADN ha sufrido daños; puede detener el crecimiento manteniendo el ciclo celular en el punto de regulación G1/S en el reconocimiento de daños en el ADN; y puede iniciar la apoptosis.

Kirsten Ras (KRas)

GTPasa KRas también conocida como homólogo del oncogén vírico del sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2 y KRAS, realiza una función esencial en la señalización del tejido normal y la mutación de un gen KRAS es una etapa esencial en el desarrollo de muchos cánceres. Como otros miembros de la subfamilia ras, la proteína KRAS es una GTPasa y es una de las primeras en muchas rutas de transducción de señales. KRAS suele estar unido a las membranas celulares debido a la presencia de un grupo isopreno en su extremo C. La secuencia de aminoácidos de KRas se muestra a continuación:

```
MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQNIHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDITAGQEEY
SAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKDSSEVPMVLVGNKKCDLPSRTVD
TKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQRVEDAFYTLVREIRQYRLKKISKEEKTPGCVKIKKCIIM
[SEQ ID NO: 57]
```

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 57 o un fragmento o una variante de la misma como se describe en el presente documento.

El experto en la materia conoce varios epítipos de Kirsten Ras. Un epítipo preferido de Kirsten Ras, que está preferentemente comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, incluye el siguiente epítipo (la secuencia del epítipo que se muestra a continuación es un fragmento de la secuencia de Kirsten Ras anterior y, por lo tanto, se muestra en la secuencia de Kirsten Ras anterior subrayada; la siguiente secuencia de epítipos puede referirse a un epítipo o más de un epítipo (superpuesto):

```
VVVGAGGVG
[SEQ ID NO: 58]
```

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 58.

N-acetilglucosamina unida a O (GlcNAc) transferasa (OGT)

OGT (N-acetilglucosamina (GlcNAc) unida a O transferasa, O-GlcNAc transferasa, OGTasa, N-acetilglucosaminiltransferasa unida a O, uridina difosfo-N-acetilglucosamina:polipéptido beta-N-acetilglucosaminiltransferasa, proteína beta-N-acetilglucosamina unida a O transferasa) es una enzima con el nombre del sistema UDP-N-acetil-D-glucosamina:proteína-O-beta-N-acetil-D-glucosaminil transferasa) es una enzima con el nombre del sistema "UDP -N-acetil-D-glucosamina:proteína-O-beta-N-acetil-D-glucosaminil transferasa". La OGT cataliza la adición de una única N-acetilglucosamina en un enlace O-glucosídico a restos de serina o treonina de proteínas intracelulares. OGT es parte de una serie de funciones biológicas dentro del cuerpo humano. OGT está implicada en la resistencia a la insulina en células musculares y adipocitos al inhibir la fosforilación de Treonina 308 de AKTT, aumentar la tasa de fosforilación de IRS1 (en Serina 307 y Serina 632/635), reducir la señalización de la insulina y glucosilar los componentes de las señales de la insulina. Adicionalmente, OGT cataliza la glucosilación intracelular de restos de serina y treonina con la adición de N-acetilglucosamina. Los estudios muestran que los alelos de OGT son vitales para la embriogénesis y que la OGT es necesaria para la glucosilación intracelular y la vitalidad de las células madre embrionarias. OGT también cataliza la modificación postraduccional que modifica los factores de transcripción y la ARN polimerasa II, sin embargo, se desconoce en gran medida la función específica de esta modificación.

Caspasa 5 (CASPS)

La caspasa 5 es una enzima que escinde proteolíticamente otras proteínas en un resto de ácido aspártico y pertenece a una familia de cisteína proteasas llamadas caspasas. Es una caspasa inflamatoria, junto con caspasa 1, caspasa 4 y la caspasa 11 homóloga de caspasa 4 murina y tiene un papel en el sistema inmunitario.

Antígeno 1 asociado a tumor colorrectal (COA-1)

COA-1 se identificó en 2003 por Maccalli *et al.* (Maccalli, C., *et al.*, Identification of a colorectal tumor-associated antigen (COA-1) recognized by CD4(+) T lymphocytes. Cancer Res, 2003. 63(20): p. 6735-43) expresado fuertemente por células colorrectales y de melanoma (no hay datos disponibles). Su mutación puede interferir con el reconocimiento diferencial de células tumorales y normales.

Antígeno asociado a melanoma (MAGE)

Los miembros de mamíferos de la familia de genes MAGE (antígeno asociado al melanoma) se describieron originalmente como completamente silenciosos en los tejidos adultos normales, con excepción de las células germinales masculinas y, para algunos de ellos, placenta. Por el contrario, estos genes se expresaron en diversas clases de tumores. Por lo tanto, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente un antígeno de la familia MAGE (un antígeno "MAGE") o un epítipo del mismo. De la familia MAGE, en particular se prefieren MAGE-A3 y MAGE-D4, y se prefiere particularmente MAGE-A3. Se desconoce la función normal de MAGE-A3 en células sanas. MAGE-A3 es una proteína específica de tumores y se ha identificado en muchos tumores. La secuencia de aminoácidos de MAGE-A3 se muestra a continuación:

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 59.

El experto en la materia conoce varios epítopos de MAGE-A3. Un epítipo MAGE-A3 preferido, que está preferentemente comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, incluye el siguiente epítipo (la secuencia del epítipo que se muestra a continuación es un fragmento de la secuencia de MAGE-A3 anterior y, por lo tanto, se muestra en la secuencia MAGE-A3 anterior subrayada; la siguiente secuencia de epítopos puede referirse a un epítipo o más de un epítipo (superpuesto):

KVAfLVHFL
[SEQ ID NO: 60]

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo

comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 60.

Antígeno del carcinoma de células escamosas reconocido por los linfocitos T (SART)

- 5 Dentro de la familia SART, SART-3 es el más preferido. Por lo tanto, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende preferentemente un antígeno de la familia SART (un antígeno "SART") o un epítipo del mismo; el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende más preferentemente SART-3 o un epítipo del mismo. El antígeno del carcinoma de células escamosas reconocido por los linfocitos T 3 posee epítopos tumorales capaces de inducir linfocitos T citotóxicos
- 10 específicos de tumores y restringidos a HLA-A24 en pacientes con cáncer. Se cree que SART-3 participa en la regulación del corte y empalme del ARNm.

IL13Ralpha2

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

- 20 En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 61 o un fragmento o una variante de la misma como se describe en el presente documento.

- 25 El experto en la materia conoce varios epítopos de IL13Ralpha2. Un epítipo IL13Ralpha2 preferido, que está preferentemente comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, incluye el siguiente epítipo (la secuencia del epítipo que se muestra a continuación es un fragmento de la secuencia de IL13Ralpha2 anterior y, por lo tanto, se muestra en la secuencia IL13Ralpha2 anterior subrayada; la siguiente secuencia de epítopos puede referirse a un epítipo o más de un epítipo (superpuesto):

30 LPFGFIL

[SEQ ID NO: 62]

- 35 En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 62.

ASCL2 (homólogo 2 de Achaete-scute)

- 40 ASCL2 es un factor de transcripción básico de hélice-bucle-hélice esencial para el mantenimiento de los trofoblastos en proliferación durante el desarrollo placentario. Se descubrió que ASCL2 es un supuesto regulador de la proliferación que se sobreexpresa en la neoplasia intestinal. La secuencia de aminoácidos de ASCL2 se muestra a continuación:

MDGGTLPRSAAPPAPFPVVGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAETCGGAAAVARRNERERNRV
 KLVNLGFQALRQHVPFHGGASKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAHDAVRNALACGLRPQAVR
 PSAPRGPPGTTTPVAASPSRASSSPGRGSGSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELDESSWLG
 CY

[SEQ ID NO: 92]

- 45 En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo

comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 92 o un fragmento o una variante de la misma como se describe en el presente documento.

El experto en la materia conoce varios epítipos de ASCL2. Los epítipos ASCL2 preferidos, que están preferentemente comprendidos por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, incluyen los siguientes epítipos (las secuencias de epítipos que se muestran a continuación son fragmentos de la secuencia ASCL2 anterior y, por lo tanto, se muestra en la secuencia ASCL2 anterior subrayada; cada una de las siguientes secuencias de epítipos puede referirse a un epítipo o más de un epítipo (superpuesto):

SAVEYIRALQ
[SEQ ID NO: 93]

ERELDFSSW
[SEQ ID NO: 94]

En consecuencia, un complejo preferido para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 94.

En consecuencia, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende un epítipo de ASCL2. Preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 92, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos (preferentemente al menos 15 aminoácidos, más preferentemente al menos 20 aminoácidos, incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos), o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia). Más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 94. Lo más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 97 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia).

Preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende al menos un epítipo tumoral, que es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, MUC-1, survivina, CEA, KRas, MAGE-A3 e IL13Ralfa2, tal como un epítipo de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO 48, 50, 51, 53, 55, 56, 58, 60 y 62; preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende al menos un epítipo tumoral, que es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, MUC-1, survivina, CEA, KRas, MAGE-A3 e IL13Ralfa2, tal como un epítipo de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO 48, 50, 51, 53, 55, 56, 58, 60, 62, 93 y 94; más preferentemente el al menos un epítipo tumoral es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, MUC-1, survivina, CEA, KRas y MAGE-A3, tal como un epítipo de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO 48, 50, 51, 53, 55, 56, 58 y 60; más preferentemente el al menos un epítipo tumoral es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, MUC-1, survivina, CEA, KRas y MAGE-A3, tal como un epítipo de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO 48, 50, 51, 53, 55, 56, 58, 60, 93 y 94; incluso más preferentemente el al menos un epítipo tumoral es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, MUC-1, survivina y CEA, tal como un epítipo de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO 48, 50, 51, 53, 55 y 56; incluso preferentemente el al menos un epítipo tumoral es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, MUC-1, survivina y CEA, tal como un epítipo de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO 48, 50, 51, 53, 55, 56, 93 y 94; y lo más preferentemente el al menos un epítipo tumoral es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, survivina y CEA, tal como un epítipo de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO 48, 53, 55, 56, 93 y 94.

También se prefiere que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, comprende

- i) uno o más epítipos de EpCAM (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo;
- ii) uno o más epítipos de MUC-1 (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 50 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 51) o variantes de secuencia funcional de los mismos;
- iii) uno o más epítipos de survivina (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo;
- iv) uno o más epítipos de CEA (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos;

- v) uno o más epítomos de KRas (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 58) o variantes de secuencia funcional del mismo; y/o
- vi) uno o más epítomos de MAGE-A3 (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 60) o variantes de secuencia funcional del mismo.

5 También se prefiere que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítomo de ASCL2, comprende

- vii) uno o más epítomos de EpCAM (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo;
- viii) uno o más epítomos de MUC-1 (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 50 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 51) o variantes de secuencia funcional de los mismos;
- ix) uno o más epítomos de survivina (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo;
- x) uno o más epítomos de CEA (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos;
- xi) uno o más epítomos de KRas (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 58) o variantes de secuencia funcional del mismo; y/o
- xii) uno o más epítomos de MAGE-A3 (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 60) o variantes de secuencia funcional del mismo.

El complejo de acuerdo con la invención comprende uno o más epítomos de ASCL2 (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 94) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

25 Como se ha descrito anteriormente, los epítomos adicionales de esos antígenos (además de los epítomos ejemplificados) pueden recuperarse fácilmente de bases de datos de epítomos de cáncer/tumores, por ejemplo, de van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immunol 2013; URL: <http://www.cancerimmunity.org/peptide/> o de la base de datos "Tantigen" (TANTIGEN versión 1.0, 1 de dic de 2009; desarrollado por Bioinformatics Core en Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute; URL: <http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/>).

Una "variante de secuencia" es como se define anteriormente, más específicamente, una variante de secuencia tiene una secuencia (de aminoácidos) que es al menos del 70 %, al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % idéntica a la secuencia de referencia. Una variante de secuencia "funcional" significa en el contexto de un epítomo, que la función como epítomo no se vea perjudicada o suprimida. Preferentemente, sin embargo, la secuencia de aminoácidos de un epítomo de un antígeno de cáncer/tumoral como se describe en el presente documento no está mutada y, por lo tanto, es idéntica a la secuencia del epítomo de referencia.

40 También se prefiere que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítomo de ASCL2, comprende

- un fragmento de EpCAM que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
- 45 - un fragmento de MUC-1 que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
- un fragmento de survivina que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
- un fragmento de CEA que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
- un fragmento de KRas que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
- 50 y/o
- un fragmento de MAGE-A3 que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos.

55 También se prefiere que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el complejo comprende un epítomo de ASCL2, comprende

- un fragmento de EpCAM que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
- un fragmento de MUC-1 que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
- un fragmento de survivina que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
- 60 - un fragmento de CEA que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
- un fragmento de KRas que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos;
- y/o
- un fragmento de MAGE-A3 que comprende uno o más epítomos o una variante de secuencia funcional de los mismos.
- 65

El complejo de acuerdo con la invención comprende un fragmento de ASCL2 que comprende uno o más epítopos o una variante de secuencia funcional del mismo.

Como se usa en el presente documento, un "fragmento" de un antígeno comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos del antígeno, preferentemente al menos 15 aminoácidos consecutivos del antígeno, más preferentemente al menos 20 aminoácidos consecutivos del antígeno, incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos consecutivos del antígeno y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos consecutivos del antígeno. En consecuencia, un fragmento de EpCAM comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de EpCAM (SEQ ID NO: 47), preferentemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de EpCAM (SEQ ID NO: 47), más preferentemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de EpCAM (SEQ ID NO: 47), incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de EpCAM (SEQ ID NO: 47) y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos consecutivos de EpCAM (SEQ ID NO: 47); un fragmento de MUC-1 comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de MUC-1 (SEQ ID NO: 49), preferentemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de MUC-1 (SEQ ID NO: 49), más preferentemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de MUC-1 (SEQ ID NO: 49), incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de MUC-1 (SEQ ID NO: 49) y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos consecutivos de MUC-1 (SEQ ID NO: 49); un fragmento de survivina comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de survivina (SEQ ID NO: 52), preferentemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de survivina (SEQ ID NO: 52), más preferentemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de survivina (SEQ ID NO: 52), incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de survivina (SEQ ID NO: 52) y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos consecutivos de survivina (SEQ ID NO: 52); un fragmento de CEA comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de CEA (SEQ ID NO: 54), preferentemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de CEA (SEQ ID NO: 54), más preferentemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de CEA (SEQ ID NO: 54), incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de CEA (SEQ ID NO: 54) y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos consecutivos de CEA (SEQ ID NO: 54); un fragmento de KRas comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de KRas (SEQ ID NO: 57), preferentemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de KRas (SEQ ID NO: 57), más preferentemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de KRas (SEQ ID NO: 57), incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de KRas (SEQ ID NO: 57) y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos consecutivos de KRas (SEQ ID NO: 57); y un fragmento de MAGE-A3 comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de MAGE-A3 (SEQ ID NO: 59), preferentemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de MAGE-A3 (SEQ ID NO: 59), más preferentemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de MAGE-A3 (SEQ ID NO: 59), incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de MAGE-A3 (SEQ ID NO: 59) y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos consecutivos de MAGE-A3 (SEQ ID NO: 59). Por otra parte, un fragmento de ASCL2 comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de ASCL2 (SEQ ID NO: 92), preferentemente al menos 15 aminoácidos consecutivos de ASCL2 (SEQ ID NO: 92), más preferentemente al menos 20 aminoácidos consecutivos de ASCL2 (SEQ ID NO: 92), incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos consecutivos de ASCL2 (SEQ ID NO: 92) y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos consecutivos de ASCL2 (SEQ ID NO: 92).

Una variante de secuencia funcional de un fragmento tal tiene una secuencia (de aminoácidos), que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 99 % idéntica a la secuencia de referencia y la función epítipo de al menos uno, preferentemente todos, el epítipo o epítopos comprendidos por el fragmento se mantiene.

Preferentemente, un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también puede comprender

xiii) uno o más epítopos de EpCAM (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo;

xiv) uno o más epítopos de CEA (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos; y

xv) uno o más epítopos de MAGE-A3 (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 60) o variantes de secuencia funcional del mismo.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, PHCG, survivina, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, SART o IL13Ralfa2. Más preferentemente, un complejo tal no comprende ningún epítipo de HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, PHCG, survivina, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, SART o IL13Ralfa2.

También se prefiere que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también pueda comprender

xvi) uno o más epítopos de EpCAM (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo;

xvii) uno o más epítopos de MUC-1 (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 50 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 51) o variantes de secuencia funcional de los mismos;

xviii) uno o más epítopos de CEA (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítipo de acuerdo

con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos; y
 xix) uno o más epítomos de MAGE-A3 (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 60) o variantes de secuencia funcional del mismo.

5 Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítomo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, SART o IL13Ralfa2. Más preferentemente, un complejo tal no comprende ningún epítomo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, SART o IL13Ralfa2.

10 También se prefiere que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también pueda comprender

xx) uno o más epítomos de EpCAM (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo;

15 xxi) uno o más epítomos de MUC-1 (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 50 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 51) o variantes de secuencia funcional de los mismos;

xxii) uno o más epítomos de CEA (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos; y

xxiii) uno o más epítomos de KRas (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 58) o variantes de secuencia funcional del mismo.

20 Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítomo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, TGF β R2, p53, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2. Más preferentemente, un complejo tal no comprende ningún epítomo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, TGF β R2, p53, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

25 También se prefiere que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también pueda comprender

xxiv) uno o más epítomos de EpCAM (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo;

30 xxv) uno o más epítomos de survivina (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo;

xxvi) uno o más epítomos de CEA (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos; y

35 xxvii) uno o más epítomos de MAGE-A3 (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 60) o variantes de secuencia funcional del mismo.

40 Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítomo de HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, SART o IL13Ralfa2. Más preferentemente, un complejo tal no comprende ningún epítomo de HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, SART o IL 13Ralfa2.

También se prefiere que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también pueda comprender

45 xxviii) uno o más epítomos de MUC-1 (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 50 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 51) o variantes de secuencia funcional de los mismos;

xxix) uno o más epítomos de survivina (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo; y

xxx) uno o más epítomos de MAGE-A3 (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 60) o variantes de secuencia funcional del mismo.

50 Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítomo de EpCAM, HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, PHCG, CEA, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, SART o IL13Ralfa2. Más preferentemente, un complejo tal no comprende ningún epítomo de EpCAM, HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, CEA, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, SART o IL 13Ralfa2.

55 Más preferentemente, un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también puede comprender

xxxi) uno o más epítomos de EpCAM (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo;

60 xxxii) uno o más epítomos de MUC-1 (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 50 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 51) o variantes de secuencia funcional de los mismos;

xxxiii) uno o más epítomos de survivina (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo; y/o

65 xxxiv) uno o más epítomos de CEA (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, PHCG, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2. Más preferentemente, un complejo tal no comprende ningún epítipo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, βhCG, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

5 Más preferentemente, un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también puede comprender uno o más epítipos de ASCL2 (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 94) o variantes de secuencia funcional de los mismos y, además,

10 xxxv) uno o más epítipos de EpCAM (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo;
xxxvi) uno o más epítipos de MUC-1 (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 50 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 51) o variantes de secuencia funcional de los mismos;
15 xxxvii) uno o más epítipos de survivina (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo;
; y/o
xxxviii) uno o más epítipos de CEA (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

20 Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, βhCG, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

Más preferentemente, un complejo tal como se define en la reivindicación 1 comprende uno o más epítipos de ASCL2 (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 94) o variantes de secuencia funcional de los mismos; y, además,

25 xxxix) uno o más epítipos de EpCAM (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo;
xl) uno o más epítipos de survivina (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo; y/o
30 xli) uno o más epítipos de CEA (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

35 Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, βhCG, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

En particular preferentemente, un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también puede comprender

40 xlii) uno o más epítipos de EpCAM (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo;
xliii) uno o más epítipos de MUC-1 (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 50 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 51) o variantes de secuencia funcional de los mismos;
xliv) uno o más epítipos de survivina (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo; y
45 xlv) uno o más epítipos de CEA (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

50 Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, βhCG, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2. Más preferentemente, un complejo tal no comprende ningún epítipo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, (3hCG, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

También se prefiere particularmente que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también pueda comprender

55 xlv) uno o más epítipos de CEA (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos;
xlvi) uno o más epítipos de survivina (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo;
60 xlviii) uno o más epítipos de EpCAM (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo; y
xlix) uno o más epítipos de ASCL2 (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 94) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

65 Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, (3hCG, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

También se prefiere particularmente que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también pueda comprender

- 5 I) uno o más epítomos de EpCAM (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo;
- li) uno o más epítomos de MUC-1 (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 50 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 51) o variantes de secuencia funcional de los mismos; y
- 10 lii) uno o más epítomos de CEA (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítomo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, (3hCG, survivina, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2. Más preferentemente, un complejo tal no comprende ningún epítomo de HER-2, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, βhCG, survivina, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

También se prefiere particularmente que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 comprenda

- 20 liii) uno o más epítomos de CEA (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos;
- liv) uno o más epítomos de survivina (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo; y
- 25 lv) uno o más epítomos de ASCL2 (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 94) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítomo de HER-2, EpCAM, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, PHCG, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

Aún más preferentemente, el complejo como se define en la reivindicación 1 comprende en la dirección N-a C-terminal:

- 30 - uno o más epítomos de CEA (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos;
- uno o más epítomos de survivina (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo; y
- 35 - uno o más epítomos de ASCL2 (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 94) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítomo de HER-2, EpCAM, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, βhCG, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL 13Ralfa2

Aún más preferentemente, el complejo como se define en la reivindicación 1 comprende en la dirección N-a C-terminal:

- 45 i) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 54, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos (preferentemente al menos 15 aminoácidos, más preferentemente al menos 20 aminoácidos, incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos), o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia);
- 50 ii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos (preferentemente al menos 15 aminoácidos, más preferentemente al menos 20 aminoácidos, incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos), o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia); y
- 55 iii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 92, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos (preferentemente al menos 15 aminoácidos, más preferentemente al menos 20 aminoácidos, incluso más preferentemente al menos 25 aminoácidos y lo más preferentemente al menos 30 aminoácidos), o una variante de secuencia funcional de la misma que tenga al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia).
- 60

- 65 Un complejo tal preferentemente no comprende ningún antígeno adicional ni epítomos adicionales de antígenos distintos de CEA, survivina y ASCL2, más preferentemente un complejo tal no comprende ningún otro epítomo

(tumoral).

Preferentemente, en un complejo tal, el extremo C de (i) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 54 o el fragmento o variante del mismo está directamente enlazado al extremo N de (ii) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52 o el fragmento o variante del mismo; y el extremo C de (ii) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52 o el fragmento o variante del mismo está directamente enlazado al extremo N de (iii) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 92 o el fragmento o variante del mismo.

Todavía más preferentemente, el complejo como se define en la reivindicación 1 comprende en la dirección N-a C-terminal:

i) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 96 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia);

ii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia); y

iii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 97 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia).

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún antígeno adicional ni epítomos adicionales de antígenos distintos de CEA, survivina y ASCL2, más preferentemente un complejo tal no comprende ningún otro epítomo (tumoral).

Preferentemente, en un complejo tal, el extremo C de (i) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 96 o la variante del mismo está directamente enlazado al extremo N de (ii) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o la variante del mismo; y el extremo C de (ii) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o la variante del mismo está directamente enlazado al extremo N de (iii) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 97 o la variante del mismo.

Lo más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 98 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia). Un complejo tal preferentemente no comprende ningún antígeno adicional ni epítomos adicionales de antígenos distintos de CEA, survivina y ASCL2, más preferentemente un complejo tal no comprende ningún otro epítomo (tumoral).

También se prefiere particularmente que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también pueda comprender

- uno o más epítomos de EpCAM (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo; y
- uno o más epítomos de CEA (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítomo de HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, PHCG, survivina, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2. Más preferentemente, un complejo tal no comprende ningún epítomo de, HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, βhCG, survivina, TGFβR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

También se prefiere particularmente que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 comprenda

- uno o más epítomos de EpCAM (tal como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo; y
- uno o más epítomos de ASCL2 (tales como el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o el epítomo de acuerdo con SEQ ID NO: 94) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de HER-2, MUC-1, CEA, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL 13Ralfa2.

5 También se prefiere particularmente que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 comprenda

- uno o más epítipos de ASCL2 (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 94) o variantes de secuencia funcional de los mismos; y
- uno o más epítipos de CEA (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de HER-2, EpCAM, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL 13Ralfa2.

15 También se prefiere particularmente que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 comprenda

- uno o más epítipos de survivina (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo; y
- uno o más epítipos de ASCL2 (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 94) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de HER-2, MUC-1, EpCAM, CEA, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

25 También se prefiere particularmente que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también pueda comprender

- uno o más epítipos de survivina (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 53) o variantes de secuencia funcional del mismo; y
- uno o más epítipos de CEA (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de HER-2, EpCAM, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

35 También se prefiere particularmente que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también pueda comprender

- uno o más epítipos de EpCAM (tal como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 48) o variantes de secuencia funcional del mismo.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, CEA, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2. Más preferentemente, un complejo tal no comprende ningún epítipo de, HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, CEA, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

También se prefiere particularmente que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 también pueda comprender

- uno o más epítipos de CEA (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 56) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de EpCAM, HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, PHCG, survivina, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2. Más preferentemente, un complejo tal no comprende ningún epítipo de EpCAM, HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, TGF β R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

También se prefiere particularmente que un complejo tal como se define en la reivindicación 1 comprenda

- uno o más epítipos de ASCL2 (tales como el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o el epítipo de acuerdo con SEQ ID NO: 94) o variantes de secuencia funcional de los mismos.

Un complejo tal preferentemente no comprende ningún epítipo de EpCAM, HER-2, MUC-1, CEA, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, β hCG, survivina, TGF(3R2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART o IL13Ralfa2.

Componente c) - Agonista del péptido TLR

En el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, el agonista peptídico de TLR permite una mayor orientación de la vacuna hacia las células dendríticas junto con la autoayudancia. El enlace físico de un agonista peptídico de TLR al CPP y el al menos un antígeno o epítipo antigénico de acuerdo con la presente invención en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención proporciona una respuesta inmunitaria mejorada mediante la estimulación simultánea de células presentadoras de antígeno, en particular células dendríticas, que internalizan, metabolizan y muestran antígeno o antígenos.

Como se usa en el contexto de la presente invención, un "agonista peptídico de TLR" es un agonista de un receptor tipo Toll (TLR), es decir, se une a un TLR y activa el TLR, en particular para producir una respuesta biológica. Por otra parte, el agonista peptídico de TLR es un péptido, un polipéptido o una proteína como se definió anteriormente. Preferentemente, el agonista peptídico de TLR comprende de 10 a 150 aminoácidos, más preferentemente de 15 a 130 aminoácidos, aún más preferentemente de 20 a 120 aminoácidos, en particular preferentemente de 25 a 110 aminoácidos y lo más preferentemente de 30 a 100 aminoácidos.

Los receptores tipo Toll (TLR) son proteínas transmembrana que se caracterizan por dominios extracelulares, transmembrana y citosólicos. Los dominios extracelulares que contienen repeticiones ricas en leucina (LRR) con formas de herradura participan en el reconocimiento de patrones moleculares comunes derivados de diversos microbios. Los receptores tipo Toll incluyen TLR1 - 10. Los compuestos capaces de activar receptores TLR y sus modificaciones y derivados están bien documentados en la técnica. TLR1 puede activarse por lipoproteínas bacterianas y formas acetiladas de las mismas, TLR2 puede activarse además por glucolípidos bacterianos Grampositivos, LPS, LP A, LTA, fimbrias, proteínas de la membrana externa, proteínas de choque térmico de bacterias o del hospedador y lipoarabinomananos de micobacterias. TLR3 puede activarse por ARNbc, en particular de origen vírico, o por el compuesto químico poli(LC). TLR4 puede activarse por LPS Gramnegativo, LTA, Proteínas de choque térmico del hospedador o de origen bacteriano, proteínas de la cubierta o la envuelta vírica, taxol o derivados del mismo, hialuronano que contiene oligosacáridos y fibronectinas. TLR5 puede activarse con flagelos bacterianos o flagelina. TLR6 puede activarse por lipoproteínas de micobacterias y factor soluble termolábil de estreptococos del grupo B (GBS-F) o modulinas de estafilococos. TLR7 puede activarse por imidazoquinolinas. TLR9 puede activarse mediante ADN CpG no metilado o complejos de cromatina-IgG.

De acuerdo con la invención, el agonista peptídico de TLR comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un agonista de TLR, 2 y/o 4, y, opcionalmente, TLR1, 5, 6 y/o 10. Los TLR se expresan en la superficie celular (TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10) o en las membranas de orgánulos intracelulares, tales como endosomas (TLR3, 4, 7, 8 y 9). Los ligandos naturales de los receptores endosómicos resultaron ser moléculas basadas en ácidos nucleicos (excepto TLR4). Los TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10 expresados en la superficie celular reconocen patrones moleculares de microbios extracelulares (Monie, T. P., Bryant, C. E., *et al.* 2009: Activating immunity: Lessons from the TLRs and NLRs. Trends Biochem. Sci. 34(11), 553-561). Los TLR se expresan en varios tipos celulares pero prácticamente todos los TLR se expresan en DC permitiendo a estas células especializadas detectar todos los posibles patógenos y señales de peligro.

Sin embargo, TLR2, 4 y 5 se expresan constitutivamente en la superficie de las DC. El péptido agonista de TLR comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un péptido agonista de TLR2 y/o TLR4. En particular preferentemente, el agonista del péptido TLR es un agonista del péptido TLR4. Lo más preferentemente, el agonista del péptido TLR es un agonista del péptido TLR, que es tanto un agonista de TLR2 como un agonista de TLR4. TLR2 puede detectar una amplia diversidad de ligandos derivados de bacterias, virus, parásitos y hongos. La especificidad del ligando suele estar determinada por la interacción de TLR2 con otros TLR, tales como TLR1, 6 o 10, o moléculas no TLR, tales como dectina-1, CD14 o CD36. La formación de un heterodímero con TLR1 permite a TLR2 identificar triacil lipoproteínas o lipopéptidos de origen (mico)bacteriano, tales como Pam3CSK4 y peptidoglucano (PGA; Gay, N. J. y Gangloff, M. (2007): Structure and function of Toll receptors and their ligands. Annu. Rev. Biochem. 76, 141-165; Spohn, R., Buwitt-Beckmann, U., *et al.* (2004): Synthetic lipopeptide adjuvants and Toll-like receptor 2-Structure-activity relationships. Vaccine 22(19), 2494-2499). La heterodimerización de TLR2 y 6 permite la detección de diacil lipopéptidos y zimosano. El lipopolisacárido (LPS) y sus derivados son ligandos para TLR4 y la flagelina para TLR5 (Bryant, C. E., Spring, D. R., *et al.* (2010). The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. Nat. Rev. Microbiol. 8(1), 8-14).

TLR2 interactúa con una gama amplia y estructuralmente diversa de ligandos, incluyendo moléculas expresadas por microbios y hongos. Se han identificado múltiples agonistas de TLR2, incluyendo lipopéptidos naturales y sintéticos (por ejemplo, lipopéptido activador de macrófagos de *Mycoplasma fermentas* (MALP-2)), peptidoglucanos (PG tales como los de *S. aureus*), lipopolisacáridos de diversas cepas bacterianas (LPS), polisacáridos (por ejemplo, zimosano), estructuras ancladas a glucosilfosfatidilinositol de bacterias grampositivas (por ejemplo, ácido lipoteicoico (LTA) y lipoarabinomanano de micobacterias y lipomananos de *M. tuberculosis*). Determinados determinantes víricos también pueden desencadenarse a través de TLR2 (Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. Nat Immunol. 2009; 10(11):1200-7). Los lipopéptidos bacterianos son componentes estructurales de las paredes celulares. Consisten en un resto de s-glicerilcisteína acilado al que puede conjugarse un péptido a través del resto de cisteína. Los ejemplos de agonistas de TLR2, que son lipopéptidos bacterianos, incluyen MALP-2 y su análogo sintético dipalmitoil-S-gliceril

cisteína (Pam₂Cys) o tripalmitoil-S-gliceril cisteína (Pam₃Cis).

Una diversidad de ligandos interactúan con TLR4, incluyendo Monofosforil lípido A de *Salmonella minnesota* R595 (MPLA), lipopolisacáridos (LPS), mananos (*Candida albicans*), glucoinositolfosfolípidos (*Trypanosoma*), proteínas de la envuelta vírica (RSV y MMTV) y antígenos endógenos que incluyen fibrinógeno y proteínas de choque térmico. Tales agonistas de TLR4 se describen, por ejemplo, en Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 24 de feb; 2006: 124(4):783-801 o en Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. Biochem Biophys Res Commun. 30 de oct; 2009 388(4):621-5. LPS, que se encuentra en la membrana externa de las bacterias gramnegativas, es el más estudiado de los ligandos de TLR4. Los péptidos agonistas de TLR4 derivados de LPS adecuados se describen, por ejemplo, en el documento WO 2013/120073 (A1).

TLR5 se activa por una región de la molécula de flagelina expresada por casi todas las bacterias móviles. Por lo tanto, la flagelina, o péptidos o proteínas derivados de flagelina y/o variantes o fragmentos de flagelina también son adecuados como agonistas peptídicos de TLR que pueden estar comprendidos adicionalmente por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención.

Los ejemplos de agonistas peptídicos de TLR incluyen los agonistas lipopeptídicos de TLR2 MALP-2, Pam₂Cys y Pam₃Cys o modificaciones de los mismos, diferentes formas del agonista de TLR4 LPS, por ejemplo, L3-LPS de tipo silvestre de *N. meningitidis* y LpxL1-LPS pentaacilado mutante, y la flagelina agonista de TLR5.

Sin embargo, se prefiere que el agonista peptídico de TLR comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención no sea ni un lipopéptido ni una lipoproteína, ni un glucopéptido ni una glucoproteína, más preferentemente, el agonista peptídico de TLR comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un péptido, polipéptido o proteína clásicos como se definen en el presente documento.

Un agonista del péptido TLR2 preferido es la anexina II o un fragmento inmunomodulador de la misma, que se describe en detalle en el documento WO 2012/048190 A1 y la solicitud de patente de EE.UU. 13/0331546, en particular se prefiere un agonista peptídico de TLR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7 del documento WO 2012/048190 A1 o fragmentos o variantes de los mismos.

De esta manera, se prefiere particularmente como componente c) un agonista peptídico de TLR2 que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 15 o una variante de secuencia de la misma como se describió anteriormente, es decir, como el al menos un agonista peptídico de TLR, comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención.

STVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE
SEQ ID NO: 15 (agonista del péptido TLR2 Anaxa)

Una variante de secuencia funcional particularmente preferida del agonista peptídico de TLR de acuerdo con SEQ ID NO: 15 es el agonista peptídico de TLR de acuerdo con SEQ ID NO: 71:

STVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE
SEQ ID NO: 71

En consecuencia, se prefiere particularmente como componente c) un agonista peptídico de TLR2 que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 71 o una variante de secuencia de la misma como se describió anteriormente, es decir, como el al menos un agonista peptídico de TLR, comprendido por el complejo. En otras palabras, el agonista peptídico de TLR en el complejo lo más preferentemente comprende o consiste en un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 71 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia).

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

Otros agonistas peptídicos de TLR adecuados comprenden un dominio EDA de fibronectina o un fragmento o variante del mismo. Dichos dominios EDA de fibronectina adecuados o fragmentos o variantes de los mismos se describen en el documento EP 1 913 954 B1, el documento EP 2 476 440 A1, el documento WO 2009/0220532 A1 y el documento WO 2011/101332 A1. De esta manera, se prefiere particularmente como componente c) un agonista peptídico de TLR4 que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 45 o una variante de secuencia de la misma como se describió anteriormente, es decir, como el al menos un agonista peptídico de TLR, comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención.

NIDRPKGLAFTDQVDVDSIKIAWESPQQQVSRVYTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELQGLRP
GSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQST

SEQ ID NO: 45 (agonista peptídico de TLR4 EDA)

Además, se supone que la proteína de la caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) y sus fragmentos peptídicos son agonistas de TLR4. Dichos péptidos derivados de HMGB1 se desvelan, por ejemplo, en el documento US 201110236406 A1.

Por otra parte, también el agonista de TLR de acuerdo con SEQ ID NO: 15 y el agonista de TLR de acuerdo con SEQ ID NO: 71 pueden actuar como agonistas de TLR4. En consecuencia, se prefiere particularmente como componente c) un agonista peptídico de TLR4 que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 15 o 71 o una variante de secuencia funcional de la misma, es decir, como el al menos un agonista peptídico de TLR, comprendido por el complejo.

El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende al menos un agonista del péptido TLR2 y/o TLR4, preferentemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención también puede comprender más de un agonista peptídico de TLR, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más agonistas peptídicos de TLR, más preferentemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende (al menos) dos o tres agonistas peptídicos de TLR, incluso más preferentemente el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende (al menos) cuatro o cinco agonistas peptídicos de TLR. Si más de un agonista peptídico de TLR está comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención se entiende que dicho agonista peptídico de TLR en particular también está unido covalentemente en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, a otro agonista peptídico de TLR y/o a un componente a), es decir, un péptido de penetración celular y/o a un componente b), es decir, un antígeno o epítopo antigénico.

En una realización particularmente preferida, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende un único agonista peptídico de TLR2 o 4. En particular, en esta realización particularmente preferida, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende un único agonista peptídico de TLR 2 o 4 y ningún componente adicional que tenga propiedades agonistas de TLR excepto el único agonista peptídico de TLR como se describe.

Los diversos agonistas peptídicos de TLR comprendidos por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención pueden ser iguales o diferentes. Preferentemente, los diversos agonistas peptídicos de TLR comprendidos por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención son diferentes entre sí.

Por otra parte, se prefiere que más de un antígeno o epítopo antigénico, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 antígenos o epítopos antigénicos o más agonistas del péptido TLR, en particular 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 agonistas de TLR, se coloquen consecutivamente en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. Esto significa en particular que todos los agonistas peptídicos de TLR que componen el complejo están situados en un tramo, que no se interrumpe por el componente a), es decir, un péptido de penetración celular, ni por el componente b), es decir, al menos un antígeno o epítopo antigénico. Más bien, el componente a) y el componente b) se sitúan en el complejo, por ejemplo, antes o después de tal tramo de todos los agonistas peptídicos de TLR. Sin embargo, los agonistas peptídicos de TLR colocados consecutivamente de tal manera pueden unirse entre sí, por ejemplo, mediante un espaciador o enlazador como se describe a continuación, que no es ni el componente a), es decir, un péptido de penetración celular, ni el componente b), es decir, al menos un antígeno o epítopo antigénico.

Como alternativa, sin embargo, los diversos agonistas peptídicos de TLR también pueden colocarse de cualquier otra manera en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, con el componente a) y/o el componente b) colocado entre dos o más agonistas peptídicos de TLR, es decir, con uno o más agonistas peptídicos de TLR colocados entre el componente a) y el componente b) (o viceversa) y, opcionalmente, uno o más agonistas peptídicos de TLR situados en el otro extremo respectivo del componente a) y/o del componente b).

Se entiende que varios agonistas peptídicos de TLR diferentes que activan los mismos o diferentes receptores de TLR pueden estar comprendidos ventajosamente en un único complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. Como alternativa, un número de agonistas peptídicos de TLR diferentes que activan los mismos o diferentes receptores de TLR pueden distribuirse en subconjuntos de diferentes agonistas de péptidos de TLR que activan los mismos o diferentes receptores de TLR, que están comprendidos por diferentes complejos de acuerdo con la presente invención, por lo que dichos complejos diferentes que comprenden diferentes subconjuntos pueden administrarse ventajosamente de forma simultánea, por ejemplo, en una sola vacuna, a un sujeto que lo necesita.

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

En el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, los componentes a), b) y c) están unidos covalentemente, es decir, el enlace entre dos de los tres componentes a), b) y c) del complejo para su uso de acuerdo

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

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

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

La especificidad de acoplamiento puede aumentarse mediante el acoplamiento químico directo a un grupo funcional que se encuentra solo una o varias veces en los componentes a), b) y/o c), cuyo grupo funcional debe reticularse con otro de los componentes a), b) y c). Como un ejemplo, puede usarse el grupo cisteína tiol, si solo un resto de cisteína está presente en un determinado componente a), b) o c) del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. También, por ejemplo, si un determinado componente a), b) o c) no contiene restos de lisina, un reactivo de reticulación específico para aminas primarias será selectivo para el extremo amino del componente respectivo. Como alternativa, la reticulación también puede llevarse a cabo a través de la cadena lateral de un resto de ácido glutámico colocado en el extremo N del péptido de tal manera que pueda generarse un enlace amida a través de su cadena lateral. Por lo tanto, puede ser ventajoso unir un resto de ácido glutámico al extremo N de un determinado componente a), b) o c). Sin embargo, si debe introducirse un resto de cisteína en un determinado componente a), b) o c), se prefiere la introducción en o cerca de su extremo N o C. Están disponibles métodos convencionales para dichas alteraciones de la secuencia de aminoácidos basados en modificaciones de determinados componentes a), b) o c) añadiendo uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo, entre otros, un resto de cisteína, a la secuencia de translocación o sustituyendo al menos un resto de la secuencia o secuencias de translocación que están comprendidos en el componente respectivo. En caso de que se use una cadena lateral de cisteína con fines de acoplamiento, un determinado componente a), b) o c) tiene preferentemente un resto de cisteína. Es preferible evitar cualquier segundo resto de cisteína y, opcionalmente, reemplazarlos cuando aparecen en el componente respectivo comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención. Cuando un resto de cisteína se reemplaza en la secuencia original de un determinado componente a), b) o c), normalmente es deseable minimizar los cambios resultantes en el plegamiento peptídico del componente respectivo. Los cambios en el plegamiento se minimizan cuando el reemplazo es química y estéricamente similar a la cisteína. Por lo tanto, se prefiere la serina como sustituto de la cisteína.

El acoplamiento de dos de los tres componentes a), b) y c) puede lograrse mediante un agente de acoplamiento o conjugación que incluye reactivos de acoplamiento de síntesis de péptidos estándar tales como HOBt, HBTU, DICl, TBTU. Hay varios agentes de reticulación intermoleculares que pueden usarse, véase, por ejemplo, Means y Feeney, Chemical Modification of Proteins, Holden-Day, 1974, pp. 39-43. Entre estos reactivos se encuentran, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) o N,N'-(1,3-fenil)bismaleimida; N,N'-etilhe-bis-(yodoacetamida) u otro reactivo similar que tenga puentes metileno de 6 a 11 carbonos; y 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno. Otros agentes reticulantes útiles para este fin incluyen: p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodifenilsulfona; adipimidato de dimetilo; fenol-1,4-disulfonilcloruro; hexametilendiisocianato o diisotiocianato, o azofenil-p-diisocianato; glutaraldehído y disdiazobencidina. Los agentes reticulantes pueden ser homobifuncionales, es decir, tener dos grupos funcionales que sufren la misma reacción. Un agente reticulante homobifuncional preferido es el bismaleimidohexano (BMH). BMH contiene dos grupos funcionales maleimida, que reaccionan específicamente con compuestos que contienen sulfhidrilo en condiciones suaves (pH 6,5-7,7). Los dos grupos maleimida están conectados por una cadena de hidrocarburos. Por lo tanto, BMH es útil para la reticulación irreversible de proteínas (o polipéptidos) que contienen restos de cisteína. Los agentes reticulantes también pueden ser heterobifuncionales. Los agentes reticulantes heterobifuncionales tienen dos grupos funcionales diferentes, por ejemplo, un grupo reactivo con amina y un grupo

reactivo con tiol, que reticulará dos proteínas que tienen aminas y tioles libres, respectivamente. Los ejemplos de agentes reticulantes heterobifuncionales son succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) y 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimida (SMPB), un análogo de cadena extendida de MBS. El grupo succinimidilo de estos reticulantes reacciona con una amina primaria y la maleimida reactiva con tiol forma un enlace covalente con el tiol de un resto de cisteína. Debido a que los agentes reticulantes suelen tener baja solubilidad en agua, una fracción hidrófila, tal como un grupo sulfonato, puede añadirse al agente reticulante para mejorar su solubilidad en agua. Sulfo-MBS y sulfo-SMCC son ejemplos de agentes reticulantes modificados para su solubilidad en agua. Muchos agentes reticulantes producen un conjugado que esencialmente no se puede escindir en condiciones celulares. Por lo tanto, algunos agentes reticulantes contienen un enlace covalente, tal como un disulfuro, que es escindible en condiciones celulares. Por ejemplo, reactivo de Traut, ditiobis (succinimidilpropionato) (DSP) y 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) son reticulantes escindibles bien conocidos. El uso de un agente reticulante escindible permite que el péptido penetre en las células, el al menos un antígeno o epítipo antigénico y el al menos un agonista peptídico de TLR comprendidos por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención se separan entre sí después de su administración en la célula diana. Para este fin, también puede ser útil el enlace disulfuro directo. La reticulación química puede incluir el uso de brazos espaciadores. Los brazos espaciadores proporcionan flexibilidad intramolecular o ajustan las distancias intramoleculares entre restos conjugados y, por lo tanto, pueden ayudar a preservar la actividad biológica. Un brazo espaciador puede tener la forma de un resto proteico (o polipeptídico) que incluye aminoácidos espaciadores, por ejemplo, prolina. Como alternativa, un brazo espaciador puede ser parte del agente reticulante, tal como en el "SPDP de cadena larga" (Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., N.º de cat. 21651 H). Numerosos agentes reticulantes, incluyendo los analizados anteriormente, están disponibles en el mercado. Las instrucciones detalladas para su uso están disponibles de los proveedores comerciales. La información más detallada sobre la reticulación de proteínas y la preparación de conjugados, que es útil en el contexto de la unión de los componentes a), b) y c) comprendidos por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede recuperarse de: Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991).

Los agentes reticulantes para la reticulación de péptidos o proteínas incluyen, por ejemplo, (i) reticulantes de amina a amina, por ejemplo, reactivos de reticulación de proteínas específicos de amina homobifuncional basados en grupos reactivos de éster NHS e imidoéster para la conjugación selectiva de aminas primarias; disponible en variedades cortas, largas, escindibles irreversibles, permeables a membrana y de superficie celular; (ii) reticulantes de sulfhidrilo a carbohidratos, por ejemplo, reactivos de reticulación basados en grupos reactivos de maleimida e hidrazida para la conjugación y formación de enlaces reticulados covalentes; (iii) reticulantes de sulfhidrilo a sulfhidrilo, por ejemplo, reactivos de reticulación homobifuncionales específicos de sulfhidrilo basados en grupos reactivos de maleimida o piridilditio para la conjugación covalente selectiva de tioles proteicos y peptídicos (cisteínas reducidas) para formar enlaces tioéter estables; (iv) reticulantes fotorreactivos, por ejemplo, aril azida, diazirina y otros reactivos de reticulación heterobifuncionales químicos fotorreactivos (activados por luz) para conjugar proteínas, ácidos nucleicos y otras estructuras moleculares implicadas en complejos de interacción receptor-ligando mediante activación en dos etapas; (v) reticulantes de amina a sulfhidrilo, por ejemplo, reactivos de reticulación de proteínas heterobifuncionales para la conjugación entre grupos de proteínas amina primaria (lisina) y sulfhidrilo (cisteína) y otras moléculas; disponible con diferentes longitudes y tipos de brazos espaciadores; y (vi) reticulantes de amina a amina, por ejemplo, reticulantes de carboxiltoamina, por ejemplo, reactivos de reticulación de carbodiimida, DCC y EDC (EDAC), para conjugar grupos carboxilo (glutamato, aspartato, C-terminales) a aminas primarias (lisina, N-terminales) y también N-hidroxisuccinimida (NHS) para la activación estable de carboxilatos para la conjugación de aminas.

Los ejemplos de reticulantes en general, que pueden usarse en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, incluyen éster de N-(α-maleimidoacetoxi)-succinimida, N-5-Azido-2-nitrobenzilo-succinimida, 1,4-Bis-Maleimidobutano, 1,4-Bis-maleimidil-2,3-dihidroxi-butano, Bis-Maleimidohexano, Bis-Maleimidoetano, N-(ácido β-maleimidopropiónico)hidrazida*TFA, éster de N-(β-Maleimidopropiloxi)succinimida, 1,8-Bis-Maleimidodietilenglicol, 1,11-Bis-Maleimidotetraetilenglicol, Bis (sulfosuccinimidil)suberato, Bis (sulfosuccinimidil)glutarato-d0, Bis (sulfosuccinimidil)2,2,4,4-glutarato-d4, Bis (sulfosuccinimidil)suberato-d0, Bis (sulfosuccinimidil)2,2,7,7-suberato-d4, Bis (NHS)PEG5, Bis (NHS)PEG9, Bis (2-[succinimidoxycarboniloxi]etil)sulfona, N,N-Diciclohexilcarbodiimida, 1-5-Difluoro-2,4-dinitrobenzoceno, Adipimidato de dimetilo*2HCl, Pimelimidato de dimetilo*2HCl, Suberimidato de dimetilo*2HCl, Glutarato de disuccinimidilo, Ditiobis(succinimidilpropionato) (reactivo de Lomant), Suberato de disuccinimidilo, Tartarato de disuccinimidilo, 3,3'-Ditiobispropionimidato de dimetilo*2HCl, Ditiobis-maleimidoetano, 3,3'-Ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato), Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, Etilenglicol bis (succinimidilsuccinato), Ácido N-ε-maleimidocaproico, N-(ácido ε-maleimidocaproico)hidrazida, Éster de N-ε-Maleimidocaproiloxi)succinimida, Éster de N-(γ-Maleimidobutiriloxi)succinimida, N-(ácido κ-maleimidoundecanoico)hidrazida, NHS-LC-Diazirina, 4-(N-Maleimidometil) ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) de succinimidilo, 6-(3'-[2-piridilditio] propionamido)hexanoato de succinimidilo, L-Foto-Leucina, L-Foto-Metionina, Éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, Hidrazida de ácido 4-(4-N-Maleimidofenil)-butírico*HCl, 2-[N2-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil)-N6-(6-biotinamidocaproil)-L-lisinil]etilmetanetiosulfato, 2-[N2-[N6-(4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoil)-N6-(6-biotinamidocaproil)-L-lisinil]]etilmetanetiosulfato, N-Hidroxisuccinimida, Éster de N-hidroxisuccinimida etano azida, Éster de N-hidroxisuccinimida tetraoxapentadecano azida, Éster de N-hidroxisuccinimida dodecaoxanonatriacontano azida, NHS-Fosfina, 3-(2-Piridilditio)propionilhidrazida, 2-piridilditiotetraoxatetradecano-N-hidroxisuccinimida, 2-piridilditiotetraoxaoctatriacontano-N-hidroxisuccinimida, N-(p-Maleimidofenil)isocianato, 3-(Bromoacetamido)propionato de succinimidilo, NHS-Diazirina, NHS-SS-Diazirina,

Yodoacetato de *N*-succinimidilo, *N*-Succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato, 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, NHS-PEG2-Maleimida, NHS-PEG4-Maleimida, NHS-PEG6-Maleimida, NHS-PEG8-Maleimida, NHS-PEG12-Maleimida, NES-PEG24-Maleimida, 4-(*p*-maleimido-fenil)butirato de succinimidilo, Succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato, 4-Succinimidiloxicarbonil-metil- α -(2-piridilditio)tolueno, Succinimidil-(4-psoralen-8-ilo)butirato, 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo, Etilenglicol bis (succinato de sulfosuccinimidilo), Éster de *N*-(ϵ -Maleimidocaproilo) sulfosuccinimida, Éster de *N*-(γ -Maleimidobutilo) sulfosuccinimida, Éster de *N*-(κ -Maleimidoundecanoilo) sulfosuccinimida, Sulfo-NHS-LC-Diazirina, 6-(3'-[2-Piridilditio] propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo, Éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisulfosuccinimida, *N*-Hidroxisuccinimida, Sulfo-NHS-Fosfina, 6-(4'-Azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato de sulfosuccinimidilo, Sulfo-NHS-(2-6-[Biotinamido]-2-(*p*-azidobenzamido), Sulfo-NHS-Diazirina, Sulfo-NHS-SS-Diazirina, Sulfosuccinimidil(4-yodo-acetil)aminobenzoato, 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo, 4-(*p*-maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo, *Tris*-(2-Maleimidoetil)amina (Trifuncional) y *Tris*-(aminotricetato de succinimidilo) (Trifuncional).

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

Un enlace directo puede realizarse preferentemente mediante un puente amida, si los componentes a enlazar tienen grupos amino o carboxi reactivos. Más específicamente, si los componentes a enlazar son péptidos, polipéptidos o proteínas, se prefiere un enlace peptídico. Dicho enlace peptídico puede formarse usando una síntesis química que implica ambos componentes (un extremo N-terminal de un componente y el extremo C-terminal del otro componente) que se van a unir, o puede formarse directamente mediante una síntesis de proteínas de la secuencia peptídica completa de ambos componentes, en donde ambos componentes (proteína o péptido) se sintetizan preferentemente en una sola etapa. Dichos métodos de síntesis de proteínas incluyen, por ejemplo, sin quedar limitado a los mismos, métodos de síntesis de péptidos en fase líquida o métodos de síntesis de péptidos sólidos, por ejemplo, métodos de síntesis de péptidos sólidos de acuerdo con Merrifield, síntesis de péptidos en fase sólida *t*-Boc, síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc, Síntesis de péptidos en fase sólida basada en BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio), etc. Como alternativa, se prefieren enlaces éster o éter.

Como los componentes a enlazar son péptidos, polipéptidos o proteínas, puede producirse un enlace a través de las cadenas laterales, por ejemplo, mediante un puente disulfuro. Los componentes adicionales de otra naturaleza química, por ejemplo, el al menos un antígeno o epítipo antigénico si no es de naturaleza peptídica, también puede estar unido a los componentes de naturaleza peptídica, por ejemplo, el péptido de penetración celular, el al menos un agonista peptídico de TLR y el al menos un antígeno o epítipo antigénico si es de naturaleza peptídica. El enlace a través de una cadena lateral se basará preferentemente en una cadena lateral amino, grupos tiol o hidroxilo, por ejemplo, mediante un enlace amida o éster o éter. Una unión de una cadena principal peptídica con una cadena lateral peptídica de otro componente también puede realizarse mediante un enlace iso-peptídico. Un enlace iso-peptídico es un enlace amida que no está presente en la cadena principal de una proteína. El enlace se forma entre el extremo carboxilo de un péptido o proteína y el grupo amino de un resto de lisina en otro péptido o proteína (diana).

El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente un espaciador o enlazador, que son restos no inmunológicos, que son preferentemente escindibles y que unen los componentes a) y b) y/o los componentes a) y c), y/o los componentes b) y c), y/o unen antígenos consecutivos o epítipos antigénicos, y/o unen TLR consecutivos agonistas peptídicos, y/o unir péptidos de penetración celular consecutivos y/o que pueden colocarse en la parte C-terminal de los componentes b) y/o c). Un enlazador o espaciador preferentemente puede proporcionar funcionalidades adicionales además de la unión de los componentes, y preferentemente puede ser escindible, más preferentemente escindible de forma natural dentro de la célula diana, por ejemplo, mediante escisión enzimática. Sin embargo, tales funcionalidades adicionales no incluyen en particular ninguna funcionalidad inmunológica. Los ejemplos de otras funcionalidades, en particular, con respecto a los enlazadores en proteínas de fusión, puede encontrarse en Chen X. et al., 2013: Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357 - 1369, en donde, por ejemplo, también se desvelan enlazadores escindibles *in vivo*. Por otra parte, Chen X. et al., 2013: Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357 - 1369 también desvelan diversos enlazadores, por ejemplo, enlazadores flexibles y enlazadores rígidos, y herramientas y bases de datos de diseño de enlazadores, que pueden ser útiles en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención o para diseñar un enlazador para usarse en el complejo para usar de acuerdo con la presente invención.

Dicho espaciador es peptídico. Preferentemente, un espaciador peptídico consiste en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos, más preferentemente en aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos del espaciador peptídico puede ser idéntica a la de la región flanqueante N-terminal o C-terminal de cualquiera de los componentes a), b) o c). Alternativamente un espaciador peptídico puede consistir en secuencias de aminoácidos no naturales tales como una secuencia de aminoácidos resultante de sustituciones conservativas de aminoácidos de dichas regiones flanqueantes naturales o secuencias de sitios de escisión conocidos para proteasas tales como un sitio diana de enteroquinasa (secuencia de aminoácidos: DDDK, SEQ ID NO: 16), sitio diana del factor Xa (secuencia de aminoácidos: IEDGR, SEQ ID NO: 17), sitio diana de trombina (secuencia de aminoácidos: LVPRGS,

SEQ ID NO: 18), sitio diana de proteasa TEV (secuencia de aminoácidos: ENLYFQG, SEQ ID NO: 19), sitio diana de proteasa PreScission (secuencia de aminoácidos LEVLFQGP, SEQ ID NO: 20), aminoácidos policatiónicos, por ejemplo, poli K, sitio diana de furina (secuencia de aminoácidos RX(R/K)R, SEQ ID NO: 21). En una realización particular, el espaciador peptídico no contiene restos de Cys (C). En una realización preferida la secuencia enlazadora contiene al menos el 20 %, más preferentemente al menos el 40 % e incluso más preferentemente al menos el 50 % de restos de Gly o β -alanina, por ejemplo, GlyGlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 22), GlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 23), GlyGlyGly, CysGlyGly o GlyGlyCys, etc. Un experto en la materia puede seleccionar y preparar fácilmente secuencias enlazadoras apropiadas. Pueden estar compuestas por aminoácidos D y/o L. Los ejemplos adicionales de un espaciador peptídico incluyen las secuencias de aminoácidos EQLE (SEQ ID NO: 24) o TEWT (SEQ ID NO: 25) o cualquier sustitución conservativa de las mismas.

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

En particular, el complejo para su uso de acuerdo con la invención puede comprender un espaciador o enlazador, en particular un espaciador peptídico, colocado entre el componente a) y b) y/o entre el componente a) y c), y/o entre el componente b) y c). Este espaciador peptídico puede elegirse por un experto en la materia de tal manera que pueda cortarse por la maquinaria celular una vez que se haya internalizado el complejo que comprende el péptido de penetración celular y la molécula de carga.

Cuando el complejo comprende varios antígenos o epítopos antigénicos o cuando el complejo comprende varios agonistas peptídicos de TLR, estará claro para un experto en la materia que cada uno de los antígenos o epítopos antigénicos y/o cada uno de los agonistas peptídicos de TLR comprendidos en el complejo de la invención pueden enlazarse directamente entre sí o enlazarse a través de espaciadores o enlazadores tales como, por ejemplo, un espaciador peptídico que consiste en unos pocos aminoácidos. Como alternativa, cuando el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende varios antígenos o epítopos antigénicos o cuando el complejo comprende varios agonistas peptídicos de TLR, también es posible que algunos antígenos o epítopos antigénicos y/o algunos agonistas peptídicos de TLR comprendidos por el complejo de la invención estén unidos directamente entre sí y algunos otros antígenos o epítopos antigénicos y/o algunos otros agonistas peptídicos de TLR estén unidos mediante espaciadores o enlazadores como un espaciador peptídico que consiste en unos pocos aminoácidos.

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

En otra ilustración particular de la presente invención, el espaciador usado para unir un primer antígeno/epítipo antigénico o un primer agonista peptídico de TLR ("antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1") a un segundo antígeno/epítipo antigénico o a un segundo agonista peptídico de TLR, respectivamente, ("antígeno/epítipo/agonista

peptídico de TLR 2) consiste en, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos. Más particularmente, dicha secuencia de aminoácidos del espaciador puede corresponder a los 4 aminoácidos de la región flanqueante N-terminal o C-terminal del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 1 o del antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR 2. También puede colocarse un espaciador como se describió anteriormente en la parte C-terminal del último antígeno/epítipo/agonista peptídico de TLR comprendido en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención.

Las técnicas para enlazar dos de los tres componentes a), b) y c) están bien documentadas en la bibliografía y pueden depender de la naturaleza de al menos un antígeno o epítipo antigénico. Por ejemplo, los enlaces entre dos de los tres componentes a), b) y c) pueden lograrse mediante enlaces disulfuro escindibles mediante síntesis total en fase sólida por etapas o acoplamiento en fase de solución o fragmentos en fase sólida, amida estable, tiazolidina, enlace de oxima e hidracina, enlace disulfuro, enlace estable de tiomaleimida, enlace peptídico (incluyendo enlaces peptídicos entre aminoácidos de una proteína de fusión) o interacciones electrostáticas o hidrófobas.

El al menos un antígeno o epítipo antigénico comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención así como cualquier espaciador o enlazador opcional comprendido por el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención son de naturaleza peptídica. Todos los componentes del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o epítipo antigénico, que es un péptido, un polipéptido o una proteína, el al menos un agonista peptídico de TLR y cualquier enlazador peptídico o espaciador opcional están enlazados en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención mediante un enlace peptídico. El complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es, por lo tanto, un polipéptido o proteína, tal como una proteína de fusión, por ejemplo, una proteína de fusión recombinante.

En este contexto, un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 87; o un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 o SEQ ID NO: 87 se prefiere. Por otra parte, un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 91; o un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90 o SEQ ID NO: 91 se prefiere. Adicionalmente, un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 69; o un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 69 se prefiere. Un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 69 o un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 69 se prefiere más. Un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 69 o un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 69 se prefiere más. Un complejo que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 69 o un complejo que comprende una secuencia de

[illegible]

su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 80 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 80. Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 81 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 81. Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 82 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 82. Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 83 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 83. Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 84 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 84. Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 85 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 85. Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 86 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 86. Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 87 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 87. Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 88 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 88. Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 89 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 89. Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 90 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 90. Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 91 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 91.

Se prefiere particularmente que el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprenda o consista en un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 89, o una variante de secuencia funcional del mismo que tenga al menos el 50 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 75 %, incluso más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 % y lo más preferentemente al menos el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia).

SEQ ID NO: 26:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYSR VTYSSPEDGI
RELFPAPDGEDDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKSR
AKFKQLLQHY REVAAAKSSE NDRLRLLLKE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV
PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFELKTE WTGS

SEQ ID NO: 27:

MHHHHHHSTV HEILCKLSLE GDHSTPPSAY GSVKPYTNFD AEKRYKNRVA SRKSRKFKQ

LLQHYREVAA AKSENDRLR LLLKESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD
WLGVPFRAKF ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGS

SEQ ID NO: 28:

5

MHHHHHHHKRYKNRVA SRKSRKFKQ LLQHYREVAA AKSENDRLR LLLKESLKIS
QAVHAAHAEI NEAGREVVGV GALKVPRNQD WLGVPFRAKF ASFEAQGALA
NIAVDKANLD VEQLESIINF EKLTEWTGSS TVHEILCKLS LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE

SEQ ID NO: 33:

MHHHHHHHKRY KNRVASRKS AKFKQLLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV
VGVGALKVPR NQDWLGVPF AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTEWT
GSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

10

SEQ ID NO: 34:

MHHHHHHHREV AAASSENDRLRLLLKESLKISQAVHAAHA EINEAGREVV GVGALKVPRN
QDWLGVPFRA KFASFEAQGA LANIAVDKAN LDVEQLESII NFEKLTEWTG SSTVHEILCK
LSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

15

SEQ ID NO: 37:

MHHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKS AKFKQLLQHY
REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPF AKFASFEAQG
ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTEWT GS

20

SEQ ID NO: 38:

MHHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQGQVSRYR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAELQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTREV AAASSENDRLRLLLKESLK
ISQAVHAAHA EINEAGREVV GVGALKVPRN QDWLGVPFRA KFASFEAQGA LANIAVDKAN
LDVEQLESII NFEKLTEWTG S

25

SEQ ID NO: 39:

KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSENDRLRLLLKVITYHSPSYAYHQFERRAILNRLV

QFIKDRISVVQALVLTSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTN FDAE

SEQ ID NO: 40:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKNYRIATFKNWPFLEDCAMEELT
VSEFLKLDQRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 41:

5

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLKHLELASMTNMELMSSIVSTVHEI
LCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 46:

RKKRRQRRRRVKRISQAVHAAHAEINEAGRVRKRVPRNQDWLRVKRASFEAQGALANIAVD
KARVKRSIINFELRVKRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

10

SEQ ID NO: 69:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLKLFRAAQLANDVVLQIMEHLELA
SMTNMELMSSIVVISASIIVFNLLELEGSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

15

SEQ ID NO: 72:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKAPPQVLAFGLLAAATAYVDEK
APEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

20

SEQ ID NO: 73:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQN
SVSANRSDPVTDPSSYLSGANLNLSSHASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACF
VSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALILGDPKKLLTQHfVQENYLE
YRQVPGSDPASYEFLWGPRALVETSYVKVALSRKVAELVHFLLKYRAREPVTKAEMLGSVVAPP
QVLAFGLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVK
PYTNFDAE

25

SEQ ID NO: 74:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQN
SVSANRSDPVTDPSSYLSGANLNLSSHASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACF
VSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSLGDPKKLLTQHfVQENYLEYRQVPGSDPASYEFLWG
PRALVETSYVKVALSRKVAELVHFLLKYRAREPVTKAEMLGSVVAPPQVLAFGLLAAATAYVD
EKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 75:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQN
SVSANRSDPVTDPSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACF
VSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSLGDPKKLLTQH FVQENYLEYRQVPGSDPASYEFLWG
PRALVETSYVKVALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVAPPQVLAFLGLLLAAATAYVD
EKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPALGS
TAPPVHNVTSSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 76:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQN
SVSANRSDPVTDPSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACF
VSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSVKKQFEEL
TLGEFLKLDREERAPPQVLAFLGLLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVAPGSTAPPAHG
VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAY
GSVKPYTNFDAE

5

SEQ ID NO: 77:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQN
SVSANRSDPVTDPSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACF
VSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSEYKLVVVGAVGVGKSALTAPPQVLAFLGLLLAAATAYV
DEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPAL
GSTAPPVHNVTSSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

10

SEQ ID NO: 78:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQN
SVSANRSDPVTDPSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACF

VSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSVKKQFEEL
TLGEFLKLDREERAPPQVLAFLGLLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVLGDPKKLLTQH
FVQENYLEYRQVPGSDPASYEFLWGPRALVETSYVKVALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEM
LGSVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

15

SEQ ID NO: 79:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQN
SVSANRSDPVTDPDSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF
VSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPPQVLAFLGLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIA
VIVVAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSSSTVHEIL
CKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 80:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQN
SVSANRSDPVTDPDSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF
VSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPPQVLAFLGLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIA
VIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

5

SEQ ID NO: 81:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLKLGDPPKLLTQHFVQENYLEYRQ
VPGSDPASYEFLWGPRALVETSYVKVALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVAPTLP
AWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSVKKQFEELTLGEFLKDRERAPGSTAPPAHGVTSAPDTRP
APGSTAPPAHGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNF
DAE

10

SEQ ID NO: 82:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQN
SVSANRSDPVTDPDSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF
VSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

15

SEQ ID NO: 83:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ
NSVSANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNN
GTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALIAPGSTAPPAHGV
TAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSSAPPQVLAFLGLLAAATALIYYVDE
KAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

20

SEQ ID NO: 84:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ
 NSVSANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSSHASASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNN
 GTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA
 HGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSAAPPQVLAFGLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIA
 VIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 85:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ
 NSVSANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSSCHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNN
 GTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA
 HGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSAAPPQVLAFGLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIA
 VIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

5

SEQ ID NO: 86:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ
 NSVSANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSSCHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNN
 GTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGS
 VKKQFEELTLGEFLKDRERAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPALGST
 APPVHNVTSAAPPQVLAFGLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLE
 GDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

10

SEQ ID NO: 87:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ
 NSVSANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSSCHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNN
 GTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGS

VKKQFEELTLGEFLKDRERAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPALGST
 APPVHNVTSAAPPQVLAFGLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILSKLSLE
 GDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

15

SEQ ID NO: 88:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ
 NSVSANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNN
 GTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLPAPWQPFLKDHRISTFKNWPFLGSA
 VKKQFEELTLGEFLKLDREAPPQVLAFLGALLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVAA
 VARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPFHGGASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRN
 ALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGALSPAERELLDFFSWLGGYSTVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYG
 SVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 89:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ
 NSVSANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNN
 GTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLPAPWQPFLKDHRISTFKNWPFLGSA
 VKKQFEELTLGEFLKLDREAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPFHGGASKKLSKVETLR
 SAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGALSPAERELLDFFSWLGGYST
 VHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 90:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ
 NSVSANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNN
 GTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLPAPWQPFLKDHRISTFKNWPFLGSA
 VKKQFEELTLGEFLKLDREAKNKIAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPFHGGASKKLSK
 VETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGALSPAERELLDFFSWLG
 GYSTVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE

SEQ ID NO: 91:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQ
 NSVSANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNN

GTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLPAPWQPFLKDHRISTFKNWPFLGSA
 VKKQFEELTLGEFLKLDREAKNKIAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPFHGGASKKLSK
 VETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPTTPVAASPSRASSSPGR
 GGSSEPGSPRSAYSSDDSGSEGALSPAERELLDFFSWLGGYSTVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGS
 VKPYTNFDAE

Lo más preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende (o consiste en) los siguientes componentes:

(i) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia);

(ii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 96 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia);

(iii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia);

(iv) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 97 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia); y

(v) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 71; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia).

Preferentemente, el complejo comprende los componentes (i) - (v) (como se describió anteriormente) en la dirección N- a C-terminal. Sin embargo, los componentes también pueden estar dispuestos de forma diferente, como se describirá a continuación.

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

un péptido de penetración celular;
al menos tres epítopos antigénicos; y
al menos un agonista peptídico de TLR2 o 4,

en donde los componentes a) - c) están unidos covalentemente, y
en donde los al menos tres epítopos antigénicos comprenden (i) uno o más epítopos de survivina o (a) variante o variantes funcionales de secuencia de la misma, (ii) uno o más epítopos de CEA o (a) variante o variantes de secuencia funcional del mismo y (iii) uno o más epítopos de ASCL2 o (a) variante o variantes de secuencia funcional del mismo, en donde el complejo es un polipéptido o proteína.

Las realizaciones preferidas de dicho complejo de acuerdo con la presente invención corresponden a realizaciones preferidas del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente.

Por ejemplo, el complejo de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52 o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia, como se ha descrito anteriormente. Más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 53. Aún más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia, como se ha descrito anteriormente.

Por ejemplo, el complejo de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 54 o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia, como se ha descrito anteriormente. Más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 55 y/o un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 56. Aún más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 96 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia, como se ha descrito anteriormente.

Por ejemplo, el complejo de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 92 o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia, como se ha descrito anteriormente. Más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene

una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 93 y/o un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 94. Aún más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 97 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia, como se ha descrito anteriormente.

También se prefiere que el complejo comprenda en la dirección N- a C-terminal:

uno o más epítomos de CEA o variantes de secuencia funcional del mismo como se describió anteriormente;
 uno o más epítomos de survivina o variantes de secuencia funcional de la misma como se describió anteriormente;
 y
 uno o más epítomos de ASCL2 o variantes de secuencia funcional del mismo como se describió anteriormente.

Más preferentemente, el complejo comprende en dirección N- a C-terminal:

- un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 54, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos como se describe anteriormente, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia como se describe anteriormente;
- un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos como se describe anteriormente, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia como se describe anteriormente; y
- un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 92, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos como se describe anteriormente, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia como se describe anteriormente.

Aún más preferentemente, el extremo C de (i) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 54 o el fragmento o variante del mismo como se ha descrito anteriormente está directamente enlazado al extremo N de (ii) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52 o el fragmento o variante del mismo como se ha descrito anteriormente; y el extremo C de (ii) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52 o el fragmento o variante del mismo como se ha descrito anteriormente está directamente enlazado al extremo N de (iii) el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 92 o el fragmento o variante del mismo como se ha descrito anteriormente.

También se prefiere que el complejo comprenda un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 96 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia como se ha descrito anteriormente; un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia como se ha descrito anteriormente; y un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 97 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia como se ha descrito anteriormente.

Lo más preferentemente, el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 98 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia como se ha descrito anteriormente.

Preferentemente, el complejo es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante como se ha descrito anteriormente.

Por otra parte, el péptido de penetración celular del complejo de acuerdo con la presente invención corresponde preferentemente al péptido de penetración celular del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención como se ha descrito anteriormente. Esto se aplica en particular a realizaciones preferidas del péptido de penetración celular.

Además, el agonista peptídico de TLR del complejo de acuerdo con la presente invención corresponde preferentemente al agonista peptídico de TLR del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención como se ha descrito anteriormente. Esto se aplica en particular a realizaciones preferidas del agonista peptídico de TLR.

Por ejemplo, el complejo de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente en la dirección N- a C-terminal, los siguientes componentes, como se ha descrito anteriormente:

- (i) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6 (CPP3/Z13) o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia);
- (ii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 96 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %,

más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia);

(iii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia);

(iv) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 97 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia); y

(v) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 71; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 99 % de identidad de secuencia),

en donde los componentes (i) - (v) están opcionalmente enlazados mediante un enlazador o espaciador.

Lo más preferentemente, el complejo comprende o consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 89 o una variante de secuencia funcional de la misma que tiene al menos el 50 % de secuencia (preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 75 %, incluso más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 % y lo más preferentemente al menos el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia).

El complejo de acuerdo con la presente invención se usa en la prevención y/o el tratamiento del cáncer colorrectal como se describe en el presente documento.

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

Los componentes a), b) y c) pueden disponerse en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención de cualquier forma.

En particular, si el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención comprende más de un péptido de penetración celular y/o más de un antígeno o epítipo antigénico y/o más de un agonista peptídico de TLR, los más de un péptido de penetración celular pueden colocarse de manera no consecutiva, es decir, al menos un antígeno o epítipo antigénico (componente b)) y/o al menos un agonista peptídico de TLR (componente c)) pueden interrumpir un tramo de péptidos de penetración celular colocados consecutivamente y/o los péptidos de penetración celular pueden estar colocados con el componente b) y/o con el componente c) de forma alterna. De forma similar, los más de un antígeno o epítipo antigénico pueden posicionarse de manera no consecutiva, es decir, al menos un péptido de penetración celular (componente a)) y/o al menos un agonista peptídico de TLR (componente c)) pueden interrumpir un tramo de antígenos o epítipos antigénicos posicionados consecutivamente y/o los antígenos o epítipos antigénicos pueden estar posicionados con el componente a) y/o con el componente c) de forma alterna. De forma similar, los más de un agonista peptídico de TLR pueden posicionarse de manera no consecutiva, es decir, al menos un péptido de penetración celular (componente a)) y/o al menos un antígeno o epítipo antigénico (componente b)) pueden interrumpir un tramo de agonistas peptídicos de TLR posicionados consecutivamente y/o los agonistas peptídicos de TLR pueden estar colocados con el componente a) y/o con el componente b) de forma alterna.

Sin embargo, se prefiere que más de un péptido de penetración celular esté colocado en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención de manera consecutiva y/o más de un antígeno o epítipo antigénico esté colocado en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención de manera consecutiva y/o más de un agonista peptídico de TLR se coloca en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención de manera consecutiva. Esto significa en particular que todas las unidades individuales de un determinado componente, es decir, todos los péptidos de penetración celular, todos los antígenos o epítipos antigénicos o todos los agonistas peptídicos de TLR, que componen el complejo se ubican en un tramo, que no está interrumpido por ninguno de los otros dos componentes. En cambio, los otros dos componentes se colocan en el complejo, por ejemplo, antes o después de tal tramo de todas las unidades individuales de dicho componente determinado. Sin embargo, las unidades individuales de dicho componente determinado colocadas consecutivamente de tal manera pueden unirse entre sí, por ejemplo, mediante un espaciador o enlazador como se describe en el presente documento, que no es de los otros dos componentes.

Se prefiere particularmente que cada uno de los componentes a), b) y c) esté colocado de manera consecutiva.

Estructuralmente cada componente a), b) y c) normalmente comprende una única cadena principal y al menos una

cadena lateral. La expresión "cadena principal" (también "cadena estructural"), como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a la principal cadena continua de átomos unidos covalentemente en una molécula. Por ejemplo, en péptidos, polipéptidos y proteínas, la cadena principal (estructura principal) normalmente comprende átomos de carbono alfa y átomos de nitrógeno de los aminoácidos constituyentes unidos por el enlace peptídico. La estructura principal no incluye las cadenas laterales. La expresión "cadena lateral" (también "cadena colgante"), como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a un grupo químico que está unido a una parte central de la molécula llamada "cadena principal" o estructura principal. Por ejemplo, en péptidos, polipéptidos y proteínas, las cadenas laterales normalmente representan las partes (principales) de los aminoácidos constituyentes, que están unidos a los átomos de carbono alfa de la estructura principal.

En el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, los componentes a), b) y c) pueden estar unidos covalentemente a través de un enlazador o espaciador como se describe en el presente documento o pueden estar unidos directamente de forma covalente. Independientemente de si se usa un espaciador o un enlazador para el enlace covalente o no, hay en principio cuatro opciones de cómo dos de los tres componentes se unen entre sí en el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, en concreto:

- (i) a través del enlace cadena principal/cadena principal,
- (ii) a través del enlace cadena principal/cadena lateral,
- (iii) a través del enlace cadena lateral/cadena principal o
- (iv) a través del enlace cadena lateral/cadena lateral.

Preferentemente, los tres componentes a), b) y c) están enlazados a través de un enlace cadena principal/cadena principal, dando como resultado de esta manera en particular una cadena principal del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, que comprende la cadena principal de uno o más péptido o péptidos de penetración celular, la cadena principal de uno o más antígeno o antígenos o epítipo o epítipos antigénicos y la cadena principal de uno o más agonista o agonistas peptídicos de TLR. En otras palabras, la cadena principal de uno o más péptido o péptidos de penetración celular, la cadena principal de uno o más antígeno o antígenos o epítipo o epítipos antigénicos y la cadena principal de uno o más agonista o agonistas peptídicos de TLR constituyen la cadena principal del complejo para su uso de acuerdo con la presente invención, opcionalmente junto con componentes adicionales, por ejemplo, enlazador o enlazadores, espaciador o espaciadores, etc. En consecuencia, se prefieren las siguientes disposiciones de los componentes a), b) y c), en particular ya que el al menos un antígeno o epítipo antigénico es un polipéptido o proteína, por lo que dichas disposiciones preferidas se muestran a continuación en la dirección N-terminal -> C-terminal de la cadena principal del complejo y en donde los tres componentes a), b) y c) están unidos mediante un enlace cadena principal/cadena principal y pueden estar opcionalmente unidos mediante un enlazador, un espaciador u otro componente adicional:

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

En particular si los tres componentes a), b) y c) están enlazados a través de un enlace cadena principal/cadena principal, se prefiere que al menos un antígeno o epítipo antigénico esté situado en el extremo C-terminal del péptido de penetración celular, por lo que el péptido de penetración celular y el al menos un antígeno o epítipo antigénico están unidos opcionalmente mediante un componente adicional, por ejemplo, un enlazador, un espaciador o mediante el al menos un agonista peptídico de TLR. En consecuencia, esto corresponde a las disposiciones (α), (β) y (γ) de los disposiciones mostradas anteriormente, es decir, de las disposiciones anteriores las disposiciones (α), (β) y (γ) son más preferidas.

Aún más preferentemente, el al menos un antígeno o epítipo antigénico está situado en el extremo C-terminal del péptido de penetración celular, por lo que el péptido de penetración celular y el al menos un antígeno o epítipo antigénico están unidos opcionalmente mediante un componente adicional, por ejemplo, un enlazador, un espaciador, pero no mediante el al menos un agonista peptídico de TLR. En consecuencia, esto corresponde a las disposiciones (α) y (β) de las disposiciones mostradas anteriormente, es decir, de las disposiciones anteriores las disposiciones (α) y (β) son incluso más preferidas. En particular preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante y los componentes a) a c) están colocados en la dirección N-terminal -> C-terminal de la cadena principal de dicho complejo en el orden:

- (α) componente a) - componente b) - componente c); o
 (β) componente c) - componente a) - componente b),

en donde los componentes pueden estar enlazados por un componente adicional, en particular mediante un enlazador o un espaciador.

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

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

Como alternativa, en una disposición de este tipo que comprende un agonista peptídico de TLR2, también pueden disponerse agonistas peptídicos de TLR adicionales en otras posiciones en el complejo, por ejemplo:

- (α5) uno o más agonistas del péptido TLR4, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 agonista o agonistas peptídicos de TLR4 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 agonista o agonistas peptídicos de TLR2;
 (α6) uno o más agonistas del péptido TLR5, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 agonista o agonistas peptídicos de TLR5 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 agonista o agonistas peptídicos de TLR2; o
 (α7) uno o más agonistas del péptido TLR4, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 agonista o agonistas peptídicos de TLR4 y uno o más agonista o agonistas peptídicos de TLR5, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 agonista o agonistas peptídicos de TLR5 - componente a) (péptido de penetración celular) - componente b) (al menos un antígeno o epítipo antigénico) - uno o más agonistas peptídicos de TLR2, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 agonista o agonistas peptídicos de TLR2.

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

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

Como alternativa, en una disposición de este tipo que comprende un agonista peptídico de TLR4, también pueden disponerse agonistas peptídicos de TLR adicionales en otras posiciones en el complejo, por ejemplo:

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

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

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

Por ejemplo, los componentes a) y b) están unidos a través de un enlace cadena principal/cadena principal, dando como resultado de esta manera las siguientes disposiciones de los componentes a) y b) en el complejo, mostradas en la dirección N-terminal -> C-terminal de la cadena principal del complejo, por lo que los componentes

a) y b) pueden estar unidos opcionalmente mediante un componente adicional, por ejemplo, un enlazador, un espaciador, etc.:

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

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

- (i) el componente c) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena principal/cadena lateral al componente a), es decir, la cadena principal del al menos un agonista peptídico de TLR está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral del péptido de penetración celular;
- (ii) el componente c) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena principal al componente a), es decir, la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena principal del péptido de penetración celular;
- (iii) el componente c) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena lateral al componente a), es decir, la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral del péptido de penetración celular;
- (iv) el componente c) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena principal/cadena lateral al componente b), es decir, la cadena principal del al menos un agonista peptídico de TLR está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico;
- (v) el componente c) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena principal al componente b), es decir, la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena principal del al menos un antígeno o epítipo antigénico;
- (vi) el componente c) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena lateral al componente b), es decir, la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico;
- (vii) el componente c) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena principal/cadena lateral a un enlazador o un espaciador colocado entre el componente a) y el componente b), es decir, la cadena principal del al menos un agonista peptídico de TLR está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral de un enlazador o un espaciador colocado entre el componente a) y el componente b);
- (viii) el componente c) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena principal a un enlazador o un espaciador colocado entre el componente a) y el componente b), es decir, la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena principal de un enlazador o un espaciador colocado entre el componente a) y el componente b); o
- (ix) el componente c) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena lateral a un enlazador o un espaciador colocado entre el componente a) y el componente b), es decir, la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral de un enlazador o un espaciador colocado entre el componente a) y el componente b).

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

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

En un caso tal, el componente a), es decir, el péptido de penetración celular, puede disponerse después mediante un enlace cadena principal/cadena lateral, a través de un enlace cadena lateral/cadena principal o a través de un enlace cadena lateral/cadena lateral al antígeno/epítipo antigénico (b) o al agonista peptídico de TLR (c) o, si está presente, a un componente adicional como un espaciador o enlazador, que puede estar, por ejemplo, posicionado entre el antígeno/epítipo antigénico (b) y el agonista peptídico de TLR (c). Esto incluye las siguientes disposiciones:

- (x) el componente a) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena principal/cadena lateral al componente b), es decir, la cadena principal del péptido de penetración celular está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico;
- (xi) el componente a) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena principal al componente b), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena principal del al menos un antígeno o epítipo antigénico;
- (xii) el componente a) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena lateral al componente b), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico;
- (xiii) el componente a) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena principal/cadena lateral al componente c), es decir, la cadena principal del péptido de penetración celular está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR;
- (xiv) el componente a) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena principal al componente c), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena principal del al menos un agonista peptídico de TLR;
- (xv) el componente a) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena lateral al componente c), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR;
- (xvi) el componente a) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena principal/cadena lateral a un enlazador o un espaciador colocado entre el componente b) y el componente c), es decir, la cadena principal del péptido de penetración celular está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral de un enlazador o un espaciador colocado entre el componente b) y el componente c);
- (xvii) el componente a) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena principal a un enlazador o un espaciador colocado entre el componente b) y el componente c), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena principal de un enlazador o un espaciador colocado entre el componente b) y el componente c); o
- (xviii) el componente a) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena lateral a un enlazador o un espaciador colocado entre el componente b) y el componente c), es decir, la cadena lateral del péptido de penetración celular está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral de un enlazador o un espaciador colocado entre el componente b) y el componente c).

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

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

En un caso tal, el componente b), es decir, el al menos un antígeno o epítipo antigénico, puede disponerse después mediante un enlace cadena principal/cadena lateral, a través de un enlace cadena lateral/cadena principal o a través de un enlace cadena lateral/cadena lateral al péptido de penetración celular (a) o al agonista peptídico de TLR (c) o, si está presente, a un componente adicional como un espaciador o enlazador, que puede estar, por ejemplo, colocado

entre el péptido de penetración celular (a) y el agonista del péptido TLR (c). Esto incluye las siguientes disposiciones:

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

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

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

(xxii) el componente b) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena principal/cadena lateral al componente c), es decir, la cadena principal del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR;

(xxiii) el componente b) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena principal al componente c), es decir, la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena principal del al menos un agonista peptídico de TLR;

(xxiv) el componente b) puede estar unido (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a través de un enlace cadena lateral/cadena lateral al componente c), es decir, la cadena lateral del al menos un antígeno o epítipo antigénico está unida covalentemente (opcionalmente a través de un espaciador o un enlazador) a la cadena lateral del al menos un agonista peptídico de TLR;

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

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

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

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

Cáncer colorrectal

La presente invención proporciona el complejo descrito anteriormente para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer colorrectal.

El cáncer colorrectal (CRC, también conocido como "cáncer de intestino") es un cáncer que comprende los cánceres de colon y los cánceres de recto (CC). Ambos cánceres individuales tienen muchas características en común, menos el punto de partida del cáncer. De acuerdo con Siegel, R., C. Desantis y A. Jemal, Colorectal cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin, 2014. 64(2): p. 104-17, en Estados Unidos entre 2006 y 2010, la incidencia por sitio del tumor es ligeramente más importante en el colon proximal (primera y media parte del colon). Con unos 19 casos por cada 100.000 personas, representa el 42 % de los casos. Le sigue el cáncer de recto, con el 28 % de los casos y el colon distal (parte inferior del colon) con una incidencia de 10 casos por cada 100.000 personas.

Anatómicamente, la expresión "cáncer colorrectal" incluye (i) cánceres de colon, tales como cánceres de ciego (incluyendo cánceres de la válvula ileocecal), apéndice, colon ascendente, flexura hepática, colon transversal, flexura esplénica, colon descendente, colon sigmoideo (incluyendo los cánceres de sigmoide (flexura)), así como los cánceres de sitios superpuestos de colon; (ii) cánceres de la unión rectosigmoidea, tales como cánceres de colon y recto y cánceres de rectosigmoide; y (iii) cánceres de recto, tales como cánceres de ampolla rectal.

Preferentemente, el cáncer colorrectal es un cáncer de colon, tal como un cáncer de ciego (incluyendo cáncer de la válvula ileocecal), cáncer de apéndice, cáncer de colon ascendente, cáncer de flexura hepática, cáncer de colon transversal, cáncer de flexura esplénica, cáncer de colon descendente, cáncer de colon sigmoide (incluyendo cánceres de sigmoide (flexura)) o una combinación de los mismos.

También se prefiere que el cáncer colorrectal sea un cáncer de la unión rectosigmoidea, tales como (i) un cáncer de colon y recto o (ii) un cáncer de rectosigmoide.

Adicionalmente, también se prefiere que el cáncer colorrectal sea un cáncer de recto, tal como un cáncer de ampolla rectal.

Con respecto al tipo celular, los cánceres colorrectales incluyen adenocarcinoma colorrectal, tumores del estroma colorrectal, linfoma colorrectal primario, leiomioma colorrectal, melanoma colorrectal, carcinoma colorrectal de células escamosas y tumores carcinoides colorrectales, tales como, por ejemplo, tumores carcinoides del ciego, apéndice, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, colon sigmoide y/o recto. Por lo tanto, los tipos preferidos de cánceres colorrectales incluyen adenocarcinoma colorrectal, tumores del estroma colorrectal, linfoma colorrectal primario, leiomioma colorrectal, melanoma colorrectal, carcinoma colorrectal de células escamosas y tumores carcinoides colorrectales, tales como, por ejemplo, tumores carcinoides del ciego, apéndice, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, colon sigmoide y/o recto. Más preferentemente, el cáncer colorrectal es un adenocarcinoma colorrectal o un carcinoma carcinóide colorrectal. Aún más preferentemente, el cáncer colorrectal es un adenocarcinoma colorrectal.

Más del 95 % de los CRC son adenocarcinomas. Los adenocarcinomas colorrectales normalmente comienzan a partir de células glandulares que producen moco para lubricar el colon o el recto. El CRC normalmente comienza en la capa más interna y puede crecer a través de algunas o todas las demás capas. En casos raros, el CRC podría formarse en un pólipo, lo que facilita su crecimiento en la pared de la región inicial. En estadio avanzado (estadio III y IV), el cáncer viaja a los ganglios linfáticos cercanos o a partes distantes del cuerpo a través de los vasos sanguíneos.

Por ejemplo, en cáncer colorrectal, el sistema de estadificación TNM incluye las siguientes fases para tumores primarios (fases "T"): TX: El tumor primario no puede evaluarse, T0: Sin evidencia de tumor primario, Ta: Carcinoma papilar no invasivo, Tis: Carcinoma *in situ*: intraepitelial o invasión de la lámina propia, T1: El tumor invade la submucosa, T2: El tumor invade la muscular propia, T3: El tumor invade a través de la muscular propia hasta los tejidos pericólicas, T4a: El tumor penetra hasta la superficie del peritoneo visceral y T4b: El tumor invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras; siguientes fases para los ganglios linfáticos (fases "N"): NX: No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales, N0: Sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales, N1: Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales con N1a: Metástasis en 1 ganglio linfático regional, N1b: Metástasis en 2-3 ganglios linfáticos regionales y N1c: Depósito o depósitos tumorales en la subserosa, el mesenterio o los tejidos pericólicos o perirrectales no peritonealizados sin metástasis ganglionar regional, N2: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos con N2a: Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales y N2b: Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales; y las siguientes fases para metástasis a distancia (fases "M"): M0: Sin metástasis a distancia y M1: Metástasis a distancia con M1a: metástasis confinada a 1 órgano o sitio (por ejemplo, hígado, pulmón, ovario, ganglio no regional) y M1b: Metástasis en más de 1 órgano/sitio o el peritoneo. Estas fases pueden integrarse en la siguiente estadificación numérica del cáncer colorrectal: Estadio 0: Tis, N0, M0; Estadio I: T1, N0, M0 o T2, N0, M0; Estadio IIA: T3, N0, M0; Estadio IIB: T4a, N0, M0; Estadio IIC: T4b, N0, M0; Estadio IIIA: T1-T2, N1/N1c, M0 o T1, N2a, M0; Estadio IIIB: T3-T4a, N1/N1c, M0 o T2-T3, N2a, M0 o T1-T2, N2b, M0; Estadio IIIC: T4a, N2a, M0 o T3-T4a, N2b, M0 o T4b, N1-N2, M0; Estadio IVA: cualquier T, cualquier N, M1a y Estadio IVB: cualquier T, cualquier N, M1b. Brevemente, en el Estadio 0, el cáncer no ha crecido más allá de la capa interna del colon o del recto; en el Estadio I el cáncer se ha diseminado desde la mucosa hasta la capa muscular; en el Estadio II el cáncer se ha diseminado a través de la capa muscular hasta los órganos serosos cercanos; en el Estadio III el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos o las células cancerosas se han diseminado a tejidos cercanos a los ganglios linfáticos; y en el Estadio IV el cáncer se ha diseminado a través de la sangre y los ganglios linfáticos a otras partes del cuerpo.

A pesar del término "cáncer", el cáncer colorrectal incluye todos los estadios numéricos descritos anteriormente y, por lo tanto, puede seleccionarse un estadio preferido de cáncer colorrectal del grupo que consiste en Estadio 0 (Tis, N0, M0), Estadio I (T1, N0, M0 o T2, N0, M0), Estadio IIA (T3, N0, M0), Estadio IIB (T4a, N0, M0), Estadio IIC (T4b, N0, M0), Estadio IIIA (T1-T2, N1/N1c, M0 o T1, N2a, M0), Estadio IIIB (T3-T4a, N1/N1c, M0 o T2-T3, N2a, M0 o T1-T2, N2b, M0), Estadio IIIC (T4a, N2a, M0 o T3-T4a, N2b, M0 o T4b, N1-N2, M0), Estadio IVA (cualquier T, cualquier N, M1a) y Estadio IVB (cualquier T, cualquier N, M1b). Más preferentemente, el cáncer colorrectal se selecciona del grupo que consiste en Estadio I (T1, N0, M0 o T2, N0, M0), Estadio IIA (T3, N0, M0), Estadio IIB (T4a, N0, M0), Estadio IIC (T4b, N0, M0), Estadio IIIA (T1-T2, N1/N1c, M0 o T1, N2a, M0), Estadio IIIB (T3-T4a, N1/N1c, M0 o T2-T3, N2a, M0 o T1-T2, N2b, M0), Estadio IIIC (T4a, N2a, M0 o T3-T4a, N2b, M0 o T4b, N1-N2, M0), Estadio IVA (cualquier T, cualquier N, M1a) y Estadio IVB (cualquier T, cualquier N, M1b). Aún más preferentemente, el cáncer colorrectal se selecciona del grupo que consiste en Estadio IIA (T3, N0, M0), Estadio IIB (T4a, N0, M0), Estadio IIC (T4b, N0, M0), Estadio IIIA (T1-T2, N1/N1c, M0 o T1, N2a, M0), Estadio IIIB (T3-T4a, N1/N1c, M0 o T2-T3, N2a, M0 o T1-T2, N2b, M0), Estadio IIIC (T4a, N2a, M0 o T3-T4a, N2b, M0 o T4b, N1-N2, M0), Estadio IVA (cualquier T, cualquier N, M1a) y Estadio IVB (cualquier T, cualquier N, M1b). Lo más preferentemente, el cáncer colorrectal es (i) cáncer colorrectal en Estadio III,

tal como Estadio IIIA (T1-T2, N1/N1c, M0 o T1, N2a, M0), Estadio IIIB (T3-T4a, N1/N1c, M0 o T2-T3, N2a, M0 o T1-T2, N2b, M0) o Estadio IIIC (T4a, N2a, M0 o T3-T4a, N2b, M0 o T4b, N1-N2, M0) o (ii) cáncer colorrectal en Estadio IV, tal como Estadio IVA (cualquier T, cualquier N, M1a) y Estadio IVB (cualquier T, cualquier N, M1b).

5 *Ácido nucleico que codifica los péptidos y complejos proteicos*

En otro aspecto la presente invención proporciona un ácido nucleico, en particular una molécula de ácido nucleico, que codifica el complejo como se describe en el presente documento, en donde el complejo es un polipéptido o una proteína, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal. En particular, la presente invención proporciona polinucleótidos para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal, codificando dichos polinucleótidos el complejo como se define anteriormente. En otras palabras, la presente invención proporciona un ácido nucleico, en particular una molécula de ácido nucleico, que comprende un polinucleótido, en donde el polinucleótido codifica el complejo como se describe en el presente documento y en donde el complejo es un polipéptido o una proteína, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico, en particular una molécula de ácido nucleico, que codifica el complejo de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente, en donde el complejo es un polipéptido o una proteína. En particular, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican el complejo como se define anteriormente. En otras palabras, la presente invención proporciona un ácido nucleico, en particular una molécula de ácido nucleico, que comprende un polinucleótido, en donde el polinucleótido codifica el complejo de acuerdo con la presente invención como se describe en el presente documento y en donde el complejo es un polipéptido o una proteína. Dicho ácido nucleico puede usarse en la prevención y/o el tratamiento del cáncer colorrectal.

Los ácidos nucleicos preferentemente comprenden ácidos nucleicos monocatenarios, bicatenarios o parcialmente bicatenarios, preferentemente seleccionados de ADN genómico, ADNc, ARN, ARNip, ADN antisentido, ARN antisentido, ribozima, secuencias complementarias de ARN/ADN con o sin elementos de expresión, un minigen, fragmentos de genes, elementos reguladores, promotores y combinaciones de los mismos. Otros ejemplos preferidos de ácido nucleico (moléculas) y/o polinucleótidos incluyen, por ejemplo, un polinucleótido recombinante, un vector, un oligonucleótido, una molécula de ARN tal como un ARNr, un ARNm, un miARN, un ARNip o un ARNt o una molécula de ADN como se describió anteriormente. Por lo tanto, se prefiere que el (la molécula de) ácido nucleico sea una molécula de ADN o una molécula de ARN; preferentemente seleccionado de ADN genómico; ADNc; ARNip; ARNr; ARNm; ADN antisentido; ARN antisentido; ribozima; secuencias de ARN y/o ADN complementarias; secuencias de ARN y/o ADN con o sin elementos de expresión, elementos regulatorios y/o promotores; un vector; y combinaciones de los mismos.

La invención se refiere a un ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención, como se define por la reivindicación 24. Si más de un antígeno o epítipo antigénico, que es un polipéptido o proteína, está comprendido por dicho complejo, los más de un antígeno o epítipo antigénico también están unidos covalentemente, opcionalmente con espaciador o espaciadores peptídicos o enlazador o enlazadores como se describe en el presente documento. De forma similar, si dicho complejo comprende más de un agonista peptídico de TLR, los más de un agonistas peptídicos de TLR también están unidos covalentemente, opcionalmente con espaciador o espaciadores peptídicos o enlazador o enlazadores como se describe en el presente documento.

El ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención y como se define por la reivindicación 24 codifica un complejo que es una proteína de fusión (recombinante) que comprende (a) un péptido de penetración celular como se describe anteriormente, (b) al menos uno, preferentemente al menos dos, más preferentemente al menos tres, incluso más preferentemente al menos cuatro, en particular preferentemente al menos cinco, lo más preferentemente al menos seis antígenos o epítopos antigénicos como se describe anteriormente, preferentemente dispuestos de manera consecutiva como se describió anteriormente y (c) al menos un agonista de TLR como se describió anteriormente.

Lo más preferentemente, el (la molécula de) ácido nucleico como se reivindica codifica un complejo ilustrado como se describe en el presente documento o una variante de secuencia funcional del mismo. En consecuencia, el (la molécula de) ácido nucleico comprende más preferentemente un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO: 26 - 28, 33 - 34, 37 - 41, 46, 69 o 72 - 87 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 26 - 28, 33 - 34, 37 - 41, 46, 69 o 72 - 87. En particular, el (la molécula de) ácido nucleico comprende más preferentemente un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO: 26 - 28, 33 - 34, 37 - 41, 46, 69 o 72 - 91 o una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 26 - 28, 33 - 34, 37-41, 46, 69 o 72-91.

Se prefiere particularmente que el (la molécula de) ácido nucleico de acuerdo con la presente invención comprenda

un polinucleótido que codifique una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 89, o una variante de secuencia funcional del mismo que tenga al menos el 50 % de identidad de secuencia (preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 75 %, incluso más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 85 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, en particular preferentemente al menos el 95 % y lo más preferentemente al menos el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia).

Producción y purificación de los complejos

De acuerdo con un aspecto adicional la presente invención proporciona un vector, preferentemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal, en particular un vector recombinante, que comprende un ácido nucleico como se reivindica.

El término "vector", como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a una molécula de ácido nucleico, preferentemente a una molécula de ácido nucleico artificial, es decir, una molécula de ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza. Un vector en el contexto de la presente invención es adecuado para incorporar o albergar una secuencia de ácido nucleico deseada. Dichos vectores pueden ser vectores de almacenamiento, vectores de expresión, vectores de clonación, vectores de transferencia, etc. Un vector de almacenamiento es un vector que permite el almacenamiento conveniente de una molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, el vector puede comprender una secuencia correspondiente, por ejemplo, a un complejo deseado de acuerdo con la presente invención. Puede usarse un vector de expresión para la producción de productos de expresión tales como ARN, por ejemplo, ARNm o péptidos, polipéptidos o proteínas. Por ejemplo, un vector de expresión puede comprender secuencias necesarias para la transcripción de un tramo de secuencia del vector, tal como una secuencia promotora. Un vector de clonación es normalmente un vector que contiene un sitio de clonación, que puede usarse para incorporar secuencias de ácido nucleico en el vector. Un vector de clonación puede ser, por ejemplo, un vector plasmídico o un vector bacteriófago. Un vector de transferencia puede ser un vector que sea adecuado para transferir moléculas de ácido nucleico a células u organismos, por ejemplo, vectores víricos. Un vector en el contexto de la presente invención puede ser, por ejemplo, un vector de ARN o un vector de ADN. Preferentemente, un vector es una molécula de ADN. Por ejemplo, un vector en el sentido de la presente solicitud comprende un sitio de clonación, un marcador de selección, tal como un factor de resistencia a antibióticos, y una secuencia adecuada para la multiplicación del vector, tal como un origen de replicación. Preferentemente, un vector en el contexto de la presente solicitud es un vector plasmídico. Preferentemente, un vector en el contexto de la presente solicitud es un vector de expresión.

Las células transformadas con un vector como se describe anteriormente, preferentemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal, también se incluyen dentro del alcance de la invención. Los ejemplos de tales células incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, por ejemplo, *E. coli* y células eucariotas, por ejemplo, células de levadura, células animales o células vegetales. En una realización, las células son de mamífero, por ejemplo, células de ser humano, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, de mieloma o de hibridoma. En consecuencia, la presente invención también se refiere a una célula que expresa el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; o que comprende el vector (para su uso) de acuerdo con la presente invención.

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

Pueden usarse numerosos sistemas de expresión, incluyendo sin limitación cromosomas, episomas y virus derivados. Más particularmente, el vector como se describe anteriormente, en particular el vector recombinante usado, puede derivar de plásmidos bacterianos, transposones, episomas de levadura, elementos de inserción, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, virus del papiloma tales como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela zorro, virus de la pseudorrabia, retrovirus.

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

El vector, en particular el vector recombinante, también puede incluir secuencias nucleotídicas que controlan la regulación de la expresión, en particular del ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención, así como secuencias nucleotídicas que permiten la expresión, la transcripción y la traducción, en particular del ácido

nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención. Normalmente, estas secuencias se seleccionan de acuerdo con las células hospedadoras usadas.

Por lo tanto, por ejemplo, puede integrarse una señal de secreción apropiada en el vector (para su uso) de acuerdo con la presente invención, en particular en un vector recombinante, de tal manera que el polipéptido o proteína codificada por el ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención, se dirigirá, por ejemplo, hacia la luz del retículo endoplásmico, hacia el espacio periplásmico, en la membrana o hacia el medio extracelular. La elección de una señal de secreción adecuada puede facilitar la posterior purificación de proteínas.

En otro aspecto más la presente invención proporciona una célula hospedadora, preferentemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal, comprendiendo la célula hospedadora comprende un vector, en particular un vector recombinante, como se reivindica.

La introducción del vector, en particular el vector recombinante, en una célula hospedadora puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos que son bien conocidos por un experto en la materia, tales como aquellos descritos en BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis *et al.*, 2ª ed., McGraw-Hill Professional Publishing, 1995 y MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, citados anteriormente, incluyendo, por ejemplo, transfección como se describe anteriormente, por ejemplo, mediante fosfato de calcio, mediante DEAE dextrano o mediante lípidos catiónicos; microinyección, electroporación, transducción o infección.

La célula hospedadora puede ser, por ejemplo, células bacterianas tales como *E. coli*, células de hongos tales como células de levadura y células de *Aspergillus*, *Streptomyces*, células de insecto y/o cualquier línea celular, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), línea celular de ratón C127, línea celular BHK de células de hámster sirio, células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293). Preferentemente, la célula hospedadora (para su uso) de acuerdo con la presente invención es de mamífero, por ejemplo, células de ser humano, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, de mieloma o de hibridoma. Como célula hospedadora se prefieren especialmente células dendríticas y líneas celulares dendríticas. Normalmente, la elección de un medio de cultivo depende en particular de la elección del tipo celular y/o de la línea celular, por lo que la persona experta conoce los medios de cultivo adecuados, que son apropiados para un tipo de célula y/o línea celular seleccionada.

Las células hospedadoras pueden usarse, por ejemplo, para expresar un polipéptido o proteína, en particular el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención, basándose en el vector y/o el ácido nucleico como se describe en el presente documento. Después de la purificación por métodos convencionales, el polipéptido o proteína expresados, en particular el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención, pueden usarse como se describe en el presente documento.

Se desvela (no se reivindica) un método para preparar el complejo como se define en el presente documento, en particular en donde el complejo es un polipéptido o proteína. Dicho método comprende las etapas de:

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

Por lo tanto, el complejo obtenido mediante dicho método es en particular un complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención como se describe en el presente documento.

Para la extracción de proteínas pueden usarse kits y/o reactivos disponibles en el mercado, por ejemplo, BugBuster™ de Novagen.

El método para preparar el complejo como se define en el presente documento puede comprender además la siguiente etapa:

- (iii) solubilización del complejo como se define en el presente documento, por ejemplo, mediante resuspensión en soluciones que contienen urea o clorhidrato de guanidina (GuHCl), en donde la etapa (iii) sigue a la etapa (ii) como se describe anteriormente.

Por otra parte, el método para preparar el complejo como se define en el presente documento puede comprender además la siguiente etapa:

- (iv) purificación del complejo como se define en el presente documento, preferentemente mediante cromatografía de afinidad en una sola etapa, en donde la etapa (iv) sigue a la etapa (ii) o, si está presente, la etapa (iii) como se describe anteriormente.

Además, el complejo como se define en el presente documento también puede prepararse mediante métodos de química sintética, por ejemplo, mediante síntesis de péptidos en fase sólida.

La purificación de esos péptidos o proteínas puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica conocida en la técnica

para la purificación de proteínas/péptidos. Las técnicas ilustrativas incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y métodos de inmunoafinidad.

5 Por lo tanto, se desvela (no se reivindica) un método para preparar el complejo como se define en el presente documento que comprende las etapas de:

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

10 En particular, en el método para preparar un complejo como se define en el presente documento, el complejo sintetizado químicamente en la etapa (i) y purificado en la etapa (ii) comprende una secuencia de aminoácidos como se describe en el presente documento para un péptido de penetración celular, una secuencia de aminoácidos como se describe en el presente documento para un agonista peptídico de TLR y, opcionalmente si el al menos un antígeno y/o epítipo antigénico es un péptido o una proteína, una secuencia de aminoácidos como se describe en el presente documento para un antígeno o epítipo antigénico.

Como alternativa, se desvela (no se reivindica) un método para preparar el complejo como se define en el presente documento, en donde

- 20 (i) el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o fragmento antigénico y/o el al menos un agonista peptídico de TLR se sintetizan por separado;
- (ii) opcionalmente, el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o fragmento antigénico y/o el al menos un agonista peptídico de TLR se purifican; y
- 25 (iii) el péptido de penetración celular, el al menos un antígeno o fragmento antigénico y/o el al menos un agonista peptídico de TLR se enlazan covalentemente como se ha descrito anteriormente, opcionalmente mediante un espaciador o enlazador o mediante un agente reticulante como se describió anteriormente.

Células cargadas con los complejos de acuerdo con la invención

30 En otro aspecto más la presente invención se refiere a una célula cargada con el complejo como se reivindica, preferentemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal. Por ejemplo, las células cargadas con el complejo como se define en el presente documento son células de un sujeto a tratar, en particular células aisladas de un sujeto a tratar, es decir, células aisladas de un sujeto a tratar.

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

40 Como se usa en el contexto de la presente invención, "tratamiento" y "tratar" y similares generalmente significan obtener un efecto farmacológico y fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención o prevención parcial de una enfermedad, un síntoma o una afección del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad, una afección, un síntoma o un efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular en un ser humano, e incluye: (a) evitar que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha ocurrido el brote de la enfermedad y/o la enfermedad aún no ha sido diagnosticada en este sujeto, por ejemplo una intervención preventiva temprana asintomática; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener o frenar su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocando una regresión al menos parcial de la enfermedad y/o de al menos uno de sus síntomas o afecciones tales como mejora o reparación del daño. En particular, los métodos, usos, las formulaciones y composiciones de acuerdo con la invención son útiles en el tratamiento de cánceres o enfermedades infecciosas y/o en la prevención de la evolución de cánceres a un estadio avanzado o metastásico en sujetos con cáncer en estadio temprano, mejorando de esta manera la estadificación del cáncer. Cuando se aplica a los cánceres, la prevención de una enfermedad o trastorno incluye la prevención de la aparición o desarrollo de un cáncer en un individuo identificado como en riesgo de desarrollar dicho cáncer, por ejemplo, debido a la aparición pasada de dicho cáncer en el círculo de familiares del individuo, y a la prevención de la infección con patógenos promotores de tumores tales como, por ejemplo, Virus de Epstein Barr (EBV), Virus del papiloma humano (VPH), Virus de la hepatitis B (HBV), Virus de la hepatitis C (HCV), Virus del herpes humano 8 (HHV8), virus de la leucemia de linfocitos T humana tipo 1 (HTLV-1), Poliomavirus de células de Merkel (MCV) y *Helicobacter pylori*. También está cubierta por los términos "prevención/tratamiento" de un cáncer la estabilización o retraso de un cáncer ya diagnosticado en un individuo. Por "estabilización", se refiere a la prevención de la evolución del cáncer a una etapa avanzada o metastásica en sujetos con cáncer en estadio temprano.

Preferentemente, la célula cargada con el complejo como se define en el presente documento es una célula presentadora de antígenos (APC). Preferentemente, la célula presentadora de antígenos se selecciona del grupo que consiste en una célula dendrítica (DC), un macrófago y un linfocito B. Las células dendríticas, en particular células dendríticas (convencionales y/o plasmocitoides) aisladas de un sujeto a tratar, son más preferidas.

Los métodos para aislar células presentadoras de antígenos, en particular células dendríticas, de un sujeto son conocidos por la persona experta. Incluyen la recolección de monocitos o células madre hematopoyéticas de la médula ósea, sangre del cordón umbilical o sangre periférica. También incluyen el uso de células madre embrionarias (ES) y células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células presentadoras de antígenos, en particular células dendríticas o sus precursores, puede enriquecerse mediante métodos que incluyen elutriación y separación basada en perlas magnéticas, que puede implicar enriquecimiento de células precursoras CD14⁺.

Los métodos para cargar el complejo como se define en el presente documento en las células, preferentemente en las células presentadoras de antígenos mencionadas anteriormente, más preferentemente en células dendríticas, y además preparar dichas células antes de la administración a un sujeto, son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la preparación de células dendríticas puede incluir su cultivo o diferenciación usando citocinas que pueden incluir, por ejemplo, GM-CSF e IL-4. También pueden emplearse líneas de células dendríticas. La carga del complejo de la invención en las células, preferentemente en APC, más preferentemente en las células dendríticas, puede implicar la coincubación del complejo de la invención con las células en cultivo, haciendo uso de las propiedades intrínsecas del péptido de penetración celular comprendido por el complejo como se define en el presente documento (es decir, su capacidad de internalización). El cultivo adicional de las células, por ejemplo, las células dendríticas, cargado de esta manera para inducir una maduración eficiente puede incluir la adición de citocinas incluyendo IL-1 β , IL-6, TNF α , PGE2, IFN α y adyuvantes que pueden incluir poli-IC, poli-ICLC (es decir, un complejo sintético de carboximetilcelulosa, ácido poliinosínico-policitidílico y ARN bicatenario de poli-L-lisina) y otros agonistas de TLR y agonistas de NLR (receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótidos).

Un método para preparar células, en particular células presentadoras de antígenos, cargado con el complejo como se define en el presente documento puede comprender las etapas de:

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

Preferentemente, las células están cargadas con un complejo como se reivindica, en donde el complejo es un polipéptido o una proteína y se usan en la prevención y/o el tratamiento del cáncer colorrectal.

Preferentemente, las células cargadas con uno o más complejos de acuerdo con la invención y usadas en la prevención y/o el tratamiento del cáncer colorrectal presentan al menos un antígeno o epítipo antigénico comprendido por dicho complejo en la superficie celular en un contexto de MHC de clase I y/ o en un contexto MHC de clase II.

Composiciones y kits de acuerdo con la presente invención

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona una composición, preferentemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal, comprendiendo la composición al menos un componente seleccionado de:

- (i) un complejo como se reivindica,
- (ii) un ácido nucleico como se reivindica,
- (iii) un vector como se reivindica,
- (iv) una célula hospedadora como se reivindica y
- (v) una célula cargada con un complejo como se reivindica.

Preferentemente, la composición de acuerdo con la presente invención comprende el complejo como se reivindica.

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

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

anteriormente pueden diferir en que comprenden tales vectores diferentes; y las diferentes células cargadas con un complejo (v) comprendido por la composición descrita anteriormente pueden diferir en que están cargadas con dichos complejos diferentes.

5 La presente invención también proporciona una vacuna, preferentemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal, comprendiendo la vacuna al menos un componente seleccionado de:

- (i) un complejo como se reivindica,
- (ii) un ácido nucleico como se reivindica,
- 10 (iii) un vector como se reivindica,
- (iv) una célula hospedadora como se reivindica y
- (v) una célula cargada con un complejo como se reivindica.

15 Preferentemente, la vacuna (para su uso) de acuerdo con la presente invención comprende el complejo como se reivindica.

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

20 Como se usa en el contexto de la presente invención, el término "vacuna" se refiere a una preparación biológica que proporciona inmunidad innata y/o adaptativa, normalmente a una enfermedad particular, preferentemente cáncer. Por lo tanto, una vacuna soporta en particular una respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa del sistema inmunitario de un sujeto a tratar. Por ejemplo, el antígeno o epítipo antigénico del complejo como se define en el presente documento normalmente conduce o soporta una respuesta inmunitaria adaptativa en el paciente a tratar, y el agonista peptídico de TLR del complejo como se define en el presente documento puede conducir o soportar una respuesta inmunitaria innata.

30 La composición inventiva, en particular la vacuna inventiva, también puede comprender un portador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptables como se definen a continuación para la composición farmacéutica inventiva. En el contexto específico de la composición inventiva, en particular de la vacuna inventiva, la elección de un portador farmacéuticamente aceptable está determinada en principio por la forma en que la composición inventiva, en particular la vacuna inventiva, se administra. La composición inventiva, en particular la vacuna inventiva, puede administrarse, por ejemplo, sistémica o localmente. Las vías de administración sistémica en general incluyen, por ejemplo, vías transdérmica, oral, parenteral, incluyendo inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarteriales, intradérmicas e intraperitoneales y/o vías de administración intranasal. Las vías de administración local en general incluyen, por ejemplo, vías de administración tópica pero también inyecciones intradérmicas, transdérmicas, subcutáneas, intramusculares o inyecciones intralesionales, intracraneales, intrapulmonares, intracardíacas, intraganglionares y sublinguales. Más preferentemente, la composición inventiva, en particular las vacunas, puede administrarse por una vía intradérmica, subcutánea, intraganglionar o intramuscular. Aún más preferentemente, la composición inventiva, en particular la vacuna, puede administrarse por vía subcutánea, intraganglionar o intramuscular. En particular preferentemente, la composición inventiva, en particular las vacunas, puede administrarse por vía subcutánea o intraganglionar. Lo más preferentemente, la composición inventiva, en particular las vacunas, puede administrarse por vía subcutánea. La composición inventiva, en particular las vacunas inventivas, por lo tanto, se formulan preferentemente en forma líquida (o a veces en forma sólida).

La cantidad adecuada de la composición inventiva, en particular la vacuna inventiva, a administrar puede determinarse mediante experimentos rutinarios con modelos animales. Dichos modelos incluyen, sin implicar ninguna limitación, modelos de conejo, oveja, ratón, rata, perro y primate no humano. Las formas de dosis unitarias preferidas para inyección incluyen soluciones estériles de agua, solución salina fisiológica o mezclas de las mismas. El pH de dichas soluciones debe ajustarse a aproximadamente 7,4. Los portadores adecuados para inyección incluyen hidrogeles, dispositivos de liberación controlada o retardada, matrices de ácido poliláctico y colágeno. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para aplicación tópica incluyen aquellos que son adecuados para su uso en lociones, cremas, geles y similares. Si la composición inventiva, en particular la vacuna inventiva, debe administrarse por vía oral, comprimidos, cápsulas y similares son la forma de dosis unitaria preferida. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para la preparación de formas de dosis unitarias que pueden usarse para administración oral son bien conocidos en la técnica anterior. La elección de los mismos dependerá de consideraciones secundarias tales como el sabor, los costes y la capacidad de almacenamiento, que no son críticas para los fines de la presente invención y un experto en la materia puede elaborarlos sin dificultad.

60 La composición inventiva, en particular la vacuna inventiva, puede contener adicionalmente una o más sustancias auxiliares para aumentar aún más su inmunogenicidad. Una acción sinérgica del complejo inventivo como se define anteriormente y de una sustancia auxiliar, que puede estar contenida opcionalmente en la vacuna inventiva como se describe anteriormente, se consigue preferentemente de esta manera. Dependiendo de los distintos tipos de sustancias auxiliares, a este respecto se pueden considerar varios mecanismos. Por ejemplo, los compuestos que permiten la maduración de las células dendríticas (DC), por ejemplo, lipopolisacáridos, TNF-alfa o ligando CD40,

forman una primera clase de sustancias auxiliares adecuadas. En general, puede usarse como sustancia auxiliar cualquier agente que influya en el sistema inmunitario en forma de "señal de peligro" (LPS, GP96, etc.) o citocinas, tales como GM-CSF, que permiten potenciar y/o influir de manera selectiva una respuesta inmunitaria producida por el adyuvante inmunoestimulante de acuerdo con la invención. Las sustancias auxiliares especialmente preferidas son

citocinas, tales como monocinas, linfocinas, interleucinas o quimiocinas, que promueven aún más la respuesta inmunitaria innata, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN-alfa, IFN beta, IFN-gamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta o TNF-alfa, factores de crecimiento, tales como hGH.

Algunos aditivos adicionales que pueden incluirse en la vacuna inventiva son emulsionantes, tales como, por ejemplo, Tween®; agentes humectantes, tales como, por ejemplo, lauril sulfato sódico; agentes colorantes; agentes que imparten sabor, portadores farmacéuticos; agentes formadores de comprimidos; estabilizantes; antioxidantes; conservantes.

La composición inventiva, en particular la vacuna inventiva, también puede contener adicionalmente cualquier compuesto adicional, que se sabe que estimula el sistema inmunitario debido a su afinidad de unión (como ligandos) a los receptores tipo Toll humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, o debido a su afinidad de unión (como ligandos) a los receptores tipo Toll murinos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13.

Otra clase de compuestos, que pueden añadirse a una composición inventiva, en particular a una vacuna inventiva, en este contexto, pueden ser ácidos nucleicos CpG, en particular ARN-CpG o ADN-CpG. Un ARN-CpG o ADN-CpG puede ser un ADN-CpG monocatenario (ADN-CpG mc), un ADN-CpG bicatenario (ADNbc), un ARN-CpG monocatenario (ARN-CpG mc) o un ARN-CpG bicatenario (ARN-CpG bc). El ácido nucleico CpG está preferentemente en forma de ARN-CpG, más preferentemente en forma de ARN-CpG monocatenario (ARN-CpG mc). El ácido nucleico CpG contiene preferentemente al menos una o más secuencia o secuencias (mitógenas) de dinucleótidos de citosina/guanina (motivos CpG). De acuerdo con una primera alternativa preferida, al menos un motivo CpG contenido en estas secuencias, en particular la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG, está desmetilado. Todas las citosinas o guaninas adicionales contenidas opcionalmente en estas secuencias pueden estar metiladas o no metiladas. De acuerdo con una alternativa preferida adicional, sin embargo, la C (citosina) y la G (guanina) del motivo CpG también pueden estar presentes en forma metilada.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica, preferentemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal, en particular una composición de vacuna como se reivindica. El uso en un método para tratar un sujeto, preferentemente un sujeto mamífero, y más preferentemente un sujeto humano, que padece cáncer colorrectal, se describe en el presente documento.

En particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica (para su uso) en la prevención y/o el tratamiento del cáncer colorrectal que comprende al menos un complejo como se reivindica o al menos una célula cargada con un complejo como se reivindica, y opcionalmente un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable o cualquier excipiente, tampón, estabilizante u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia, en particular la composición farmacéutica que comprende al menos un complejo como se reivindica o al menos una célula cargada con un complejo como se reivindica y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como un ingrediente adicional, la composición farmacéutica inventiva puede comprender en particular un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la presente invención, un portador farmacéuticamente aceptable incluye normalmente la base líquida o no líquida de la composición farmacéutica inventiva. Si la composición farmacéutica inventiva se proporciona en forma líquida, el vehículo será normalmente agua apirógena; soluciones salinas isotónicas o tamponadas (acuosas), por ejemplo, soluciones tamponadas con fosfato, citrato, etc. Particularmente para inyección de la composición farmacéutica inventiva, puede usarse agua o preferentemente un tampón, más preferentemente un tampón acuoso, que contiene una sal sódica, preferentemente al menos 30 mM de una sal sódica, una sal de calcio, preferentemente al menos 0,05 mM de una sal de calcio y, opcionalmente, una sal potásica, preferentemente al menos 1 mM de una sal potásica. De acuerdo con una realización preferida, las sales de sodio, calcio y, opcionalmente, de potasio pueden presentarse en forma de sus halogenuros, por ejemplo, cloruros, yodos o bromuros, en forma de sus hidróxidos, carbonatos, hidrógeno carbonatos o sulfatos, etc. Sin quedar limitado a los mismos, los ejemplos de sales sódicas incluyen, por ejemplo, NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, los ejemplos de sales potásicas opcionales incluyen, por ejemplo, KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄ y los ejemplos de sales de calcio incluyen, por ejemplo, CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. Adicionalmente, en el tampón pueden estar contenidos aniones orgánicos de los cationes mencionados anteriormente. De acuerdo con una realización más preferida, el tampón adecuado para fines de inyección como se define anteriormente, puede contener sales seleccionadas de cloruro sódico (NaCl), cloruro cálcico (CaCl₂) y opcionalmente cloruro potásico (KCl), en donde pueden estar presentes más aniones adicionales a los cloruros. CaCl₂ también puede reemplazarse por otra sal como KCl. Normalmente, las sales en el tampón de inyección están presentes en una concentración de al menos 30 mM de cloruro sódico (NaCl), al menos 1 mM de cloruro potásico (KCl) y al menos 0,05 mM de cloruro cálcico (CaCl₂). El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico con referencia al medio de referencia específico, es decir, el tampón puede tener un contenido de sal mayor, idéntico o inferior con respecto al medio de referencia

específico, en donde preferentemente pueden usarse tales concentraciones de las sales mencionadas anteriormente, que no provocan daños en las células debido a la ósmosis u otros efectos de concentración. Los medios de referencia son, por ejemplo, líquidos que se encuentran en métodos "*in vivo*", tales como sangre, linfa, líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, o, por ejemplo, líquidos, que pueden usarse como medio de referencia en métodos "*in vitro*", tales como tampones o líquidos comunes. Los expertos en la materia conocen tales tampones o líquidos comunes. Se prefieren particularmente como base líquida solución salina (NaCl al 0,9 %) y solución Ringer-Lactato.

Preferentemente, la composición farmacéutica, que comprende el complejo como se describe en el presente documento, comprende además arginina, tal como L-arginina.

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

La composición farmacéutica inventiva puede administrarse por vía oral, por vía parenteral, por pulverización por inhalación, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal o a través de un depósito implantado. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intraarterial, intraganglionar y sublingual. Preferentemente, la composición farmacéutica inventiva puede administrarse por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraganglionar o por vía subcutánea. Más preferentemente la composición farmacéutica inventiva puede administrarse por vía intramuscular, por vía intraganglionar o por vía subcutánea. Aún más preferentemente la composición farmacéutica inventiva puede administrarse por vía intraganglionar o por vía subcutánea. Lo más preferentemente, la composición farmacéutica inventiva puede administrarse por vía subcutánea. También se prefiere particularmente que la composición farmacéutica inventiva pueda administrarse por vía subcutánea o por vía intradérmica.

Preferentemente, la composición farmacéutica inventiva puede administrarse por inyección parenteral, más preferentemente por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional, intracraneal, transdérmica, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intraarterial, intraganglionar y sublingual o a través de técnicas de infusión. Las formas inyectables estériles de las composiciones farmacéuticas inventivas pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se usan convencionalmente aceites no volátiles estériles como un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin, puede usarse cualquier aceite no volátil suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleaginosas también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, tales como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos usados comúnmente, tales como los Tween, Span y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan habitualmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras formas de dosificación también pueden usarse para los fines de formulación de la composición farmacéutica inventiva.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el sitio de aflicción, el principio activo estará preferentemente en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, sin pirógenos y con pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos pertinentes en la materia serán bien capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactada. Los conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos pueden incluirse, según

se requiera. Ya sea un polipéptido, péptido o molécula de ácido nucleico, otro compuesto farmacéuticamente útil de acuerdo con la presente invención que se va a administrar a un individuo, la administración se realiza preferentemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso), que es suficiente para mostrar un beneficio al individuo. La cantidad real administrada y la velocidad y la evolución temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando.

La composición farmacéutica inventiva como se define anteriormente también puede administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo, pero no limitado a, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para su uso oral, los portadores comúnmente usados incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, también se añaden normalmente. Para la administración oral en forma de una cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz deshidratado. Cuando se requieren suspensiones acuosas para su uso oral, el principio activo, es decir, la molécula conjugada de carga transportadora inventiva como se define anteriormente, se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

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

En este contexto, la prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc. cuando se usa la composición farmacéutica anterior normalmente son responsabilidad de los médicos generales y otros médicos, y normalmente tienen en cuenta el trastorno que se va a tratar, el estado del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. Pueden encontrarse ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16ª edición, Osol, A. (ed), 1980.

En consecuencia, la composición farmacéutica de la invención normalmente comprende una "cantidad segura y eficaz" de los componentes de la composición farmacéutica de la invención, en particular del complejo como se define en el presente documento como se define anteriormente y/o células cargadas con dicho complejo. Como se usa en el presente documento, una "cantidad segura y eficaz" significa una cantidad del complejo como se define en el presente documento que es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva de una enfermedad o trastorno, es decir, una cantidad del complejo como se define en el presente documento o células cargadas con dicho complejo, que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, un sistema, un animal o un ser humano que se esté buscando. Una cantidad eficaz puede ser una "cantidad terapéuticamente eficaz" para el alivio de los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando y/o una "cantidad profilácticamente eficaz" para la profilaxis de los síntomas de la enfermedad o afección que se está previniendo. El término también incluye la cantidad de complejo activo suficiente para reducir la progresión de la enfermedad, en particular para reducir o inhibir el crecimiento tumoral o la infección y provocar así la respuesta que se busca, en particular, dicha respuesta podría ser una respuesta inmunitaria dirigida contra los antígenos o epítomos antigénicos comprendidos en el complejo (es decir, una "cantidad eficaz para la inhibición"). Al mismo tiempo, sin embargo, una "cantidad segura y eficaz" es lo suficientemente pequeña como para evitar efectos secundarios graves, es decir, permitir una relación sensata entre ventaja y riesgo. La determinación de estos límites normalmente cae dentro del alcance del juicio médico sensato. Una "cantidad segura y eficaz" de los componentes de la composición farmacéutica inventiva, particularmente del complejo como se define en el presente documento como se define anteriormente, variará adicionalmente con respecto a la afección particular a tratar y también con la edad y condición física del paciente a tratar, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la actividad de los componentes específicos a), b) y c) del complejo como se define en el presente documento como se define anteriormente, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia de acompañamiento, del portador farmacéuticamente aceptable particular usado y factores similares, dentro del conocimiento y experiencia del médico acompañante. La composición farmacéutica inventiva puede usarse con fines médicos humanos y también veterinarios, preferentemente para fines médicos humanos, como una composición farmacéutica en general o como una vacuna.

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

Las expresiones "formulación farmacéutica" y "composición farmacéutica" como se usan en el contexto de la presente invención se refieren en particular a preparaciones que están en una forma que permite que la actividad biológica del principio o principios activos sea inequívocamente eficaz y que contienen ningún componente adicional que sería tóxico para los sujetos a los que se administraría dicha formulación.

En el contexto de la presente invención, puede medirse una "eficacia" de un tratamiento basándose en cambios en el curso de una enfermedad en respuesta a un uso o método de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, la eficacia de un tratamiento del cáncer puede medirse mediante una reducción del volumen del tumor y/o un aumento del tiempo de supervivencia libre de progresión y/o una disminución del riesgo de recaída después de la resección del cáncer primario. Más específicamente para el cáncer tratado con inmunoterapia, la evaluación de la eficacia puede realizarse mediante el espectro de patrones clínicos de respuesta antitumoral para agentes inmunoterapéuticos a través de novedosos criterios de respuesta inmunitaria (irRC), que están adaptados de los Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) y los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (J. Natl. Cancer Inst. 2010, 102(18): 1388-1397). La eficacia de la prevención de enfermedades infecciosas se evalúa en última instancia mediante estudios epidemiológicos en poblaciones humanas, que a menudo se correlaciona, con títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros e inducción de respuestas de linfocitos T específicos de patógenos multifuncionales. La evaluación preclínica puede incluir la resistencia a la infección después de la exposición a un patógeno infeccioso. El tratamiento de una enfermedad infecciosa puede medirse mediante la inhibición del crecimiento del patógeno o la eliminación del patógeno (y, por lo tanto, la ausencia de detección del patógeno), correlacionándose con anticuerpos específicos de patógenos y/o respuestas inmunitarias de linfocitos T.

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

La vacuna y/o la composición (para su uso) de acuerdo con la presente invención también pueden formularse como composiciones farmacéuticas y dosificaciones unitarias de las mismas, en particular junto con un adyuvante, material inmunomodulador, portador, diluyente o excipiente empleado convencionalmente como se describe anteriormente y a continuación, y en tal forma puede emplearse como sólidos, como comprimidos o cápsulas cargadas o líquidos tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires o cápsulas rellenas con los mismos, todos para su uso oral, o en forma de soluciones inyectables estériles para su uso parenteral (incluyendo subcutáneo e intradérmico) mediante inyección o infusión continua.

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

Los ejemplos de adyuvantes y/o materiales inmunomoduladores adecuados en el contexto de la presente invención incluyen MPL® (Corixa), minerales a base de aluminio, incluyendo compuestos de aluminio (genéricamente llamados Alumbre), ASO1-4, MF59, Fosfato cálcico, Liposomas, Iscom, ácido poliinosínico:policitidílico (poliIC), incluyendo su forma estabilizada poli-ICLC (Hiltonol), oligodesoxinucleótidos CpG, Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), lipopolisacárido (LPS), Montanide, polilactida co-glucólido (PLG), Flagelina, Saponinas de árbol de corteza de jabón (QS21), compuestos de aminoalquilglucosamida (por ejemplo, RC529), péptidos antibacterianos de dos componentes con oligodesoxinucleótidos sintéticos (por ejemplo, IC31), Imiquimod, Resiquimod, Secuencias inmunoestimuladoras (ISS), monofosforil lípido A (MPLA), Lipopéptido estimulante de fibroblastos (FSL1) y anticuerpos anti-CD40.

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

Las composiciones, en particular composiciones farmacéuticas y vacunas, (para su uso) de acuerdo con la presente invención también pueden formularse como una preparación de depósito, que puede administrarse mediante implante

o mediante inyección intramuscular.

Las composiciones, en particular composiciones farmacéuticas y vacunas, (para su uso) de acuerdo con la presente invención también pueden ser composiciones sólidas, que pueden estar en forma de comprimidos o pastillas para chupar formulados de forma convencional. Por ejemplo, los comprimidos y las cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales que incluyen, pero no limitado a, agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes y agentes humectantes. Los agentes aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón y polivinilpirrolidona. Las cargas incluyen, pero no se limitan a, lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato cálcico y sorbitol. Los lubricantes incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol y sílice.

Los disgregantes incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata y glicolato sódico de almidón. Los agentes humectantes incluyen, pero no se limitan a, laurilsulfato sódico. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Las composiciones, en particular composiciones farmacéuticas y vacunas, (para su uso) de acuerdo con la presente invención también pueden administrarse en formas de liberación sostenida o desde sistemas de administración de fármacos de liberación sostenida.

Por otra parte, las composiciones, en particular composiciones farmacéuticas y vacunas, (para su uso) de acuerdo con la presente invención puede adaptarse para su administración mediante administración repetida.

Los materiales adicionales así como técnicas de procesamiento de formulaciones y similares, que son útiles en el contexto de composiciones, en particular composiciones farmacéuticas y vacunas, (para su uso) de acuerdo con la presente invención o en el contexto de su preparación se establecen en la "Parte 5 de "The Science and Practice of Pharmacy" de Remington", 22ª Edición, 2012, University of the Sciences en Filadelfia, Lippincott Williams & Wilkins".

También se desvela (no se reivindica) un kit de partes, preferentemente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal, comprendiendo el kit de partes al menos uno de:

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

En particular, el kit de partes de la divulgación puede comprender más de un componente (i) a (v). Por ejemplo, el kit de partes de acuerdo con la presente divulgación puede comprender al menos dos complejos diferentes según (i), al menos dos ácidos nucleicos diferentes según (ii), al menos dos vectores diferentes según (iii), al menos dos células hospedadoras diferentes según (iv) y/o al menos dos células diferentes según (v); por ejemplo, el kit de partes de la invención puede comprender al menos dos complejos diferentes (i) y/o al menos dos ácidos nucleicos diferentes (ii).

Por ejemplo, los diferentes complejos (i) comprendidos en el kit de partes descrito anteriormente pueden diferir en cualquiera del componente a), es decir, en los péptidos de penetración celular, en el componente (b), es decir, en los antígenos o epítomos antigénicos o en los subconjuntos de más de un antígeno o epítomo antigénico o en el componente c), es decir, en el agonista peptídico de TLR o en el subconjunto de más de un agonista peptídico de TLR; o los diferentes complejos (i) comprendidos por el kit de partes descrito anteriormente pueden diferir en dos de los tres componentes a), b) y c); o los diferentes complejos (i) comprendidos por el kit de partes descrito anteriormente pueden diferir en los tres componentes a), b) y c) del complejo. En consecuencia, los diferentes ácidos nucleicos (ii) comprendidos en el kit de partes descrito anteriormente pueden diferir en que codifican dichos complejos diferentes; los diferentes vectores (iii) comprendidos por el kit de partes descrito anteriormente pueden diferir en que comprenden dichos ácidos nucleicos diferentes; las diferentes células hospedadoras (iv) comprendidas por el kit de partes descrito anteriormente pueden diferir en que comprenden tales vectores diferentes; y las diferentes células cargadas con un complejo (v) comprendido por el kit de partes descrito anteriormente pueden diferir en que están cargadas con dichos complejos diferentes.

Los diversos componentes del kit de piezas pueden empaquetarse en uno o más recipientes. Los componentes anteriores pueden proporcionarse en forma liofilizada o seca o disueltos en un tampón adecuado. El kit también puede comprender reactivos adicionales incluyendo, por ejemplo, conservantes, medios de crecimiento y/o tampones para almacenamiento y/o reconstitución de los componentes mencionados anteriormente, soluciones de lavado y similares. Además, el kit de partes de acuerdo con la presente divulgación puede contener opcionalmente instrucciones de uso.

Por otra parte, la presente divulgación también proporciona un kit de vacunación (no reivindicado) para tratar, prevenir y/o estabilizar el cáncer colorrectal, que comprende la composición farmacéutica como se describe en el presente documento o una vacuna como se describe en el presente documento e instrucciones para el uso de dicha composición farmacéutica o de dicha vacuna en la prevención y/o el tratamiento del cáncer colorrectal.

Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona un kit (no reivindicado) que comprende el complejo como se describe en el presente documento, la célula como se describe en el presente documento, la composición como se describe en el presente documento, la vacuna como se describe en el presente documento y/o la composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

En particular, dicho kit comprende además un prospecto o un folleto de instrucciones con instrucciones para tratar el cáncer colorrectal usando el complejo (para su uso) como se describe en el presente documento, la célula como se describe en el presente documento, la composición como se describe en el presente documento, la vacuna como se describe en el presente documento y/o la composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

Además de cualquiera de los componentes (i) - (v) como se describe anteriormente, el kit puede comprender un agente quimioterapéutico, un fármaco dirigido y/o un agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario, como se describe en el presente documento en el contexto de la combinación para su uso como se describe en el presente documento.

Uso y uso en métodos de acuerdo con la invención

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de uno cualquiera de: (i) un complejo como se reivindica y/o (ii) células, tales como células presentadoras de antígenos, cargadas con un complejo como se reivindica, para la prevención, el tratamiento o la estabilización del cáncer colorrectal. En consecuencia, la presente invención proporciona uno cualquiera de: (i) un complejo como se reivindica y/o (ii) células, tales como células presentadoras de antígenos, cargadas con un complejo como se reivindica, para su uso en la prevención, el tratamiento o la estabilización del cáncer colorrectal.

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

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un uso en el método de prevención, tratamiento o represión de cáncer colorrectal, en donde dicho método comprende administrar uno cualquiera de: (i) un complejo de la invención, (ii) células, tales como células presentadoras de antígenos, cargadas con un complejo de la invención o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii), a dicho sujeto.

Por otra parte, la presente divulgación (no reivindicada) proporciona un método para provocar o mejorar, en un sujeto, una respuesta inmunitaria contra uno o múltiples epítomos que es dependiente de linfocitos T auxiliares CD4⁺ y/o linfocitos T citotóxicos CD8⁺, en donde dicho método comprende administrar uno cualquiera de: (i) un complejo para su uso como se describe en el presente documento y/o (ii) células, tales como células presentadoras de antígenos, cargadas con dicho complejo o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii), a dicho sujeto.

Una respuesta inmunitaria que es dependiente de la respuesta CD4⁺ y/o CD8⁺ puede determinarse evaluando una respuesta inflamatoria, una respuesta de citocinas proinflamatorias, incluyendo un aumento en la expresión de uno o más de ARNm o proteína de IFN- γ , TNF- α e IL-2 con respecto al nivel antes de la administración de los compuestos de la invención. También puede medirse mediante un aumento en la frecuencia o el número absoluto de linfocitos T específicos de antígeno después de la administración de los compuestos de la invención, medido mediante tinción de multímero de péptido HLA, ensayos ELISPOT y pruebas de hipersensibilidad de tipo retardado. También puede medirse indirectamente mediante un aumento de anticuerpos séricos específicos de antígeno que dependen de los linfocitos T colaboradores específicos de antígeno.

La presente divulgación (no reivindicada) también proporciona un método para provocar o mejorar, en un sujeto, una respuesta inmunitaria contra uno o múltiples antígenos o epítomos antigénicos que está restringida por múltiples moléculas de MHC de clase I y/o múltiples moléculas de MHC de clase II, en donde dicho método comprende administrar uno cualquiera de: (i) un complejo para su uso como se describe en el presente documento y/o (ii) células, tales como células presentadoras de antígenos, cargadas con dicho complejo o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii), a dicho sujeto.

Un método para provocar o mejorar, en un sujeto, una respuesta inmunitaria contra múltiples epítomos (no reivindicados) como se describe en el presente documento, que está restringida por múltiples moléculas de MHC de clase I y/o múltiples moléculas de MHC de clase II puede determinarse evaluando una respuesta de citocinas, incluyendo un aumento en la expresión de uno o más de ARNm o proteína de IFN- γ , TNF- α e IL-2 con respecto al nivel antes de la administración de los compuestos de la invención, después de la estimulación *in vitro* de linfocitos T con péptidos individuales que se unen a moléculas discretas de MHC de clase I y clase II sobre células presentadoras de antígenos. La restricción a diferentes moléculas de MHC también puede validarse mediante el uso de células presentadoras de antígenos que expresen diferentes moléculas de MHC o mediante el uso de anticuerpos bloqueadores de MHC. También puede medirse mediante un aumento en la frecuencia o el número absoluto de

linfocitos T específicos de antígeno después de la administración de los compuestos de la invención, medido mediante tinción de multímero de péptido HLA, que usa multímeros ensamblados con moléculas MHC discretas.

Específicamente, en los métodos para provocar o mejorar una respuesta inmunitaria contra uno o múltiples antígenos o epítomos antigénicos de acuerdo con la presente invención, la respuesta inmunitaria se dirige contra uno o múltiples epítomos de un antígeno asociado a tumores o un antígeno específico de tumores como, por ejemplo, una combinación de epítomos como se describe en el presente documento.

Como alternativa o adicionalmente, la respuesta inmunitaria puede dirigirse contra múltiples epítomos de una proteína antigénica de un patógeno.

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

En particular, la presente invención proporciona de esta manera el uso en un método para prevenir y/o tratar el cáncer colorrectal o iniciar en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto un complejo que comprende:

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

- en donde los componentes a) - c) están unidos covalentemente,
- en donde el agonista del péptido TLR es un agonista del péptido TLR2 y/o un agonista del péptido TLR4, y
- en donde el complejo es un polipéptido o una proteína, en particular un polipéptido recombinante o una proteína recombinante.

El uso en un método tal se prefiere que el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención como se describe en el presente documento, el ácido nucleico como se describe en el presente documento, la célula como se describe en el presente documento, la composición como se describe en el presente documento, la vacuna como se describe en el presente documento y/o la composición farmacéutica como se describe en el presente documento se administre al sujeto.

Preferentemente, el sujeto tiene cáncer colorrectal y/o fue diagnosticado con cáncer colorrectal.

La presente divulgación proporciona el uso de uno cualquiera de: (i) un complejo como se describe en el presente documento y/o (ii) células, tales como células presentadoras de antígenos, cargadas con el complejo como se describe en este documento, para la preparación de una composición de formación de imágenes para técnicas de formación de imágenes en el contexto de (diagnóstico de) cáncer colorrectal o para la preparación de una composición de diagnóstico ("composiciones de diagnóstico") para diagnosticar el cáncer colorrectal (no reivindicado). Una composición de diagnóstico para diagnosticar cáncer colorrectal de acuerdo con la presente divulgación (no reivindicada) comprende al menos un componente seleccionado de:

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

Específicamente, la composición de diagnóstico de acuerdo con la presente invención comprende el complejo como se describe anteriormente.

En particular, el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico como se describe en el presente documento, la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva o la composición de diagnóstico pueden utilizarse en el diagnóstico como una herramienta de diagnóstico (no reivindicada), por ejemplo, en ensayos (*in vivo* o *in vitro*), por ejemplo, en inmunoensayos, para detectar, pronosticar, diagnosticar o controlar el cáncer colorrectal.

Como un ejemplo, los ensayos (*in vitro*) pueden realizarse (no reivindicado) suministrando el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención, la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención, la composición inventiva, la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva o la composición de diagnóstico a células diana normalmente seleccionadas de, por ejemplo, células animales cultivadas, células humanas o microorganismos, y monitorizando la respuesta celular mediante métodos biofísicos normalmente conocidos por una persona experta. Las células diana normalmente usadas en los mismos pueden ser células cultivadas (*in vitro*), por ejemplo, células aisladas del cuerpo humano o animal, tales como

células sanguíneas aisladas del cuerpo humano o animal, o células *in vivo*, es decir, células que componen los órganos o tejidos de animales vivos o humanos, o microorganismos que se encuentran en animales vivos o humanos. Son particularmente preferibles en este contexto los llamados marcadores o etiquetas, que pueden estar contenidos en el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención y, en particular, en la composición de diagnóstico de acuerdo con la presente divulgación (no reivindicada).

La divulgación proporciona un método para diagnosticar cáncer colorrectal en un sujeto (no reivindicado), en donde dicho método comprende administrar uno cualquiera de: (i) un complejo de la invención, (ii) células, tales como células presentadoras de antígenos, cargadas con el complejo de la invención o (iii) una formulación farmacéutica de (i) a (ii), a dicho sujeto o a la muestra de dicho sujeto *ex vivo*.

Preferentemente, los usos y métodos de uso de acuerdo con la presente invención comprenden la administración de un complejo (para su uso) de acuerdo con la invención.

Por otra parte, los usos y el uso en métodos de acuerdo con la presente invención comprenden la administración de más de un complejo, células o formulación farmacéutica de acuerdo con la invención. Por ejemplo, en los usos y el uso en métodos de acuerdo con la presente invención, se usan o se administran al menos dos complejos diferentes, en donde cada complejo comprende al menos un antígeno o epítipo antigénico y dicho antígeno o epítipo antigénico o (si dicho complejo comprende más de un antígeno o epítipo antigénico) dicho subconjunto de antígenos o epítopos antigénicos son diferentes entre los dos complejos.

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

Por otra parte, en los usos y el uso en métodos de acuerdo con la presente invención, las células de acuerdo con la presente invención pueden ser células presentadoras de antígenos, en particular células dendríticas, más preferentemente células dendríticas del sujeto a tratar.

Modo de administración

El complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden administrarse de cualquier manera como se describe anteriormente, incluyendo por vía enteral, tal como por vía oral o por vía rectal, y por vía parenteral, tal como por vía intravenosa o combinaciones de los mismos. La administración parenteral incluye, pero no se limita a, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica e intramuscular. Preferentemente, el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo para su uso de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva y/o la vacuna inventiva se administran a través de una vía de administración enteral, tal como oral, sublingual y rectal. El complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico ((para su uso)) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva también pueden administrarse preferentemente a través de vía tópica, intratumoral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intranasal o intraganglionar. El complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico ((para su uso)) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva también pueden administrarse en forma de un implante, lo que permite una liberación lenta de las composiciones así como infusión i.v. controlada lenta. Por ejemplo, el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden administrarse por vía subcutánea o por vía intradérmica.

La administración del complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico (para su uso) de

acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva puede requerir múltiples inyecciones/administraciones sucesivas. Por lo tanto, la administración puede repetirse al menos dos veces, por ejemplo, una vez como inyecciones/administración de inmunización primaria y, más tarde, como inyecciones/administración de refuerzo.

En particular, el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden administrarse de forma repetida o de forma continua. El complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden administrarse de forma repetida o de forma continua durante un período de al menos 1, 2, 3 o 4 semanas; 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 o 12 meses; o 2, 3, 4 o 5 años. Por ejemplo, el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención puede administrarse dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, una vez por semana, cada dos semanas, cada tres semanas, una vez al mes o cada dos meses. Preferentemente, el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención puede administrarse repetidamente, por ejemplo, una vez por semana o (una vez) cada dos semanas.

Por otra parte, el péptido de penetración celular, los componentes a), b) y c), es decir, el al menos un antígeno o epítipo antigénico y el al menos un agonista peptídico de TLR, que compone el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención puede estar contenido en composiciones separadas que se mezclan justo antes de la administración o que se administran simultáneamente al sujeto que lo necesita.

De acuerdo con un enfoque, el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden administrarse directamente a un paciente usando las rutas de administración descritas anteriormente, en particular para composiciones farmacéuticas. Como alternativa, el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden administrarse a un paciente usando un enfoque *ex vivo*, por ejemplo, introduciendo la composición farmacéutica, la vacuna o la molécula conjugada de carga transportadora inventiva como se definió anteriormente en células, preferentemente células autólogas, es decir, células derivadas del paciente a tratar y trasplantar estas células al sitio del paciente a tratar, opcionalmente después del almacenamiento y/o cultivo de estas células antes del tratamiento.

La dosificación administrada, como dosis únicas o múltiples, a un individuo variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo propiedades farmacocinéticas, condiciones y características del sujeto (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), extensión de los síntomas, tratamientos simultáneos, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

Normalmente, para el tratamiento del cáncer, la dosis terapéuticamente eficaz de un complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención es de aproximadamente 0,01 mg a 5 mg por inyección, en particular de aproximadamente 0,1 mg a 2 mg por inyección, o de aproximadamente 0,01 nmol a 1 mmol por inyección, en particular de 1 nmol a 1 mmol por inyección, preferentemente de 1 μ mol a 1 mmol por inyección.

Normalmente, para el tratamiento del cáncer, la dosis terapéuticamente eficaz de una célula presentadora de antígenos cargada con un complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención es de aproximadamente 0,2 millones de células a 2 millones de células por inyección.

Terapia de combinación

La administración del complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva en el uso en métodos y para sus usos de acuerdo con la invención pueden llevarse a cabo solas o en combinación con un coagente útil para tratar y/o estabilizar el cáncer colorrectal.

Por ejemplo, en el caso de tratamiento, prevención o estabilización de un cáncer colorrectal, la administración de las composiciones farmacéuticas en los métodos y usos de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en combinación con sustancias usadas en la quimioterapia convencional dirigida contra tumores colorrectales sólidos y para el control del establecimiento de metástasis o cualquier otra molécula que actúe desencadenando la muerte celular programada, por ejemplo, un coagente seleccionado de miembros de la familia de necrosis tumoral incluyendo, pero no limitado, al ligando Fas y al ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL). De acuerdo con una realización adicional, la administración del complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula

presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva para su uso en los métodos y para sus usos de acuerdo con la presente invención pueden llevarse a cabo en paralelo a la radioterapia.

La invención abarca la administración del complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; el ácido nucleico (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva, en donde se administra a un sujeto antes de, simultánea o secuencialmente con otros regímenes terapéuticos o coagentes útiles para tratar y/o estabilizar un cáncer colorrectal y/o prevenir la recaída del cáncer colorrectal (por ejemplo, regímenes de múltiples medicamentos), en una cantidad terapéuticamente eficaz. Dicho complejo, célula, composición, vacuna o composición farmacéutica, que se administra simultáneamente con dichos coagentes puede administrarse en la misma o diferentes composición o composiciones y por la misma o diferentes vía o vías de administración.

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

En consecuencia, la presente invención también proporciona una combinación de

- (i) un complejo como se reivindica; y
- (ii) un agente quimioterapéutico, un fármaco dirigido y/o un agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario.

Puede usarse en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal.

Los agentes quimioterapéuticos tradicionales son citotóxicos, es decir, actúan destruyendo células que se dividen rápidamente, una de las principales propiedades de la mayoría de las células cancerosas. Los agentes quimioterapéuticos preferidos para combinación con el complejo como se define en el presente documento son agentes quimioterapéuticos conocidos por la persona para el tratamiento del cáncer colorrectal. Los agentes quimioterapéuticos preferidos para combinación incluyen 5-Fluorouracilo (5-FU), Capecitabina (Xeloda®), Irinotecán (Camptosar®) y Oxaliplatino (Eloxatin®). También se prefiere que el complejo como se define en el presente documento se combine con una quimioterapia combinada, preferentemente seleccionada de (i) FOLFOX (5-FU, leucovorina y oxaliplatino); (ii) CapeOx (Capecitabina y Oxaliplatino); (iii) 5-FU y leucovorina; (iv) FOLFOXIRI (leucovorina, 5-FU, oxaliplatino e irinotecán); y (v) FOLFIRI (5-FU, leucovorina e irinotecán). En el cáncer no diseminado, una combinación con (i) FOLFOX (5-FU; leucovorina y oxaliplatino); (ii) CapeOx (Capecitabina y Oxaliplatino); o (iii) 5-FU y leucovorina se prefiere. Para el cáncer que se ha diseminado, una combinación con (iv) FOLFOXIRI (leucovorina, 5-FU, oxaliplatino e irinotecán); (i) FOLFOX (5-FU, leucovorina y oxaliplatino); o (v) FOLFIRI (5-FU, leucovorina e irinotecán) se prefiere.

Los fármacos dirigidos para combinación con el complejo como se define en el presente documento para el tratamiento del cáncer colorrectal incluyen fármacos dirigidos a VEGF y fármacos dirigidos a EGFR. Los ejemplos preferidos de fármacos dirigidos a VEGF incluyen Bevacizumab (Avastin®), ramucirumab (Cyramza®) o ziv-aflibercept (Zaltrap®). Los ejemplos preferidos de fármacos dirigidos a EGFR incluyen Cetuximab (Erbix®), panitumumab (Vectibix®) o Regorafenib (Stivarga®).

Los agentes inmunoterapéuticos para combinación con el complejo como se define en el presente documento para el tratamiento del cáncer colorrectal incluyen vacunas, receptores de antígenos quiméricos (CAR), moduladores de puntos de control y terapias con virus oncolíticos.

Las vacunas preferidas para combinación con el complejo como se define en el presente documento para el tratamiento del cáncer colorrectal incluyen TroVax, OncoVax, IMA910, ETBX-011, MicOryx, EP-2101, MKC1106-PP, CDX-1307, V934/V935, MelCancerVac, Imprime PGG, FANG, Tecemotide, AlloStim, DCVax, GI-6301, AVX701, OCV-C02.

Los receptores de linfocitos T artificiales (también conocidos como receptores de linfocitos T quiméricos, inmunorreceptores quiméricos, receptores antigénicos quiméricos (CAR, *Chimeric Antigen Receptors*)) son receptores diseñados, que injertan una especificidad arbitraria en una célula efectora inmunitaria. Los receptores de linfocitos T artificiales (CAR) se prefieren en el contexto de la transferencia de células adoptivas. Para este fin, los linfocitos T se extraen de un paciente y se modifican para que expresen receptores específicos del cáncer colorrectal. Los linfocitos T, que después pueden reconocer y destruir las células cancerosas, se reintroducen en el paciente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "modulador de puntos de control inmunológico" (también denominado "modulador de puntos de control") se refiere a una molécula o a un compuesto que modula (por ejemplo, reduce total o parcialmente, inhibe, interfiere con, activa, estimula, aumenta, refuerza o apoya) la función de una o más moléculas de punto de control. Por lo tanto, un modulador de puntos de control inmunológico puede ser un

"inhibidor de puntos de control inmunológico" (también denominado "inhibidor de puntos de control" o "inhibidor") o un "activador de puntos de control inmunológico" (también denominado "activador de puntos de control" o "activador"). Un "inhibidor de puntos de control inmunológico" (también denominado "inhibidor de puntos de control" o "inhibidor") reduce total o parcialmente, inhibe, interfiere o modula negativamente la función de una o más moléculas de punto de control. Un "activador de puntos de control inmunológico" (también denominado "activador de puntos de control" o "activador") activa total o parcialmente, estimula, aumenta, refuerza, apoya o modula positivamente la función de una o más moléculas de punto de control. Los moduladores de puntos de control inmunológico normalmente son capaces de modular (i) la autotolerancia y/o (ii) la amplitud y/o la duración de la respuesta inmunitaria. Preferentemente, el modulador de puntos de control inmunológico usado de acuerdo con la presente invención modula la función de una o más moléculas de puntos de control humanos y es, por lo tanto, un "inhibidor de puntos de control humanos".

Las moléculas de punto de control son moléculas, tales como proteínas, normalmente están implicadas en rutas inmunitarias y, por ejemplo, regulan la activación de los linfocitos T, la proliferación de linfocitos T y/o la función de los linfocitos T. En consecuencia, la función de las moléculas de punto de control, que está modulada (por ejemplo, reducida total o parcialmente, inhibida, interferida con, activada, estimulada, aumentada, reforzada o apoyada) por moduladores de punto de control, es normalmente la (regulación de) la activación de los linfocitos T, la proliferación de linfocitos T y/o la función de los linfocitos T. Las moléculas de punto de control inmunitario regulan y mantienen la autotolerancia y la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias fisiológicas. Muchas de las moléculas de los puntos de control inmunológico pertenecen a la familia B7:CD28 o a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y, mediante la unión de ligandos específicos, activan moléculas de señalización que se reclutan en el dominio citoplasmático (consúltese Susumu Suzuki *et al.*, 2016: Current status of immunotherapy. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2016: doi: 10.1093/jco/hyv201 [Publicación electrónica antes de la impresión]; en particular la Tabla 1).

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

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

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

También se prefiere que el modulador del punto de control inmunológico sea un activador de una molécula de punto de control estimuladora o coestimuladora (pero preferentemente ningún activador de una molécula de punto de control inhibidora). En consecuencia, el modulador del punto de control inmunológico es más preferentemente un activador de CD27, CD28, CD40, CD122, CD137, OX40, GITR y/o ICOS o uno de sus ligandos.

Es incluso más preferido que el modulador del punto de control inmunológico sea un modulador de la ruta de CD40, de la ruta de IDO, de la ruta de CTLA-4 y/o de la ruta de PD-1. En particular, el modulador del punto de control inmunológico es preferentemente un modulador de CD40, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO, más preferentemente el modulador del punto de control inmunológico es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO o un activador de CD40, incluso más preferentemente el modulador del punto de control inmunológico es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-1 y/o IDO y más preferentemente el modulador del punto de control inmunológico es un inhibidor de CTLA-4 y/o PD-1.

Es incluso más preferido que el modulador del punto de control inmunológico sea un modulador de la ruta de CD40, de la ruta de IDO, de la ruta de LAG3, de la ruta de CTLA-4 y/o de la ruta de PD-1. En particular, el modulador del punto de control inmunológico es preferentemente un modulador de CD40, LAG3, CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1 y/o IDO, más preferentemente el modulador del punto de control inmunológico es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1, LAG3 y/o IDO o un activador de CD40, incluso más preferentemente el modulador del punto de control inmunológico es un inhibidor de CTLA-4, PD-L1, PD-1, LAG3 y/o IDO, incluso más preferentemente el modulador del punto de control inmunológico es un inhibidor de LAG3, CTLA-4 y/o PD-1 y más preferentemente el modulador del punto de control inmunológico es un inhibidor de CTLA-4 y/o PD-1.

En consecuencia, el modulador del punto de control para combinación con el complejo como se reivindica para el

tratamiento del cáncer colorrectal puede seleccionarse de moduladores conocidos de la ruta de CD40, la ruta de CTLA-4 o la ruta de PD-1. Preferentemente, el modulador del punto de control para combinación con el complejo como se reivindica para el tratamiento del cáncer colorrectal puede seleccionarse de moduladores conocidos de la ruta de CD40, la ruta de LAG3, la ruta de CTLA-4 o la ruta de PD-1. En particular preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitario es un inhibidor de PD-1. Los inhibidores preferidos de la ruta de CTLA-4 y de la ruta de PD-1 incluyen los anticuerpos monoclonales Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y Tremelimumab (Pfizer/MedImmune), así como Opdivo® (Nivolumab; Bristol Myers Squibb), Keytruda® (Pembrolizumab; Merck), Durvalumab (MedImmune/AstraZeneca), MEDI4736 (AstraZeneca; consúltase el documento WO 2011/066389 A1), MPDL3280A (Roche/Genentech; consúltase el documento US 8.217.149 B2), Pidilizumab (CT-011; CureTech), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), MSB-0010718C (Merck), MIH1 (Affymetrix) y Lambrolizumab (por ejemplo, desvelado como hPD109A y sus derivados humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en el documento WO2008/156712; Hamid *et al.*, 2013; N. Engl. J. Med. 369: 134-144). Los inhibidores de puntos de control más preferidos incluyen los inhibidores de CTLA-4 Yervoy® (Ipilimumab; Bristol Myers Squibb) y Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) así como los inhibidores de PD-1 Opdivo® (Nivolumab; Bristol Myers Squibb), Keytruda® (Pembrolizumab; Merck), Pidilizumab (CT-011; CureTech), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), AMP-224 y Lambrolizumab (por ejemplo, desvelado como hPD109A y sus derivados humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en el documento WO2008/156712; Hamid O. *et al.*, 2013; N. Engl. J. Med. 369: 134-144). Como se ha descrito anteriormente, un ejemplo preferido de un inhibidor de LAG3 es el anticuerpo monoclonal anti-LAG3 BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb). Otros ejemplos preferidos de un inhibidor de LAG3 incluyen LAG525 (Novartis), IMP321 (Immutep) y LAG3-Ig como se describe en el documento WO 2009/044273 A2 y en Brignon *et al.*, 2009, Clin. Cancer Res. 15: 6225-6231, así como anticuerpos de ratón o humanizados que bloquean LAG3 humano (por ejemplo, IMP701 como se describe en el documento WO 2008/132601 A1), o anticuerpos completamente humanos que bloquean LAG3 humano (como se describe en el documento EP 2320940 A2).

Preferentemente, el modulador del punto de control inmunológico no es un modulador de CD40. En particular, se prefiere que el modulador del punto de control inmunológico no sea un ligando de CD40. Se prefiere también que el modulador del punto de control inmunitario no sea un anticuerpo anti-CD40.

También se prefiere que el modulador del punto de control inmunológico para combinación con el complejo como se reivindica para el tratamiento del cáncer colorrectal se seleccione del grupo que consiste en Pembrolizumab, Ipilimumab, Nivolumab, MPDL3280A, MEDI4736, Tremelimumab, Avelumab, PDR001, LAG525, INCB24360, Varlilumab, Urelumab, AMP-224 y CM-24.

Los virus oncolíticos están diseñados para provocar lisis celular al replicarse en tumores, activando de esta manera una respuesta inmunitaria antitumoral. Una terapia de virus oncolítico para combinación con el complejo como se define en el presente documento para el tratamiento del cáncer colorrectal se selecciona preferentemente del grupo que consiste en JX594 (Virus vaccinia desactivado por timidina quinasa), ColoAd1 (adenovirus), NV1020 (derivado de HSV), ADXS11-001 (vacuna atenuada contra *Listeria*), Reolysin® (formulación especial del reovirus humano), PANVAC (virus vaccinia recombinante CEA-MUC-1-TRICOM), Ad5-hGCC-PADRE (vacuna de adenovirus recombinante) y vvDD-CDSR (virus vaccinia).

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

"Aproximadamente al mismo tiempo", como se usan en el presente documento, significa en particular la administración simultánea o directamente después de la administración de (i) el agente quimioterapéutico, el fármaco direccionado y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario, (ii) el complejo se administra o directamente después de la administración de (i) el complejo (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco direccionado y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario, se administra. El experto entiende que "inmediatamente después" incluye el tiempo necesario para preparar la segunda administración - en particular el tiempo necesario para exponer y desinfectar el lugar para la segunda administración así como la preparación apropiada del "dispositivo de administración" (por ejemplo, jeringa, bomba, etc.). La administración simultánea también incluye si los períodos de administración de (i) el complejo y de (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco direccionado y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario, se superponen o si, por ejemplo, un componente se administra durante un período de tiempo más largo, tal como 30 min, 1 h, 2 h o incluso más, por ejemplo, mediante infusión y el otro componente se administra en algún momento durante un período tan largo. La administración de (i) el complejo y de (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco direccionado y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario, se prefiere especialmente aproximadamente al mismo tiempo si se usan diferentes vías de administración y/o diferentes sitios de administración.

También se prefiere que (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco direccionado y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario, se administren consecutivamente. Esto significa que (i) el complejo se administra antes o después (ii) del agente quimioterapéutico, el fármaco direccionado y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario. En administración consecutiva, el tiempo entre la administración del primer componente y la administración del segundo componente no

es preferentemente más de una semana, más preferentemente no más de 3 días, incluso más preferentemente no más de 2 días y lo más preferentemente no más de 24 h. Se prefiere particularmente que (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco direccionado y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario, se administren el mismo día siendo el tiempo entre la administración del primer componente (el modulador del punto de control del complejo) y la administración del segundo componente (el otro del modulador del punto de control y el complejo) no más de 6 horas, más preferentemente no más de 3 horas, incluso más preferentemente no más de 2 horas y lo más preferentemente no más de 1 h.

Preferentemente, (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco direccionado y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario, se administran a través de la misma vía de administración. También se prefiere que (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco direccionado y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario, se administran a través de distintas vías de administración.

Por otra parte, (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco direccionado y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario, se proporcionan preferentemente en composiciones distintas. Como alternativa, (i) el complejo y (ii) el agente quimioterapéutico, el fármaco direccionado y/o el agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario, se proporcionan preferentemente en la misma composición.

En consecuencia, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un complejo (para su uso) de acuerdo con la invención o una célula (para su uso) de acuerdo con la invención, en particular una célula presentadora de antígenos (para su uso) de acuerdo con la invención, combinado con al menos un coagente útil para tratar y/o estabilizar un cáncer y/o prevenir la recaída del cáncer colorrectal, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por otra parte, el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la célula, tal como célula presentadora de antígenos, cargada con el complejo (para su uso) de acuerdo con la presente invención; la composición inventiva; la composición farmacéutica inventiva o la vacuna inventiva pueden administrarse después de una cirugía en que se han extirpado tumores sólidos como una profilaxis contra recaídas y/o metástasis.

Por otra parte, la administración de la composición de obtención de imágenes o de diagnóstico en los métodos y usos de acuerdo con la invención se puede realizar sola o en combinación con un coagente útil para obtener imágenes y/o diagnosticar el cáncer colorrectal.

Sujetos

La presente invención puede usarse para la prevención y/o el tratamiento de cualquier sujeto que padezca cáncer colorrectal o esté en riesgo de desarrollar cáncer colorrectal. En particular, el efecto terapéutico de dicho complejo puede ser provocar una respuesta inmunitaria dirigida contra dichos antígenos o epítopos antigénicos, en particular una respuesta que es dependiente de linfocitos T auxiliares CD4⁺ y/o linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y/o que está restringido por moléculas de MHC de clase I y/o moléculas de MHC de clase II.

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

La presente invención se describe, por ejemplo, por las realizaciones específicas. Diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o el ensayo de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, los métodos y ejemplos son solo ilustrativos.

Breve descripción de las figuras

A continuación se dará una breve descripción de las figuras adjuntas. Las figuras pretenden ilustrar la presente invención con más detalle.

La Figura 1 muestra para el Ejemplo 1 (que no se incluye en las reivindicaciones) la expresión del marcador de activación CD40 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos de sangre humana de un único leucocito. Las DC se estimularon con 300 nM de EDAZ13Mad5, Z13Mad5, Mad5 o 25 ng/ml de LPS durante 48 h. También se realizó tinción de isotipo para cada condición (el isotipo no se muestra en la Fig. 1) (un experimento).

- La Figura 2 muestra para el Ejemplo 1 (que no se incluye en las reivindicaciones) la expresión del marcador de activación CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos de sangre humana de un único leucocito. Las DC se estimularon con 300 nM de EDAZ13Mad5, Z13Mad5, Mad5 o 25 ng/ml de LPS durante 48 h. También se realizó tinción de isotipo para cada condición (el isotipo no se muestra en la Fig. 2) (un experimento).
- La Figura 3 muestra para el Ejemplo 1 (que no se incluye en las reivindicaciones) la expresión del marcador de activación HLADR por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos de sangre humana de un único leucocito. Las DC se estimularon con 300 nM de EDAZ13Mad5, Z13Mad5, Mad5 o 25 ng/ml de LPS durante 48 h. También se realizó tinción de isotipo para cada condición (el isotipo no se muestra en la Fig. 3) (un experimento).
- La Figura 4 muestra para el Ejemplo 1 (que no se incluye en las reivindicaciones) la expresión del marcador de activación CD83 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos de sangre humana de un único leucocito. Las DC se estimularon con 300 nM de EDAZ13Mad5, Z13Mad5, Mad5 o 25 ng/ml de LPS durante 48 h. También se realizó tinción de isotipo para cada condición (el isotipo no se muestra en la Fig. 4) (un experimento).
- La Figura 5 muestra para el Ejemplo 2 (que no se incluye en las reivindicaciones) la presentación cruzada funcional restringida del MHC de clase I en un sistema *in vitro* murino que usa células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC) y esplenocitos de diferentes ratones transgénicos TCR. Para este fin, los BMDC se cargaron durante la noche con 300 nM de EDAZ13Mad5, EDAMad5 o Mad5. La presentación eficiente restringida por MHC de clase I del epítipo OVACD8 y del epítipo gp100 se controló después de 4 días con células OT1 marcadas con CFSE y células P-Mel, respectivamente. La presentación eficiente del epítipo OVACD4 restringida por MHC de clase II se controló después de 4 días con células OT2 marcadas con CFSE. Como control, los BMDC se pulsaron durante 1 h con péptido SuM (un experimento representativo de 2 experimentos individuales).
- La Figura 6 muestra los resultados para los grupos de 2 nmol para el Ejemplo 3 (que no entran dentro de las reivindicaciones). Se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (Wk0 y Wk2) con 2 nmol de EDAMad5 o EDAZ13Mad5. El grupo de control positivo se vacunó con Mad5 y MPLA (equimolar a EDA). Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó tinción con pentámero (3-4 ratones por grupo, un experimento).
- La Figura 7 muestra los resultados para los grupos de 10 nmol para el Ejemplo 3 (que no entran dentro de las reivindicaciones). Se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (Wk0 y Wk2) con 10 nmol de EDAMad5 o EDAZ13Mad5. El grupo de control positivo se vacunó con Mad5 y MPLA (equimolar a EDA). Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó tinción con pentámero (3-4 ratones por grupo, un experimento).
- La Figura 8 muestra para el Ejemplo 3 (que no entra dentro de las reivindicaciones) el porcentaje de células T CD8+ positivas a pentámero para todos los grupos analizados. Se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (Wk0 y Wk2) con 2 nmol o 10 nmol de EDAMad5 o EDAZ13Mad5. El grupo de control positivo: se vacunó con Mad5 y MPLA (equimolar a EDA). Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó tinción con pentámero (un experimento con 3-4 ratones por grupo).
- La Figura 9 muestra para el Ejemplo 4 (que no entra en las reivindicaciones) el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 frente a grupo control (prueba Anova de 2 vías). A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) mediante inyección subcutánea de 10 nmol de EDAZ13Mad5, EDAMad5, Mad5 o Mad5 y MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.
- La Figura 10 muestra para el Ejemplo 4 (que no entra en las reivindicaciones) curvas de crecimiento de tumores individuales (7 ratones individuales por grupo). A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) mediante inyección subcutánea de 10 nmol de EDAZ13Mad5, EDAMad5, Mad5 o Mad5 y MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.
- La Figura 11 muestra para el Ejemplo 4 (que no entra dentro de las reivindicaciones) (A) la curva de supervivencia de 7 ratones por grupo; *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 frente a grupo control (prueba de intervalo logarítmico) y (B) la curva de progresión libre de tumor de 7 ratones por grupo; *, $p < 0,05$ EDAZ13Mad5 frente a grupo control (prueba de intervalo logarítmico).

- La Figura 12: muestra para el Ejemplo 5 (que no se incluye en las reivindicaciones) el número de metástasis para cada grupo experimental. A ratones C57BL/6 se les implantó i.v. con 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA y se vacunaron dos veces (d0 y d9) mediante inyección subcutánea de 2 nmol de EDZ13Mad5, EDAMad5 o Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) o MPLA solo s.c. en el flanco derecho. Los ratones se sacrificaron el día 13 y se recuperó el pulmón. Se contó el número de focos de metástasis para cada pulmón. **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$ (prueba de la t para datos independientes).
- La Figura 13: muestra para el Ejemplo 6 (que no se incluye en las reivindicaciones) el número de metástasis para cada grupo experimental. Se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (d-21 y d-7) mediante inyección subcutánea de 2 nmoles de EDZ13Mad5, EDAMad5 o Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho. El día 0, a los ratones se les implantó i.v. con 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA. Los ratones se sacrificaron el día 14 y se recuperó el pulmón. Se contó el número de focos de metástasis para cada pulmón. *, $p < 0,05$. ***, $p < 0,001$ (prueba de la t para datos independientes).
- La Figura 14: muestra los resultados del Ejemplo 8 (que no se incluyen en las reivindicaciones). Se sembraron líneas celulares HEK-hTLR2 en una placa plana de 96 pocillos en medio de cultivo, se estimularon con 0,3 μ M, 1 μ M o 3 μ M de AnaxaZ13Mad5 o Z13Mad5Anaxa y se incubaron a 37 °C durante 24 h. El control positivo se realizó con 500 ng/ml de Pam3CSK4. (A) Se añadieron veinte microlitros de sobrenadante a medio de detección QuantiBlue® y se incubó a 37 °C durante 1 h antes de la lectura de DO (620 nm). (B) Cuantificación de la secreción de IL-8 (mediante ELISA) en el sobrenadante.
- La Figura 15: muestra los resultados del Ejemplo 9 (que no se incluyen en las reivindicaciones). Se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (Wk0 y Wk2) con 2 nmoles de Z13Mad5Anaxa o AnaxaZ13Mad5. Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó tinción con pentámero (un experimento).
- La Figura 16: muestra los resultados del Ejemplo 9 (que no se incluyen en las reivindicaciones). Se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (Wk0 y Wk2) con 2 nmoles de Z13Mad5Anaxa o AnaxaZ13Mad5. Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó tinción con pentámero (un experimento con 4 ratones por grupo). *, $p < 0,05$.
- La Figura 17: muestra para el Ejemplo 10 (que no entra en las reivindicaciones) el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM). A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) mediante inyección subcutánea de 10 nmol de cualquiera de AnaxZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa o coinyección de Z13Mad5 + Pam3CSK4 (equimolar a Anaxa) en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, ****, $p < 0,0001$.
- La Figura 18: muestra para el Ejemplo 10 (que no entra en las reivindicaciones) las curvas de crecimiento de tumores individuales (7 ratones individuales por grupo). A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) mediante inyección subcutánea de 10 nmol de cualquiera de AnaxZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa o coinyección de Z13Mad5 + Pam3CSK4 (equimolar a Anaxa) s.c. en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.
- La Figura 19: muestra para el Ejemplo 10 (que no entra dentro de las reivindicaciones) la curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) mediante inyección subcutánea de 10 nmol de cualquiera de AnaxZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa o coinyección de Z13Mad5 + Pam3CSK4 (equimolar a Anaxa) en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ****, $p < 0,0001$ (prueba de orden logarítmico).
- La Figura 20: muestra para el Ejemplo 11 (que no entra en las reivindicaciones) el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM). A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) mediante inyección subcutánea de 2 nmoles de Hp91Z13Mad5, EDZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa, Z13Mad5EDA o Z13Mad5 y MPLA (equimolar a EDA) en el flanco derecho. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (prueba Anova de 2 vías el día 23).
- La Figura 21: muestra para el Ejemplo 11 (que no entra en las reivindicaciones) las curvas de crecimiento de tumores individuales (7 ratones individuales por grupo). A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) mediante inyección subcutánea de 2 nmoles de Hp91Z13Mad5, EDZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa, Z13Mad5EDA o Z13Mad5 y MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho.

- La Figura 22: muestra para el Ejemplo 11 (que no entra dentro de las reivindicaciones) las curvas de supervivencia de los 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (prueba de orden logarítmico).
- La Figura 23: muestra para el Ejemplo 12 (que no entra dentro de las reivindicaciones) el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); ****, $p < 0,0001$ (prueba de orden logarítmico). A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (una vez d5 y una vez d13) mediante inyección subcutánea de cualquiera de 0,5 nmol, 2 nmol o 10 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.
- La Figura 24: muestra para el Ejemplo 13 (que no entra dentro de las reivindicaciones) las respuestas de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL detectadas en la sangre de ratones C57BL/6 vacunados tres veces (una vez en la Semana 0, una vez en la Semana 2 y una vez en la Semana 4) s.c., i.d. o i.m. con 0,5 nmol (A) o 2 nmol (B) de Z13Mad5Anaxa. Se obtuvo sangre de ratones 7 días después de la 2ª y la 3ª vacunaciones y se realizó tinción con multímeros (un experimento con 4 ratones por grupo). *, $p < 0,05$.
- La Figura 25: muestra para el Ejemplo 13 (que no se incluye en las reivindicaciones) la expresión de KLRG1 (A) y la expresión de PD-1 (B), que se analizaron en linfocitos T CD8 positivos para multímeros (un experimento con 4 ratones por grupo). Brevemente, se vacunaron ratones C57BL/6 tres veces (una vez en la Semana 0, una vez en la Semana 2 y una vez en la Semana 4) s.c., i.d. o i.m. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Se obtuvo sangre de ratones 7 días después de la 2ª y la 3ª vacunaciones y se realizó tinción FACS.
- La Figura 26: muestra para el Ejemplo 14 (que no entra en las reivindicaciones) respuestas de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL en ratones C57BL/6 vacunados dos veces (una vez en la Semana 0 y una vez en la Semana 2) por vía intraganglionar con 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa. Se obtuvo sangre de ratones 7 días después de la 2ª vacunación y se realizó tinción con multímeros (3 ratones por grupo).
- La Figura 27: muestra para el Ejemplo 15 (que no se incluye en las reivindicaciones) el porcentaje de células positivas para pentámero entre los linfocitos T CD8 (A y B; *, $p < 0,05$) y la media geométrica de KLRG1 de linfocitos T CD8 positivos a pentámero (C y D). Brevemente, se vacunaron ratones C57BL/6 3 veces (A y C: Semana 0, Semana 2 y Semana 4; B y D: Semana 0, Semana 2 y Semana 8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Los ratones se desangraron 7 días después de la última vacunación y se realizó tinción con pentámero (un experimento con 4 ratones por grupo).
- La Figura 28: muestra para el Ejemplo 15 (que no se incluye en las reivindicaciones) el porcentaje de células positivas para multímeros entre los linfocitos T CD8 (A y D); la media geométrica de KLRG1 de linfocitos T CD8 positivos para multímeros (B y E) y la media geométrica PD1 de linfocitos T CD8 positivos para multímeros (C y F). A-C, se vacunaron ratones C57BL/6 3 veces el Día 0, el Día 3 y el Día 7 y se desangraron el Día 7 y Día 14. D-F, se vacunaron ratones C57BL/6 3 veces el Día 0, el Día 7 y el Día 14 y se desangraron el Día 14 y el Día 21. La vacunación se realizó s.c. con 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa. La tinción de multímeros se realizó en muestras de sangre (un experimento con 4 ratones por grupo).
- La Figura 29: muestra para el Ejemplo 16 (que no se incluye en las reivindicaciones) la secreción de IL-6 que indica la activación de APC después de la incubación de BMDC con diversas construcciones como se indica en la Figura. Brevemente, las BMDC se sembraron en una placa plana de 96 pocillos en medio de cultivo, se estimularon con 1 μ M de Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa, Z13Mad5, EDAZ13Mad5 o EDAMad5 y se incubaron durante 24 h a 37 °C. La secreción de IL-6 se cuantificó mediante ELISA en el sobrenadante. Media \pm SEM de 2 a 3 experimentos individuales.
- La Figura 30: muestra para el Ejemplo 16 (que no se incluye en las reivindicaciones) la secreción de TNF- α que indica la activación de APC después de la incubación de células Raw 264.7 con diversas construcciones como se indica en la Figura. Brevemente, se sembraron células Raw 264.7 en una placa plana de 96 pocillos en medio de cultivo, se estimularon con 1 μ M de Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa o Z13Mad5 y se incubaron durante 24 h a 37 °C. La secreción de TNF- α se cuantificó mediante ELISA en el sobrenadante. Media \pm SEM de 2 a 3 experimentos individuales.
- La Figura 31: muestra para el Ejemplo 17 (que no se incluye en las reivindicaciones) la secreción de IL-8 que indica la unión de TLR4 después de la incubación de células HEK-hTLR4 con diversas construcciones como se indica en la Figura. Brevemente, se sembraron HEK-hTLR4 en una placa plana de 96 pocillos en medio de cultivo, se estimularon con 1 μ M de Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa, Z13Mad5, EDAZ13Mad5 o EDAMad5 y se incubaron 24 h a 37 °C. La secreción de IL-8 se cuantificó

mediante ELISA en el sobrenadante. Media \pm SEM de 2 experimentos individuales.

La Figura 32: muestra para el Ejemplo 18 (que no se incluye en las reivindicaciones) el número de metástasis en un modelo de metástasis pulmonar con entornos semiterapéuticos. Brevemente, A ratones C57BL/6 se les implantó i.v. con 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA y se vacunaron dos veces (d0 y d9) mediante inyección subcutánea de 2 nmol de EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) o MPLA solo s.c. en el flanco derecho. Los ratones se sacrificaron el día 13 y se recuperó el pulmón. Se contó el número de focos de metástasis para cada pulmón. **, $p < 0,01$ (Anova unidireccional con la prueba de Dunnett para múltiples comparaciones).

La Figura 33: muestra para el Ejemplo 19 (que no se incluye en las reivindicaciones) el número de metástasis en un modelo de metástasis pulmonar con entornos semiterapéuticos. Brevemente, A ratones C57BL/6 se les implantó i.v. con 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA y se vacunaron dos veces (d0 y d9) mediante inyección subcutánea de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa, Mad5Anaxa o Z13Mad5 + Pam3CSK4 (equimolar a Anaxa) s.c. en el flanco derecho. Los ratones se sacrificaron el día 21 y se recuperó el pulmón. Se contó el número de focos de metástasis para cada pulmón. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (prueba de la t para datos independientes).

La Figura 34: muestra para el Ejemplo 20 (que no entra dentro de las reivindicaciones) la cuantificación de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL en un modelo de glioblastoma Quad-GI261. Brevemente, a ratones C57BL/6 se les implantaron i.c. 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y 21) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. Los linfocitos T CDS específicos de SIINFEKL se cuantificaron en sangre y en BIL en el día 28 mediante tinción con multímeros (5-8 ratones por grupo).

La Figura 35: muestra para el Ejemplo 20 (que no entra en las reivindicaciones) la secreción de citocinas. Brevemente, a ratones C57BL/6 se les implantaron i.c. 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y 21) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. BIL se aislaron y se cultivaron durante 6 h con BMDC madurados cargados o no con el péptido SIINFEKL en presencia de BrefeldinA antes de la tinción intracelular para citocinas. % de linfocitos T CD8 que secretan citocinas (5-8 ratones por grupo).

La Figura 36: muestra para el Ejemplo 21 (que no entra dentro de las reivindicaciones) el efecto de Z13Mad5Anaxa sobre la supervivencia en el modelo de glioblastoma Quad-GI261. Brevemente, a ratones C57BL/6 se les implantaron i.c. 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron tres veces (d7, d21 y d35) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Los ratones se pesaron diariamente y se sacrificaron cuando la pérdida de peso alcanzó más del 15 %.

La Figura 37: muestra para el Ejemplo 22 (que no se incluye en las reivindicaciones) el efecto de Z13Mad5Anaxa sobre el crecimiento y la supervivencia del tumor en el modelo de tumor subcutáneo EG7-OVA en un entorno profiláctico. Brevemente, se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (d-21 y d-7) mediante inyección s.c. de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho y después se les implantó el día 0 s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en flanco izquierdo. El tamaño del tumor se midió con un calibrador. (A) Crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); ****, $p < 0,0001$ (prueba Anova de 2 vías el día 30). (B) Curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.). ***, $p < 0,001$ (prueba de orden logarítmico).

La Figura 38: muestra para el Ejemplo 23 (que no se incluye en las reivindicaciones) el efecto de Z13Mad5Anaxa sobre el crecimiento y la supervivencia del tumor en el modelo de tumor subcutáneo B16-OVA en un entorno terapéutico sobre un tumor establecido. Brevemente, A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 1×10^5 células tumorales B16-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d14 y d21) mediante inyección s.c. de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. (A) Crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); *, $p < 0,05$ (prueba Anova de 2 vías el día 32). (B) Curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.).

La Figura 39: muestra para el Ejemplo 24 (que no entra dentro de las reivindicaciones) el efecto del CPP en Z13Mad5Anaxa sobre el crecimiento y la supervivencia del tumor en el modelo de tumor subcutáneo EG7-OVA. Brevemente, A ratones C57BL/6 se les implantaron el día 0 s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y después se vacunaron dos veces (d5 y d13) mediante inyección s.c. de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa o Mad5Anaxa en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador. (A) Crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); ****, $p < 0,0001$. (B) Curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.). **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

La Figura 40: muestra para el Ejemplo 25 (que no entra en las reivindicaciones) el efecto de complejos que tienen

- 5 diferentes CPP sobre la respuesta inmunitaria. Se vacunaron ratones C57BL/6 cinco veces (WkO, Semana 2, Semana 4, Semana 6 y Semana 8) s.c. con 2 nmol (A) o 0,5 nmol (B) de Z13Mad5Anaxa, Z14Mad5Anaxa o Z18Mad5Anaxa. Los ratones se desangraron 7 días después de la 2^a, 3^{era}, 4^a y 5^a vacunaciones y se realizó tinción de multímeros (un experimento con 4 ratones por grupo). *, p<0,05 entre ratones vacunados versus ratones no expuestos en cada momento, excepto después de Vac2 para los ratones vacunados con Z18Mad5Anaxa.
- 10 La Figura 41: muestra para el Ejemplo 26 (que no entra dentro de las reivindicaciones) el efecto de complejos que tienen diferentes CPP sobre linfocitos T CD8 en el bazo (A), drenaje de ganglios linfáticos (B) y médula ósea (C). Se vacunaron ratones C57BL/6 cinco veces (WkO, Semana 2, Semana 4, Semana 6 y Semana 8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa. Nueve días después de la 5^a vacunación, se sacrificó a los ratones, se recuperaron los órganos y se realizó tinción con multímeros.
- 15 La Figura 42: muestra para el Ejemplo 26 (que no entra dentro de las reivindicaciones) el efecto de complejos que tienen diferentes CPP sobre linfocitos T en el bazo (respuesta de linfocitos T CD8 (A) y respuesta de linfocitos T CD4 (B)). Se vacunaron ratones C57BL/6 cinco veces (WkO, Semana 2, Semana 4, Semana 6 y Semana 8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa. (A) nueve días después de la 5^a vacunación, El ensayo Elispot se realizó en células del bazo estimuladas con el péptido SIINFEKL OVACD8. (B) nueve días después de la 5^a vacunación, El ensayo Elispot se realizó en células del bazo estimuladas con el péptido OVACD4.
- 20 La Figura 43: muestra para el Ejemplo 26 (que no se incluye en las reivindicaciones) el efecto de complejos que tienen diferentes CPP sobre la función efectora de los linfocitos T CD8. Se vacunaron ratones C57BL/6 cinco veces (WkO, Semana 2, Semana 4, Semana 6 y Semana 8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa. Nueve días después de la 5^a vacunación, la tinción intracelular se realizó en células del bazo estimuladas con el péptido SIINFEKL OVACD8.
- 25 La Figura 44: muestra para el Ejemplo 27 (que no entra dentro de las reivindicaciones) el efecto de complejos que tienen diferentes CPP sobre el crecimiento tumoral (A) y las tasas de supervivencia (B). A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) mediante inyección s.c. de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa o Z14Mad5Anaxa en el flanco derecho. (A) Crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); *, p<0,05; ***, p<0,0001 (prueba Anova de 2 vías el día 28). (B) Curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.). *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 (prueba de orden logarítmico).
- 30 La Figura 45: muestra para el Ejemplo 28 (que no entra en las reivindicaciones) el efecto de complejos que tienen diferentes CPP sobre la respuesta inmunitaria. Se vacunaron ratones C57BL/6 tres veces (Semana 0, Semana 2 y Semana 4) s.c. con 2 nmol (A) o 0,5 nmol (B) de EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5 o EDAZ18Mad5. Los ratones se desangraron 7 días después de la 3^a vacunación y se realizó tinción de multímeros (un experimento con 4 ratones por grupo). *, p<0,05
- 35 La Figura 46: muestra para el Ejemplo 29 (que no entra dentro de las reivindicaciones) el efecto de EDAZ14Mad5 sobre el crecimiento tumoral (A) y las tasas de supervivencia (B). A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) mediante inyección s.c. de 2 nmoles de EDAZ14Mad5 en el flanco derecho. Panel izquierdo: Crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); **, p<0,01 (prueba Anova de 2 vías el día 27). Panel derecho: Curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.).
- 40 La Figura 47: muestra para el Ejemplo 30 (que no entra dentro de las reivindicaciones) la cuantificación de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL en un modelo de glioblastoma Quad-GI261. Brevemente, a ratones C57BL/6 se les implantaron i.c. 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y 21) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. Los linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL se cuantificaron en sangre y en BIL en el día 28 mediante tinción con multímeros (7-16 ratones por grupo).
- 45 La Figura 48: muestra para el Ejemplo 30 (que no entra en las reivindicaciones) la secreción de citocinas. Brevemente, a ratones C57BL/6 se les implantaron i.c. 5×10^5 células tumorales GI261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y 21) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. BIL se aislaron y se cultivaron durante 6 h con BMDC madurados cargados o no con el péptido SIINFEKL en presencia de BrefeldinA antes de la tinción intracelular para citocinas. % de linfocitos T CD8 que secretan citocinas (7-16 ratones por grupo).
- 50 La Figura 49: muestra para el Ejemplo 31 (que no se incluye en las reivindicaciones) el efecto de Z13Mad8Anaxa
- 55
- 60
- 65

- sobre los linfocitos T en el bazo (respuesta de linfocitos T CD8 (A) y respuesta de linfocitos T CD4 (B)). Se vacunaron ratones C57BL/6 cuatro veces (Semana 0, Semana 2, Semana 4 y Semana 6) s.c. con 2 nmol de Z13Mad8Anaxa. (A) una semana después de la 4ª vacunación, el ensayo Elispot se realizó en células del bazo estimuladas con el péptido gp70CD8. (B) una semana después de la 4ª vacunación, el ensayo Elispot se realizó en células del bazo estimuladas con el péptido gp70CD4.
- 5
- La Figura 50: muestra para el Ejemplo 32 (que no entra dentro de las reivindicaciones) el efecto de Z13Mad11Anaxa sobre el número de metástasis en el modelo de metástasis pulmonar B16 (A) y sobre la respuesta de linfocitos T en el bazo (B). Se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (día 0, día 10) s.c. con 1 nmol de Z13Mad11Anaxa.
- 10
- La Figura 51: muestra para el Ejemplo 33 (que no se incluye en las reivindicaciones) el efecto de Z13Mad9Anaxa sobre los linfocitos T en el bazo (respuesta de los linfocitos T CD8). Se vacunaron ratones C57BL/6 cuatro veces (Semana 0, Semana 2, Semana 4 y Semana 6) s.c. con 2 nmol de Z13Mad9Anaxa. Una semana después de la 4ª vacunación, el ensayo Elispot se realizó en células del bazo estimuladas con péptido adpgk.
- 15
- La Figura 52: muestra para el Ejemplo 34 (que no entra en las reivindicaciones) el efecto de complejos que tienen diferentes CPP sobre la respuesta inmunitaria. Se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (Semana 0 y Semana 2) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o TatFMad5Anaxa. Los ratones se desangraron 7 días después de la 2ª vacunación y se realizó tinción de multímeros (un experimento con 8 ratones por grupo).
- 20
- La Figura 53: muestra para el Ejemplo 35 (que no entra en las reivindicaciones) la cuantificación de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL en ratones sin tratamiento previo. Brevemente, se vacunaron ratones C57BL/6 una vez (día 0) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (grupo "Z13Mad5Anaxa") o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa (grupo "Z13Mad5+Anaxa"). Los linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL se cuantificaron en sangre y en BIL en d7 mediante tinción con multímeros (4-8 ratones por grupo).
- 25
- La Figura 54: muestra para el Ejemplo 36 (que no se incluye en las reivindicaciones) el efecto de Z13Mad12Anaxa sobre los linfocitos T en sangre (respuesta de los linfocitos T CD8). Se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (semana 0 y semana 2) s.c. con 2 nmol de Z13Mad12Anaxa. Una semana después de la 2ª vacunación, la tinción de multímeros para el neoantígeno reps1 se realizó en células sanguíneas.
- 30
- La Figura 55: muestra para el Ejemplo 37 (que no se incluye en las reivindicaciones) la expresión del marcador de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 (de izquierda a derecha) por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos sanguíneos humanos de un solo leucocito. Las DC fueron estimuladas con 300 nM de Z13Mad5Anaxa (paneles inferiores) o Z13Mad5 (paneles superiores) durante 48 h. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición como se muestra.
- 35
- La Figura 56: muestra para el Ejemplo 38 (que no entra en las reivindicaciones) el porcentaje de células positivas para multímeros (% de células T CD8) durante el transcurso de la vacunación repetida. Brevemente, Se vacunaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea 6 veces (semanas 0, 2, 4, 8, 12, 16) con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Los ratones se desangraron 7 días después de cada vacunación o antes de la vacunación y se realizó la tinción con pentámero (dos experimentos con 4 ratones por grupo). Las flechas debajo del eje temporal indican los momentos de vacunación.
- 40
- La Figura 57: muestra para el Ejemplo 39 (que no entra dentro de las reivindicaciones) el volumen del tumor (A) y la tasa de supervivencia (B) de ratones vacunados con Z13Mad11Anaxa y ratones de control en el modelo de tumor MC-38. Brevemente, a los ratones C57BL/6 se les implantó s.c. con 2×10^5 células tumorales MC38 en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (-d21 y -d7 antes de la implantación del tumor) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad11Anaxa en el flanco derecho. (A) Crecimiento tumoral y (B) Curva de supervivencia de 7 ratones por grupo. La mediana de supervivencia se indica en el gráfico (m.s.). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ (prueba de orden logarítmico).
- 45
- La Figura 58: muestra para el Ejemplo 40 (que no entra en las reivindicaciones) la liberación de citocinas seleccionadas después de la administración del complejo de acuerdo con la presente invención. Brevemente, a ratones C57BL/6 se les inyectó i.v. con 10 nmol de Z13Mad5Anaxa. 0,5, 1 y 3 h postadministración, se tomaron muestras de sangre para monitorizar IL-6, TNF α , IFN γ , IL1- β e IL12 en el suero usando un multiplex de Luminex (n=4).
- 50
- La Figura 59: muestra para el Ejemplo 41 (que no se incluye en las reivindicaciones) la respuesta inmunitaria específica del neoantígeno adpgk en el sitio del tumor (células infiltrantes de tumores, TIL) para ratones control (columna (A)) y vacunados con Z13Mad12Anaxa (columna (B)). Se muestran diagramas de puntos FACS de TIL. El porcentaje de células positivas para multímeros (en % de
- 55
- 60
- 65

linfocitos T CD8) se indica para cada diagrama de puntos.

- 5 La Figura 60: muestra para el Ejemplo 41 (que no se incluye en las reivindicaciones) la respuesta inmunitaria específica del neoantígeno reps1 en el sitio del tumor (células infiltrantes de tumores, TIL) para ratones control (columna (A)) y vacunados con Z13Mad12Anaxa (columna (B)). Se muestran diagramas de puntos FACS de células sanguíneas. El porcentaje de células positivas para multímeros (en % de linfocitos T CD8) se indica para cada diagrama de puntos.
- 10 La Figura 61: muestra para el Ejemplo 41 (que no se incluye en las reivindicaciones) la respuesta inmunitaria específica del neoantígeno en el sitio del tumor (células infiltrantes de tumores, TIL) para ratones control y vacunados Z13Mad12Anaxa. Se muestra el porcentaje de células positivas para multímeros (en % de linfocitos T CD8) para cada epítipo (adpgk (A) y reps1 (B)).
- 15 La Figura 62: muestra para el Ejemplo 42 (que no entra en las reivindicaciones) la expresión de marcadores de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos sanguíneos humanos de un solo leucocito. Las DC fueron estimuladas con 300 nM de ATP110 durante la noche. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición como se muestra.
- 20 La Figura 63: muestra para el Ejemplo 42 (que no entra en las reivindicaciones) la expresión de marcadores de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos sanguíneos humanos de un solo leucocito. Las DC fueron estimuladas con 300 nM de ATP112 durante la noche. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición como se muestra.
- 25 La Figura 64: muestra para el Ejemplo 42 (que no entra en las reivindicaciones) la expresión de marcadores de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos sanguíneos humanos de un solo leucocito. Las DC fueron estimuladas con 300 nM de ATP115 durante la noche. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición como se muestra.
- 30 La Figura 65: muestra para el Ejemplo 42 (que no entra en las reivindicaciones) la expresión de marcadores de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos sanguíneos humanos de un solo leucocito. Las DC se estimularon con 300 nM de ATP117 durante la noche. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición como se muestra.
- 35 La Figura 66: muestra para el Ejemplo 42 (que no entra en las reivindicaciones) la expresión de marcadores de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos sanguíneos humanos de un solo leucocito. Las DC fueron estimuladas con 300 nM de ATP118 durante la noche. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición como se muestra.
- 40 La Figura 67: muestra para el Ejemplo 42 (que no entra en las reivindicaciones) la expresión de marcadores de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos sanguíneos humanos de un solo leucocito. Las DC fueron estimuladas con 300 nM de ATP119 durante la noche. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición como se muestra.
- 45 La Figura 68: muestra para el Ejemplo 42 (que no entra en las reivindicaciones) la expresión de marcadores de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos sanguíneos humanos de un solo leucocito. Las DC fueron estimuladas con 300 nM de ATP120 durante la noche. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición como se muestra.
- 50 La Figura 69: muestra para el Ejemplo 42 (que no entra en las reivindicaciones) la expresión de marcadores de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos sanguíneos humanos de un solo leucocito. Las DC fueron estimuladas con 300 nM de ATP122 durante la noche. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición como se muestra.
- 55 La Figura 70: muestra para el Ejemplo 42 (que no entra en las reivindicaciones) la expresión de marcadores de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos sanguíneos humanos de un solo leucocito. Las DC fueron estimuladas con 300 nM de ATP123 durante la noche. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición como se muestra.
- 60 La Figura 71: muestra para el Ejemplo 42 (que no entra en las reivindicaciones) la expresión de marcadores de activación HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 por células dendríticas (DC) derivadas de monocitos sanguíneos humanos de un solo leucocito. Las DC fueron estimuladas con 600 nM de ATP125 durante la noche. También se realizó la tinción de isotipo para cada condición como se muestra.
- 65 La Figura 72 muestra para el Ejemplo 43 (que no entra dentro de las reivindicaciones) el crecimiento tumoral (A) y la tasa de supervivencia (B) de 13 a 14 ratones por grupo (media \pm SEM). A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 2×10^5 células tumorales MC-38 en la espalda. Los ratones de los grupos

"Z13Mad12Anaxa" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1" se vacunaron 3 veces (d3, d10 y d17) mediante inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad12Anaxa en la base de la cola. Se administraron i.p. 200 µg de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 6, 10, 13, 17, 20, 24 y 27 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1". El tamaño del tumor se midió con un calibrador. Para cada curva de crecimiento tumoral se indica el número de ratones libres de tumores de cada grupo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ****, p<0,0001.

La Figura 73 muestra para el Ejemplo 43 (que no se incluye en las reivindicaciones) curvas de crecimiento de tumores individuales de 13 a 14 ratones por grupo. A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 2×10^5 células tumorales MC-38 en la espalda. Los ratones de los grupos "Z13Mad12Anaxa" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1" se vacunaron 3 veces (d3, d10 y d17) mediante inyección subcutánea de 2 nmol de Z13Mad12Anaxa en la base de la cola. Se administraron i.p. 200 µg de anticuerpo anti-PD1 en cada uno de los días 6, 10, 13, 17, 20, 24 y 27 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1". El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

La Figura 74 muestra los resultados para el Ejemplo 44. Se vacunaron ratones C57BL/6 una vez con 4 nmol de ATP128. Los ratones se desangraron 7 días después y se realizó el ensayo Elispot en células sanguíneas estimuladas con células dendríticas cargadas con ATP128 (un experimento).

La Figura 75 muestra para el Ejemplo 45 el índice de activación de células dendríticas (DC) derivadas de monocitos de sangre humana de diez leucocitos diferentes. Las DC fueron estimuladas con 300 nM de ATP128 durante la noche. Los controles negativos y positivos se realizaron incubando células con tampón y MPLA, respectivamente.

La Figura 76 muestra para el Ejemplo 46 las regiones de ATP128 que contienen péptidos que se encontraron presentados en MHC de clase I (A) y clase II (B) en la superficie de células dendríticas humanas de dos donantes diferentes, donante 9 (línea continua) y donante 10 (línea de puntos), después de cargar durante la noche con ATP128 y el número respectivo de péptidos presentados en MHC de clase I y clase II (C). Los números subrayados corresponden a péptidos descritos previamente en la bibliografía como péptidos inmunogénicos.

Ejemplos

En lo sucesivo, se presentan ejemplos particulares que ilustran diversas realizaciones y aspectos de la invención. Se proporcionan las siguientes preparaciones y ejemplos para permitir a los expertos en la materia entender y practicar la presente invención con mayor claridad. Únicamente pretenden ser ilustraciones de aspectos individuales de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior, las figuras adjuntas y los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1: Maduración *in vitro* de células dendríticas humanas (no se incluye en las reivindicaciones)

El objetivo de este estudio fue investigar la capacidad de un complejo para inducir la maduración de células dendríticas. En el presente estudio, el complejo para su uso es una proteína de fusión, que comprende el péptido de penetración celular "Z13", una proteína "MADS", que consiste en diferentes epítomos CD8⁺ y CD4⁺ de varios antígenos y el péptido agonista de TLR4 "EDA". En consecuencia, se modificó una proteína fusionada con el péptido EDA en la posición N-terminal y diferentes proteínas conjugadas de control sin Z13 ni EDA o ambas.

En concreto, se diseñaron las siguientes construcciones, por lo que en la secuencia de aminoácidos el péptido de penetración celular "Z13" se muestra subrayado y el péptido agonista de TLR "EDA" se muestra en cursiva:

EDAZ13Mad5

Secuencia:

```

MHHHHHHHNID  RPKGLAFTDV  DVDSIKIWE  SPQGQVSRYR  VTYSSPEDGI
RELFPAPDGEDDTAELQGLR  PGSEYTVSVV  ALHDDMESQP  LICIQSTERY  KNRVASRKSX
AKFKOLLQHY  REVAAAKSSE  NDRLRLLKE  SIKISQAVHA  AHAEINEAGR  EVVGVCALKV
~ PRNQDWLCVP  RPAKFASFEA  QGALANIAVD  KANEDVEQLE  SIINFELTE  WTGS ~
[SEQ ID NO: 26]

```

Peso molecular: 25.057 Da

Características:

- La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalfaCD4 y OVACD8
- Contiene EDA agonista de TLR (Lasarte, J.J., *et al.*, The extra domain A from fibronectin targets antigens to TLR4-expressing cells and induces cytotoxic T cell responses *in vivo*. J Immunol, 2007. 178(2): p. 748-56)
- Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, , NaCl 150 mM, Glicerol al 10 %, DTT 2 mM, L-arginina 1 M, pH 8
- Nivel de endotoxinas: < 0,01 UE/ug

Z13Mad5

Secuencia:

MHHHHHHKRY KNRVASRKSR AKFKQLLOHY REVAAAKSSE NDRIRLLKE SLKISQAVHA
 AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA QGALANIAVD KANLDVEQLE
 SIINFELTE WTGS
 [SEQ ID NO: 29]

Peso molecular: 15.196 Da

Características:

- La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalfaCD4 y OVACD8
- Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, , NaCl 150 mM, Glicerol al 10 %, DTT 2 mM, L-arginina 1 M, pH 9
- Nivel de endotoxinas:
 - Lote 1: 0,32 UE/mg
 - Lote 2: 0,44 UE/mg

Mad5

Secuencia:

MHHHHHHE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGVGALKV PRNQDWLGVP RFAKFASFEA
 QGALANIAVD KANLDVEQLE SIINFELTE WTGS
 [SEQ ID NO: 30]

Peso molecular: 10.154,6 Da

Características:

- La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalfaCD4 y OVACD8
- Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, , NaCl 150 mM, Glicerol al 10 %, DTT 2 mM, L-arginina 0,5 M, pH 8
- Nivel de endotoxinas: 0,069 UE/mg

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

Los resultados se muestran para CD40 en la Fig. 1, para CD86 en la Fig. 2, para HLADR en la Fig. 3 y para CD83 en la Fig. 4. Mientras que EDAZ13Mad5 indujo la maduración de las DC humanas, mostrado por la regulación positiva de CD86, HLADR y CD83, las proteínas Z13Mad5 y Mad5 no pudieron activar las DC humanas. Estos resultados indican que la porción EDA de la proteína es responsable de la regulación positiva de los marcadores de activación en las DC humanas.

Ejemplo 2: Presentación de epítipo *in vitro* (MHC I) (no se incluye en las reivindicaciones)

El objetivo de este estudio fue evaluar la presentación cruzada funcional del MHC de clase I restringida en un sistema *in vitro* murino que usa células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC) y esplenocitos de diferentes ratones

transgénicos TCR. Para este fin, se usaron las construcciones EDZ13Mad5 y Mad5 (descritas anteriormente en el Ejemplo 1) y la construcción EDAMad5:

EDAMad5

Secuencia

```

MIHHHHHHNID  RPKGLAFTDV  DVDSIKIAWE  SPQQQVSRYP  VTYSSPEDGI
RELPAPDGEDDTAELQGLR  PGSEYTVSVV  ALHDDMESQP  LIGIQSTE  SLKISQAVHA
AAAEINEAGR  EVVGVGALKV  PRNQDWLGVP  RFAKFASFEA  QGALANIAVD  KANLDVEQLE
SIINFELTE  WTGS
[SEQ ID NO: 31]

```

Peso molecular: 20.017 Da

Características:

- La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalfaCD4 y OVACD8
- Contiene EDA agonista de TLR
- Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Glicerol al 10 %, DTT 2 mM, L-arginina 0,5 M, pH 8
- Nivel de endotoxinas: 1,8 UE/mg

BMDC se cargaron durante la noche con 300 nM de proteínas EDAMad5, EDZ13Mad5 y MadS que contienen epítopos OVACD8, OVACD4 y gp100. El procesamiento y la presentación de estos epítopos OVACD8 y gp100 restringidos por MHC I se controlaron midiendo la proliferación *in vitro* de linfocitos T CD8⁺ específicos de OVA₂₅₇₋₂₆₄ sin tratamiento previo de ratones transgénicos al receptor de linfocitos T (TCR) OT-1 y linfocitos T CD8⁺ específicos de gp100 de ratones transgénicos TCR de linfocitos T P-mel respectivamente. En consecuencia, la presentación eficiente restringida por MHC de clase I del epítipo OVACD8 y del epítipo gp100 se controló después de 4 días con células OT1 marcadas con CFSE y células P-Mel, respectivamente. El procesamiento y la presentación del epítipo OVACD4 restringido al MHC II se controlaron midiendo la proliferación *in vitro* de linfocitos T CD4⁺ específicos de OVA₃₂₃₋₃₃₉ de ratones transgénicos con receptor de células T (TCR) OT-2. En consecuencia, la presentación eficiente del epítipo OVACD4 restringida por MHC de clase II se controló después de 4 días con células OT2 marcadas con CFSE. Como control, las BMDC se pulsaron durante 1 h con péptido 5 uM (un experimento representativo de 2 experimentos individuales).

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

Ejemplo 3: Respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8 (no se incluye en las reivindicaciones)

Para investigar la eficacia de las proteínas conjugadas con EDA en la inducción de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ policlonales, se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (semana 0 y semana 2), mediante inyección subcutánea de 2 nmol o 10 nmol de las construcciones EDZ13Mad5 o EDAMad5 (descritas en los Ejemplos 1 y 2). El grupo de control positivo fue vacunado con Mad5 y el agonista de TLR4 MPLA (equimolar a EDA). Se evaluaron dos dosis: 2 nmol de la construcción (Fig. 6) y 10 nmol de la construcción (Fig. 7). Se usaron 3 - 4 ratones por grupo.

Siete días después de la última vacunación, los ratones se desangraron y se realizó tinción con pentámero para controlar la respuesta inmunitaria específica de OVA en la sangre. En la Fig. 8, se muestra el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ positivos a pentámero para todos los grupos y para ambas dosis probadas.

Estos datos muestran que, curiosamente, la respuesta inmunitaria es menor con 10 nmol en comparación con 2 nmol. En ambas dosis, 2 nmol y 10 nmol, la respuesta inmunitaria mediada por la vacuna se observó de manera más consistente en el grupo EDZ13Mad5 en contraste con el grupo EDAMad5. Por otra parte, hay una respuesta inmunitaria aumentada cuando el agonista TLR4 se conjuga con la vacuna.

Ejemplo 4: Eficacia de la vacuna sobre el crecimiento tumoral en un modelo de tumor de referencia EG.7-OVA (no se incluye en las reivindicaciones)

Para evaluar el efecto de las proteínas constructivas EDA sobre el control del crecimiento tumoral, se eligió el modelo s.c. de células de timoma EG.7-OVA. A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10⁵ células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo. Después de la implantación del tumor, los ratones se vacunaron los días 5 y 13 con

10 nmol de una de las siguientes construcciones (véanse los Ejemplos 1 y 2 para la descripción de la construcción): EDZ13Mad5, EDAMad5, Mad5 o Mad5 y MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

La Fig. 9 muestra el crecimiento tumoral de 7 ratones por grupo (media \pm SEM); *, $p < 0,05$ EDZ13Mad5 frente a grupo control (prueba Anova de 2 vías). La Fig. 10 muestra curvas de crecimiento de tumores individuales (7 ratones individuales por grupo). La Fig. 11 A muestra la curva de supervivencia de 7 ratones por grupo; *, $p < 0,05$ EDZ13Mad5 frente a grupo control (prueba de intervalo logarítmico). La Fig. 11 B muestra la curva de progresión libre de tumores de 7 ratones por grupo; *, $p < 0,05$ EDZ13Mad5 frente a grupo control (prueba de intervalo logarítmico).

Los resultados muestran que en un entorno terapéutico, EDZ13Mad5 fue la única vacuna proteica que controló significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control con una curva de progresión libre de tumor y una curva de supervivencia significativamente mejores.

Por lo tanto, los resultados sugieren que la proteína de construcción EDZ13Mad5 es una vacuna muy potente para controlar el crecimiento tumoral en un entorno terapéutico.

Ejemplo 5: Eficacia de la vacuna sobre el crecimiento tumoral en un modelo de metástasis de melanoma (no se incluye en las reivindicaciones)

Para evaluar la eficacia en un modelo de metástasis pulmonar usando células tumorales B16-OVA en un entorno semiterapéutico, se usaron diferentes proteínas de construcción: EDAMad5, EDZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA (véanse los Ejemplos 1 y 2 para el diseño de las construcciones) y MPLA solo. A los ratones C57BL/6 se les implantó i.v. con 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA y al mismo tiempo (d0) 2 nmol de la vacuna (EDAMad5, EDZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA, MPLA solo) se administró mediante inyección subcutánea en el flanco derecho. Nueve días después, los ratones fueron vacunados por segunda vez con la misma dosis. Se vacunaron otros grupos de control con 2 nmol de Z13Mad5 y el agonista de TLR4 MPLA (equimolar a EDA) o MPLA solo.

Los ratones se sacrificaron el día 13 y se recuperó el pulmón. Se contó el número de focos de metástasis para cada pulmón. Los resultados se muestran en la Fig. 12.

Los resultados muestran que el conjugado EDZ13Mad5 es tan potente como Z13Mad5 + MPLA para inhibir la metástasis tumoral en el pulmón. Adicionalmente, EDA-Mad5 es menos potente que EDZ13Mad5, lo que indica un papel crucial de Z13 en la eficacia de la vacuna.

Ejemplo 6: Eficacia de la vacuna sobre el crecimiento tumoral en un modelo de metástasis de melanoma - entorno profiláctico (no se incluye en las reivindicaciones)

Adicionalmente, la eficacia de las diferentes proteínas de construcción EDAMad5, EDZ13Mad5 y Z13Mad5 + MPLA (véanse los Ejemplos 1 y 2 para el diseño de las construcciones) se evaluaron en un modelo de metástasis pulmonar en un entorno profiláctico. Se vacunaron ratones C57BL/6 21 y 7 días antes de la implantación de células tumorales (d-21 y d-7) mediante inyección subcutánea de 2 nmol de EDZ13Mad5, EDAMad5 o Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) s.c. en el flanco derecho. El día 0, a los ratones se les implantó i.v. con 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA. Los ratones se sacrificaron el día 14 y se recuperó el pulmón. Los resultados se muestran en la Fig. 13.

Ejemplo 7: Diseño de construcciones adicionales que comprenden un agonista peptídico de TLR2 (no se incluye en las reivindicaciones)

En el presente documento, el complejo para su uso es de nuevo una proteína de fusión, que comprende el péptido de penetración celular "Z13", la proteína "MADS", que consiste en diferentes epítopos CD8⁺ y CD4⁺ de varios antígenos y el péptido agonista de TLR2 "Anaxa". En consecuencia, se diseñaron proteínas fusionadas con el péptido Anaxa en la posición C-terminal o N-terminal.

En concreto, se diseñaron las siguientes construcciones, por lo que en la secuencia de aminoácidos el péptido de penetración celular "Z13" se muestra subrayado y el péptido agonista de TLR "Anaxa" se muestra en cursiva:

AnaxaZ13Mad5

Secuencia:

MHHHHHHSTV HEILCKLSLE GDHSTPPSAY GSVKPYTNFD AKRYKNRVA SRKSRKFKQ
 LLOHYREVAA AKSENDRLR LLKESLKIS QAVHAAHAEI NEAGREVVCV GALKVPRNQD
 WLGVPFAKE ASFEAQGALA NIAVDKANLD VEQLESINF EKLTEWTGS
 [SEQ ID NO: 27]

Peso molecular: 18973 Da

5 Características:

- La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalfaCD4 y OVACD8
- Contiene el péptido de 35 unidades monoméricas de Anexina
- Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, , NaCl 150 mM, Glicerol al 10 %, DTT 2 mM, L-arginina 0,5 M, pH 8
- Nivel de endotoxinas: 5,17 UE/mg

Z13Mad5Anaxa

15 Secuencia:

MHHHHHHKRYKNRVA SRKSRKFKQ LLOHYREVAA AKSENDRLR LLKESLKIS
 QAVHAAHAEI NEAGREVVCV GALKVPRNQD WLGVPFAKE ASFEAQGALA
 NIAVDKANLD VEQLESINF EKLTEWTGSS TVHEILCKLS LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE
 [SEQ ID NO: 28]

Peso molecular: 18973 Da

20 Características:

- La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalfaCD4 y OVACD8
- Contiene el péptido de 35 unidades monoméricas de Anexina
- Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, , NaCl 150 mM, Glicerol al 10 %, DTT 2 mM, L-arginina 0,5 M, pH 8

Nivel de endotoxinas: 3,1 UE/mg

30 Ejemplo 8: Unión a TLR2 (líneas celulares HEK-hTLR2) (no se incluye en las reivindicaciones)

El objetivo de este estudio fue evaluar si las proteínas de construcción Z13Mad5Anaxa y AnaxaZ13Mad5 (véase el Ejemplo 7 para el diseño de estas proteínas constructivas) eran capaces de unirse a TLR2 como un agonista. Se sembraron HEK-Blue™ hTLR2 en una placa plana de 96 pocillos en medio de cultivo, se estimularon con 0,3 µM, 1 µM o 3 µM de AnaxaZ13Mad5 o Z13Mad5Anaxa y se incubaron a 37 °C durante 24 h. El control positivo se realizó con 500 ng/ml de Pam3CSK4, un agonista de TLR2.

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

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

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

Ejemplo 9: Inducción *in vivo* de linfocitos T CD8⁺ específicos (no se incluye en de las reivindicaciones)

Para investigar la eficacia de las proteínas conjugadas con Anaxa del Ejemplo 7 en la inducción de respuestas de los linfocitos T CD8⁺, se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces (Semana 0 y Semana 2), mediante inyección subcutánea de 2 nmol de AnaxaZ13Mad5 o 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Siete días después de la última vacunación, los ratones se desangraron y se monitorizó la respuesta inmunitaria específica de OVA en la sangre, se realizó tinción con pentámero (un experimento con 4 ratones por grupo). Los resultados se muestran en las Figuras 15 y 16.

Estos datos indican que ambas, la vacuna Z1 3Mad5Anaxa y la construcción AnaxaZ13Mad5, provocan una fuerte respuesta inmunitaria.

5 Ejemplo 10: Efecto terapéutico sobre el crecimiento tumoral (no se incluye en las reivindicaciones)

Para evaluar el efecto de las proteínas de construcción conjugadas con Anaxa diseñadas en el Ejemplo 7 sobre el control del crecimiento tumoral, se usó un modelo tumoral de referencia, en concreto la implantación s.c. de células de timoma EG.7-OVA.

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

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

25 Ejemplo 11: Efecto terapéutico sobre el crecimiento tumoral - comparación de construcciones con diferentes agonistas de TLR (no se incluye en las reivindicaciones)

El objetivo de este estudio fue comparar la eficacia de las diferentes vacunas proteicas conjugadas con diferentes agonistas de TLR, a saber, EDAZ13Mad5 y Z13Mad5Anaxa de los Ejemplos 1 y 7, sobre el control del crecimiento tumoral. Para este fin, los ratones C57BL/6 se implantaron s.c. con 3×10^5 células de timoma EG.7-OVA en el flanco izquierdo como se describió anteriormente en el Ejemplo 10. Se vacunaron ratones (7 ratones individuales por grupo) s.c. en el flanco derecho los días 5 y 13 con 2 nmol de EDAZ13Mad5, Z13Mad5Anaxa o coinyección de Z13Mad5+MPLA (equimolar a EDA).

35 Los resultados se muestran en las Figuras 20, 21 y 22. En este entorno experimental, Z13Mad5Anaxa, EDAZ13Mad5 y Z13Mad5+MPLA también pudieron controlar significativamente el crecimiento tumoral. Por otra parte, estos datos indican que Z13Mad5Anaxa es la mejor construcción para controlar significativamente el crecimiento tumoral y EDAZ13Mad5 fue ligeramente mejor que Z13Mad5+MPLA en este entorno experimental.

40 Ejemplo 12: Efecto de la dosis de Z13Mad5Anaxa sobre el control del crecimiento tumoral (no se incluye en las reivindicaciones)

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

50 A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d5 y d13) mediante inyección subcutánea de cualquiera de 0,5 nmol, 2 nmol o 10 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

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

55 Ejemplo 13: Efecto de diferentes vías de administración de Z13Mad5Anaxa (no se incluye en las reivindicaciones)

Este estudio se basó en los Ejemplos anteriores que demuestran la eficacia de la vacuna conjugada Z1 3Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7), que es capaz de provocar respuestas inmunitarias específicas y es eficaz para controlar el crecimiento tumoral en el modelo de tumor subcutáneo EG7 como se muestra anteriormente.

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

65 Los ratones se vacunaron tres veces cada dos semanas (Semana 0, Semana 2 y Semana 4) con 0,5 o 2 nmol de

Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7). Para marcar como diana varios ganglios linfáticos, la 1ª y la 3ª vacunaciones se realizaron en el flanco derecho mientras que la 2ª se realizó en el flanco izquierdo. La respuesta de los linfocitos T CD8+ específicos de SIINFEKL se analizó 1 semana después de la 2ª y la 3ª vacunaciones en sangre. La Figura 24 muestra las respuestas de los linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL después de cada vacunación detectadas en la sangre de ratones C57BL/6 vacunados tres veces (Semana 0, Semana 2 y Semana 4) s.c., i.d. o i.m. con 0,5 nmol (Figura 24 A) o 2 nmol (Figura 24 B) de Z13Mad5Anaxa. Se obtuvo sangre de ratones 7 días después de la 2ª y la 3ª vacunaciones y se realizó tinción con multímeros (un experimento con 4 ratones por grupo).

Los resultados indican que a las dos dosis evaluadas (0,5 y 2 nmol), (i) todas las vías de administración analizadas provocaron una respuesta inmunitaria CD8 específica de SIINFEKL y (ii) la vacunación subcutánea provocó la respuesta inmunitaria CD8 específica de SIINFEKL más fuerte. Para la administración subcutánea, la respuesta máxima se alcanzó después de la 3ª vacunación y aún se mantuvo después de la 3ª vacunación. La respuesta inmunitaria CD8 específica de SIINFEKL después de la 2ª vacunación provocada por las vacunaciones intradérmicas e intramusculares es menor en comparación con la vacunación subcutánea y no aumenta después de la 3ª vacunación.

A continuación, la función efectora y el estado de agotamiento de los linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL se evaluaron analizando KLRG 1 (miembro 1 de la subfamilia G del receptor similar a lectina de células asesinas) y PD-1, respectivamente.

Para este fin, se vacunaron ratones C57BL/6 tres veces (Semana 0, Semana 2 y Semana 4) s.c., i.d. o i.m. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7). Se obtuvo sangre de ratones 7 días después de la 2ª y la 3ª vacunaciones y se realizó tinción FACS. La expresión de KLRG1 y PD-1 se analizó en linfocitos T CD8 positivos para multímeros (un experimento con 4 ratones por grupo). Los resultados se muestran en la Figura 25.

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

A diferencia de KLRG 1, la expresión de PD-1 está disminuyendo con el tiempo y las vacunaciones, para las vías de vacunación subcutánea e intramuscular. Esto sugiere que los linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL no están agotados. El porcentaje de células PD1 positivas entre los linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL también se reduce después de la vacunación s.c. e i.m. (datos no mostrados). Es importante señalar que la expresión de PD-1 es mayor después de la 2ª vacunación cuando los ratones fueron vacunados por vía subcutánea, reflejando el estado de activación temprana de linfocitos T específicos (Keir, M.E., *et al.*, PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26: p. 677-704).

También se analizó la expresión del marcador de agotamiento tardío Tim-3. Una expresión muy baja como se observa en todos los grupos.

Tomado en conjunto, los resultados indican que la vacunación subcutánea provoca la mejor respuesta inmunitaria CD8 específica en comparación con las inyecciones intramusculares o intradérmicas.

Ejemplo 14: Vía de administración intraganglionar (no se incluye en las reivindicaciones)

Basándose en los experimentos anteriores (Ejemplo 13), se investigó adicionalmente la vía de administración intraganglionar. Para este fin, se investigó la respuesta inmunitaria provocada por la inyección intraganglionar de Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7).

Para este fin, a los ratones se les inyectó por primera vez Evans Blue por vía subcutánea para permitir visualizar fácilmente los ganglios linfáticos para la inyección e inyectarlos por vía intraganglionar sin cirugía invasiva, por ejemplo, como se describe en Jewell, C.M., S.C. López y D.J. Irvine, In situ engineering of the lymph node microenvironment via intranodal injection of adjuvant-releasing polymer particles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011. 108(38): p. 15745-50.

Se vacunaron ratones C57BL/6 dos veces cada dos semanas (Semana 0 y Semana 2) por vía intraganglionar con 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7). La 1ª vacunación se realizó en el ganglio linfático inguinal derecho, mientras que la segunda vacunación se realizó en el ganglio linfático inguinal izquierdo. Se obtuvo sangre de ratones 7 días después de la 2ª vacunación y se realizó tinción con multímeros (3 ratones por grupo). En otras palabras, la respuesta de los linfocitos T CD8+ específicos de SIINFEKL se analizó una semana después de la 2ª vacunación en sangre. La Figura 26 muestra las respuestas de los linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL. Esos datos indican que también la inyección intraganglionar fue capaz de provocar linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL.

Ejemplo 15: Control estricto de vacunación (no se incluye dentro de las reivindicaciones)

El trabajo de evaluación del control estricto de vacunación se inició con el objetivo de identificar el impacto de la tercera vacunación usando el mismo constructo Z13Mad5Anaxa descrito anteriormente (véase el Ejemplo 7). Se eligió la vía

subcutánea dados los resultados anteriores.

En el experimento se realizaron las dos primeras vacunaciones en la semana 0 y la semana 2 con una 3ª vacunación en la semana 4 (Figura 27 A) o en la semana 8 (Figura 27B). Por lo tanto, se vacunaron ratones C57BL/6 tres veces (Figura 27 A y C: Semana 0, Semana 2 y Semana 4 y Figura 27 B y D: Semana 0, Semana 2 y Semana 8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Se obtuvo sangre de ratones 7 días después de la última vacunación y se realizó tinción con pentámero (un experimento con 4 ratones por grupo). En consecuencia, La respuesta de los linfocitos T CD8+ específicos de SIINFEKL se analizó 1 semana después de la 2ª y la 3ª vacunaciones (Figura 27 A y B). Adicionalmente, la función efectora de los linfocitos T específicos de SIINFEKL se evaluó analizando la expresión de KLRG 1 en linfocitos T CD8 específicos (Figura 27C y D).

Los datos indican que, en comparación con el control, el porcentaje de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL aumentó significativamente en todos los puntos temporales analizados (Vac2 y Vac3), así como en ambos esquemas de vacunación (Figura 27 A y B).

De manera interesante, la tercera vacunación en la semana 4 permitió aumentar de manera más destacada el porcentaje de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL (Figura 27 A). Las mismas células también demuestran una función efectora mejorada a través de una mayor expresión de KLRG 1 (Figura 27 C). Por el contrario, con una tercera vacunación realizada en la Semana 8 no pudo observarse ninguna mejora de la segunda a la tercera vacunación en la respuesta inmunitaria específica de SIINFEKL y en la expresión de KLRG 1.

Tomado en conjunto, estos resultados indican que la respuesta inmunitaria CD8 podría aumentarse si se acortara el retraso entre la segunda y la tercera vacunaciones.

Dado que una tercera vacunación más temprana parece aumentar la respuesta inmunitaria, en el siguiente estudio se investigaron dos esquemas cortos de vacunación:

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

De nuevo, se usaron ratones C57BL/6 y la vacunación se realizó s.c. con 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7). La tinción con multímeros se realizó en muestras de sangre obtenidas una semana después de la 2ª y la 3ª vacunaciones (un experimento con 4 ratones por grupo).

Por lo tanto, La respuesta de los linfocitos T CD8+ específicos de SIINFEKL se analizó una semana después de la 2ª y la 3ª vacunaciones (Figura 28A y D): Adicionalmente, la función efectora de los linfocitos T específicos de SHNFEKL se evaluó analizando la expresión de KLRG 1 en linfocitos T CD8 específicos (Figuras 28B y 28E) y el estado de agotamiento analizando la expresión de PD-1 de linfocitos T específicos (Figuras 28C y 28F).

Los datos indican que, de manera similar al primer estudio sobre el control estricto de vacunación descrito anteriormente, en comparación con el control, el porcentaje de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL aumentó en todos los puntos temporales evaluados (Vac2 y Vac3), así como en ambos controles estrictos de vacunación (Figura 28 A y B).

Sin embargo, en comparación con el control estricto semana 0-semana 2-semana 4, un control estricto con vacunaciones el Día 0, el Día 3 y el Día 7 no provocó una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL tan alta. En cuanto al control estricto de vacunaciones del Día 0, el Día 7 y el Día 14, la respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL provocada es mejor en comparación con el control estricto anterior (d0-d3-d7), pero no se mantiene después de la 3ª vacunación.

Tomado en conjunto, el conjunto de datos del control estricto de vacunación indica que el control estricto de vacunación Semana 0-Semana 2-Semana 4 es el mejor control estricto de vacunación para inducir una potente respuesta inmunitaria CD8 específica de OVA con una alta función efectora.

Ejemplo 16: Capacidad de las construcciones conjugadas de agonista de TLR-CPP para activar células presentadoras de antígenos (APC) murinas (no se incluye en las reivindicaciones)

Para investigar el efecto de ambos, el componente CPP y el componente agonista de TLR en un complejo para su uso, de nuevo se usaron las proteínas de fusión descritas anteriormente (véanse los Ejemplos 1, 2 y 7).

Además, se diseñó un "péptido de control" adicional, que también es una proteína de fusión y que comprende la proteína "MAD5", que consiste en diferentes epítopos CD8+ y CD4+ de diversos antígenos y el agonista del péptido TLR2 "Anaxa" (es decir, sin péptido de penetración celular). En consecuencia, adicionalmente se diseñó la siguiente construcción de control:

Mad5Anaxa

Secuencia:

MHHHHHHHESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPRF
 AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLEWT GSSTVHEILC KLSLEGDHST
 PPSAYGSVKP YTNFDAE
 [SEQ ID NO: 32]

5

Peso molecular: 13933 Da

Características:

- 10 - La carga Mad5 contiene epítopos OVACD4, gp100CD8, EalfaCD4 y OVACD8
 - Contiene el péptido de 35 unidades monoméricas de Anexina en posición C-terminal
 - Tampón de almacenamiento: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Glicerol al 10 %, DTT 2 mM, L-arginina 0,5 M, pH 8
 - Nivel de endotoxinas: Lote 1 - 12,15 UE/mg

15 El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de dos complejos ilustrativos, a saber, EDAZ13Mad5 (véase Ejemplo 1) y Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7), para promover la activación de las células presentadoras de antígenos en comparación con complejos de referencia que carecen del componente peptídico penetrante celular Z13 (Mad5Anaxa, véase anteriormente; EDAMad5, véase el Ejemplo 2) o el agonista de TLR (Z13Mad5, véase el Ejemplo 1).

20 Para este fin, se evaluó la capacidad de las construcciones mencionadas anteriormente para promover la activación de las células presentadoras de antígenos (APC) en células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC), que expresan todos los TLR excepto TLR7.

25 Las BMDC se sembraron en una placa plana de 96 pocillos en medio de cultivo, se estimularon con 1 μ M de Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7), Mad5Anaxa (véase anteriormente), Z13Mad5 (véase el Ejemplo 1), EDAZ13Mad5 (véase el Ejemplo 1) o EDAMad5 (véase el Ejemplo 2) y se incubaron durante 24 h a 37 °C.

30 La activación de APC se investigó mediante el seguimiento de la secreción de IL-6 en el sobrenadante del cultivo de BMDC. La secreción de IL-6 se cuantificó mediante ELISA en el sobrenadante.

35 Los resultados se muestran en la Figura 29. Estos datos muestran claramente que Z13Mad5Anaxa fue capaz de activar BMDC, mientras que no se observó tal activación cuando las células se cultivaron en presencia de Z13Mad5 o Mad5Anaxa. Esto sugiere que no solo el agonista de TLR (Anaxa o EDA) es crítico para la activación de macrófagos y células dendríticas, sino que el CPP también es necesario. También la presencia de CPP sin el agonista de TLR no es suficiente, pero de hecho ambos, el agonista de CPP y de TLR son fundamentales para la activación de macrófagos y células dendríticas.

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

45 Se sembraron células Raw 264.7 en una placa plana de 96 pocillos en medio de cultivo, se estimularon con 1 μ M de Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7), Mad5Anaxa (véase anteriormente) o Z13Mad5 (véase el Ejemplo 1) y se incubaron durante 24 h a 37 °C.

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

Se cree que el CPP puede facilitar la entrada de la molécula en las células, permitiendo un mejor direccionamiento de los TLR intracelulares.

55 Tomado en conjunto, los datos revelan el papel fundamental de ambos, el agonista de CPP y de TLR, dentro de las construcciones conjugadas para activar APC. Este efecto puede deberse a ayudar a la entrada de la construcción en las células, por lo tanto, dando como resultado una focalización óptima del TLR intracelular.

Ejemplo 17: Capacidad de las construcciones conjugadas para unirse al TLR4 humano (no se incluye en las reivindicaciones)

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

- 5 Por otra parte, como se muestra anteriormente en el Ejemplo 8 y en la Figura 14, un complejo para su uso que comprende el péptido Anaxa como agonista de TLR, por ejemplo, Z13Mad5Anaxa, es capaz de unirse a TLR2 humano y promover la secreción de IL-8 por células HEK-hTLR2 (véase el Ejemplo 8, la Fig. 14).

10 En el presente estudio, se evaluó la capacidad de complejos que comprenden el péptido Anaxa como agonista de TLR o el péptido EDA como agonista de TLR para unirse a TLR4 humano. Para este fin, se sembraron células HEK transfectadas con TLR4 humano (HEK-hTLR4) en una placa plana de 96 pocillos en medio de cultivo, se estimularon con 1 μ M de Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7), Mad5Anaxa (véase anteriormente), Z13Mad5 (véase el Ejemplo 1), EDAZ13Mad5 (véase el Ejemplo 1) o EDAMad5 (véase el Ejemplo 2) y se incubaron durante 24 h a 37 °C. La secreción de IL-8 se cuantificó mediante ELISA en el sobrenadante.

15 Los resultados se muestran en la Figura 31. Como era de esperar, la incubación de HEK-hTLR4 con EDAZ13Mad5 dio como resultado una notable secreción de IL-8, indicando la unión de EDAZ13Mad5 a TLR4. En línea con los resultados obtenidos en el Ejemplo 16, la secreción de IL-8 de EDAMad5 (sin CPP) fue notablemente menor en comparación con EDAZ13Mad5, mostrando el efecto de la presencia de un CPP. La construcción Z13Mad5, que no comprende un agonista de TLR, no mostró secreción de IL-8, indicando, como era de esperar, una falta de unión a TLR4.

20 De manera interesante, la incubación de HEK-hTLR4 con la construcción Z13Mad5Anaxa dio como resultado la secreción de IL-8 más pronunciada, indicando la unión de Z13Mad5Anaxa a TLR4. Esto es asombroso, ya que anteriormente se había planteado la hipótesis de que Anaxa era un agonista de TLR2. De nuevo, la misma construcción pero sin el CPP (Mad5Anaxa) dio como resultado una secreción de IL-8 notablemente menor, confirmando los resultados obtenidos en el Ejemplo 16.

25 Tomado en conjunto, estos datos (i) confirman los resultados obtenidos en el Ejemplo 16, (ii) confirman que EDA es efectivamente un agonista de TLR4 y (iii) muestran sorprendentemente que el péptido Anaxa también es un agonista de TLR4 (además de ser un agonista de TLR2, véanse el Ejemplo 8 y la Fig. 14).

Ejemplo 18: Eficacia de la vacuna sobre el crecimiento tumoral en un modelo de metástasis pulmonar: entorno semiterapéutico: Agonista de TLR EDA (no incluido en las reivindicaciones)

35 Este estudio se basa en el Ejemplo 6, mostrando la eficacia de un complejo para su uso, a saber, EDAZ13Mad5, en un modelo de metástasis pulmonar de melanoma en un entorno profiláctico (véase la Figura 13).

40 En el presente estudio se usó el mismo modelo de metástasis pulmonar así como las proteínas de construcción EDAZ13Mad5 y Z13Mad5 + MPLA (véanse los Ejemplos 1 y 2 para el diseño de las construcciones). Sin embargo, en el entorno semiterapéutico, se vacunaron ratones C57BL/6 al mismo tiempo que se implantaron las células tumorales (d0) y, para un segundo tiempo, a los nueve días después de la implantación (d9). La vacunación se realizó mediante inyección subcutánea de 2 nmol de EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) o MPLA s.c. en el flanco derecho. El día 0, los ratones se implantaron i.v. con 1×10^5 células tumorales de melanoma B16-OVA y se vacunaron dos veces (d0 y d9) mediante inyección subcutánea de 2 nmol de EDAZ13Mad5, Z13Mad5 + MPLA (equimolar a EDA) o MPLA solo s.c. en el flanco derecho. Los ratones se sacrificaron el día 13 y se recuperó el pulmón. Los resultados se muestran en la Fig. 32.

50 Los resultados muestran que EDAZ13Mad5 es ligeramente más potente que Z13Mad5 + MPLA para inhibir el crecimiento de metástasis de melanoma. Además, no se observó ningún efecto adyuvante en ratones a los que se les inyectó MPLA solo.

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

Ejemplo 19: Eficacia de la vacuna sobre el crecimiento tumoral en un modelo de metástasis pulmonar: entorno semiterapéutico: Agonista de TLR Anaxa (no incluido en las reivindicaciones)

60 Este estudio se basa en el Ejemplo 18 con el mismo modelo (entornos semiterapéuticos) y control estricto experimental. Sin embargo, se investigó el efecto de complejos que comprenden el péptido "Anaxa" como agonista de TLR, en lugar del agonista de TLR EDA como en el Ejemplo 18.

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

Los resultados muestran que Z13Mad5Anaxa es sensiblemente más potente que Z13Mad5 + Pam3CSK4 para inhibir el crecimiento de metástasis de melanoma. Por el contrario, Mad5Anaxa no fue capaz de controlar el crecimiento de metástasis en el pulmón, subrayando nuevamente la importancia del CPP.

En conjunto, el experimento de metástasis pulmonar B1 6-OVA demostró que Z13Mad5Anaxa era muy eficaz para inhibir el crecimiento de metástasis de melanoma en el pulmón.

Ejemplo 20: Eficacia de la vacuna en un modelo de glioblastoma (no se incluye en las reivindicaciones)

En este estudio, se usó otro modelo de cáncer, es decir, un modelo de glioblastoma. El glioma es la forma más frecuente de tumor cerebral primario en adultos, siendo el glioblastoma multiforme (GBM) el más letal. Este tumor es conocido por su comportamiento altamente invasivo y agresivo. Actualmente, el mejor tratamiento contra el GBM es un régimen que incluye una combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia, que tiene un período de supervivencia medio de solo 14,6 meses. Hay una necesidad médica urgente insatisfecha de nuevas modalidades de tratamiento que mejoren el pronóstico de los pacientes con glioma. La inmunoterapia mediada por linfocitos T es una opción de tratamiento conceptualmente atractiva para su uso junto con las modalidades existentes para el glioma, en particular GBM altamente invasivo.

El glioma G1261 es un modelo de glioma de ratón inducido por carcinógenos. Este modelo representa uno de los pocos modelos de tumores cerebrales desarrollados en animales inmunocompetentes, que tiene características de crecimiento similares al GBM humano (Newcomb, E. y D. Zagzag, The murine GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments, in CNS Cancer Models, Markers, Prognostic, Factors, Targets, and Therapeutic Approaches, E.G. Van Meir, Editor. 2009, Humana Press: Atlanta. p. 227-241; Jacobs, V.L., *et al.*, Current review of *in vivo* GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. ASN Neuro, 2011. 3(3): p. e00063). Un número bajo de células G1261 trasplantadas intracranalmente formaron tumores intracraneales en ratones C57BL/6 (Zhu, X., *et al.*, Poly-/CLC promotes the infiltration of effector T cells into intracranial gliomas via induction of CXCL10 in IFN- α and IFN- γ dependent manners. Cancer Immunol Immunother, 2010. 59(9): p. 1401-9; Zhu, X., *et al.*, El ligando poli-/CLC del receptor de tipo Toll 3 promueve la eficacia de las vacunaciones periféricas con epítomos peptídicos derivados de antígenos tumorales en modelos murinos de tumores del SNC. J Transl Med, 2007. 5: p. 10). Las células son moderadamente inmunogénicas: son capaces de provocar una respuesta inmunitaria específica del tumor en el sitio del tumor. Sin embargo, las células inmunitarias específicas del tumor no son capaces de eliminar completamente el tumor.

Recientemente, M. Ollin generó un nuevo modelo G1261 (Ohlfest, J.R., *et al.*, Vaccine injection site matters: qualitative and quantitative defects in CDB T cells primed as a function of proximity to the tumor in a murine glioma model. J Immunol, 2013. 190(2): p. 613-20) transfecando la línea celular G1261 con el "Casete Quad" que expresa cuatro péptidos presentados por moléculas H-2b de clase I o II: gp100₂₅₋₃₃ de ser humano, OVA₂₅₇₋₂₆₄ de pollo, OVA₃₂₃₋₃₃₉ de ratón e I-E α ₅₂₋₆₈ de ratón. La línea celular Quad-G1261 también expresa de manera estable luciferasa, lo que permite el seguimiento del crecimiento tumoral mediante bioluminiscencia.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de un complejo para su uso en el modelo de glioblastoma Quad-G1261.

El efecto de un complejo para su uso, concretamente Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7) se evaluó en el modelo de glioblastoma descrito anteriormente. La localización de linfocitos T en el sitio del tumor se analizó, por lo tanto, en ratones portadores de tumor G1261-Quad vacunados dos veces (semana 1 y semana 3) con la vacuna Z13Mad5Anaxa. Se usó como control un grupo vacunado con Z13Mad5 y Anaxa (equimolar a Z13Mad5Anaxa) administrados por separado. Brevemente, se implantaron ratones C57BL/6 i.c. (intracranalmente) con 5×10^5 células tumorales G1261-Quad y se vacunaron dos veces (en d7 y d21 después de la implantación) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (grupo 1) o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa (grupo 2). En la semana 4, se analizaron la sangre y los leucocitos infiltrantes del cerebro (BIL), de tal manera que los linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL se cuantificaron en sangre y en BIL en d28 mediante tinción con multímeros (5-8 ratones por grupo). Los resultados se muestran en la Figura 34.

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

Después de dos vacunaciones con Z13Mad5Anaxa, la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos de SIINFEKL en los BIL fue 2 veces mayor (24 %) que con Z13Mad5 + Anaxa (12 %).

A continuación, se evaluó la secreción de citocinas. Para este fin, a ratones C57BL/6 se les implantaron i.c. 5×10^5 células tumorales G1261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y 21) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. BIL se aislaron y se cultivaron durante 6 h con BMDC

madurados cargados o no con el péptido SIINFEKL en presencia de BrefeldinA antes de la tinción intracelular para citocinas. Los resultados se muestran en la Figura 35.

A pesar de la heterogeneidad, se observó un alto nivel de secreción de citocinas en los linfocitos T CD8 infiltrantes del cerebro de ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa. Estos resultados demuestran que la vacuna Z13Mad5Anaxa fue capaz de provocar una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL más fuerte en el cerebro de ratones portadores de tumores con una potente función efectora.

Los resultados obtenidos indican que Z13Mad5Anaxa es eficaz para provocar una alta respuesta inmunitaria CD8 específica de SIINFEKL infiltrante en el cerebro. Z13Mad5Anaxa es capaz de promover la secreción de citocinas por parte de los linfocitos T CD8 específicos de antígeno en el cerebro.'

Ejemplo 21: Eficacia de la vacuna sobre la supervivencia en el modelo de glioblastoma GL261-Quad (no se incluye en las reivindicaciones)

En un experimento independiente, se monitorizó la supervivencia de los ratones control y vacunados con Z13Mad5Anaxa. Los escenarios terapéuticos fueron tres vacunaciones consecutivas con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa los días 7, 21 y 35, después de la implantación tumoral i.c.

A ratones C57BL/6 se les implantaron i.c. 5×10^5 células tumorales G1261-Quad y se vacunaron tres veces (d7, d21 y d35) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa. Los ratones se pesaron diariamente y se sacrificaron cuando la pérdida de peso alcanzó más del 15 %. Los resultados se muestran en la Figura 36.

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

Ejemplo 22: Eficacia de la vacuna en un modelo de tumor subcutáneo: entorno profiláctico (no se incluye en las reivindicaciones)

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

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

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

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

Ejemplo 23: Eficacia de la vacuna en un modelo de tumor subcutáneo - entorno terapéutico con tumor establecido (no se incluye en las reivindicaciones)

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

Para este fin, se usó el modelo s.c. de células de melanoma B16-OVA. En este modelo las células tumorales se propagan lentamente, permitiendo por lo tanto una ventana de tiempo de vacunación más amplia.

La primera vacunación con la dosis baja de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa se realizó una vez que el tumor se estableció y fue visible, es decir, el día 14 después de la implantación de las células tumorales. Se realizó una segunda vacunación el día 21.

Por lo tanto, A ratones C57BL/6 se les implantaron s.c. con 1×10^5 células tumorales B16-OVA en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (d14 y d21) mediante inyección s.c. de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa en el flanco derecho. Se monitorizaron las curvas de crecimiento y supervivencia del tumor. Los resultados se muestran en la Fig. 38.

Los resultados indican que Z13Mad5Anaxa controla eficazmente el crecimiento de un tumor establecido y visible. Por

otra parte, a pesar de un tumor establecido y visible, las tasas de supervivencia aumentaron en los ratones tratados con Z13Mad5Anaxa en comparación con los controles.

Ejemplo 24: Eficacia de la vacuna en un modelo de tumor subcutáneo - entorno terapéutico: efecto del CPP (no se incluye en de las reivindicaciones)

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

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

Los resultados muestran que los ratones tratados con Z13Mad5Anaxa muestran un volumen tumoral significativamente disminuido y una tasa de supervivencia significativamente mayor en comparación con ambos, ratones control y ratones tratados con Mad5Anaxa, es decir, una construcción sin CPP. Estos resultados indican que la presencia de un CPP da como resultado una disminución significativa del volumen del tumor y una tasa de supervivencia significativamente mayor, es decir, una eficiencia aumentada de la vacunación. Por lo tanto, los resultados indican, junto con los resultados obtenidos en el Ejemplo 10, que la presencia de un CPP y el agonista de TLR ejercen un efecto sinérgico sobre el crecimiento tumoral y la tasa de supervivencia.

Ejemplo 25: Comparación de la cinética de las respuestas inmunitarias con complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular (no se incluye en las reivindicaciones)

Para investigar el efecto de diferentes CPP en el complejo para su uso, se usó la proteína de fusión Z13Mad5Anaxa como se describió anteriormente (véase el Ejemplo 7).

Además, se diseñaron proteínas de fusión adicionales, que comprenden CPP distintos de Z13, en concreto Z14 (SEQ ID NO: 7) o Z18 (SEQ ID NO: 11). Esas proteínas de fusión también comprenden la proteína "MAD5", que consiste en diferentes epítomos CD8 y CD4⁺ de varios antígenos y el péptido agonista de TLR2 "Anaxa". En consecuencia, las siguientes construcciones se diseñaron adicionalmente:

Z14Mad5Anaxa

Secuencia:

```
MHHHHHHHKRY KNRVASRKS R AKFKQLLQHY REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV
VGVCALKVPR NQDWLGVPFR AKFASFEAQG ALANIAVDKA NLDVEQLES I NFEKLTWT
GSSTVHEILC KLSLEGDHST PPSAYGSKVP YTNFDAE
(SEQ ID NO: 33)
```

Z18Mad5Anaxa

Secuencia:

```
MHHHHHHHREV AAAXSEND R LRLLKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVCALKVPRN
QDWLGVPFR KFAFSAQGA LANIAVDKAN LDVEQLES I NFEKLTWTG SSTVHEILCK
LSLEGDHSTP PSAYGSKVPY TNFDAE
(SEQ ID NO: 34)
```

Se asignaron ratones C57BL/6 a ocho grupos diferentes (4 ratones por grupo): recibiendo tres grupos 2 nmol de Z13Mad5Anaxa, Z14Mad5Anaxa o Z18Mad5Anaxa y un control respectivo y recibiendo tres grupos 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa, Z14Mad5Anaxa o Z18Mad5Anaxa y su respectivo control. Los ratones se vacunaron cinco veces (Semana 0, Semana 2, Semana 4, Semana 6 y Semana 8) s.c. Los ratones se desangraron 7 días después de la 2ª, 3ª, 4ª y 5ª vacunaciones y se realizó tinción de multímeros (un experimento con 4 ratones por grupo).

Los resultados se muestran en la Figura 40. Todos los grupos vacunados con Z13Mad5Anaxa, Z14Mad5Anaxa o Z18Mad5Anaxa mostraron un porcentaje aumentado de células positivas para multímeros en comparación con el

grupo de control (excepto para la segunda vacunación de Z18Mad5Anaxa). Estos resultados indican que los complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular son capaces de provocar una respuesta inmunitaria a diferentes dosis.

5 Ejemplo 26: Comparación de las respuestas inmunitarias de linfocitos T con complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular (no se incluye en las reivindicaciones)

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

10 Los ratones C57BL/6 del grupo Z13Mad5Anaxa y del grupo Z14Mad5Anaxa se vacunaron cinco veces (Semana 0, Semana 2, Semana 4, Semana 6 y Semana 8) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7) o Z14Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 25). Nueve días después de la 5ª vacunación, se sacrificó a los ratones, los órganos se recuperaron y se realizó tinción de multímeros para identificar el porcentaje de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL en bazo, médula ósea y ganglios linfáticos de drenaje (inguinal y axilar).

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

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

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

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

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

40 Además, en los grupos de ratones descritos anteriormente, la tinción intracelular se realizó en células del bazo estimuladas con el péptido SIINFEKL OVACD8 (SEQ ID NO: 35) para identificar células CD107a⁺IFN-γ⁺TNF-α⁺. Los resultados se muestran en la Figura 43. Los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa o con Z14Mad5Anaxa mostraron un aumento similar en las células CD107a⁺IFN-γ⁺TNF-α⁺.

45 Ejemplo 27: Comparación del efecto de complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular sobre el crecimiento y la supervivencia del tumor en el modelo EG.7-OVA s.c. (no se incluye en las reivindicaciones)

50 Para investigar los efectos de los complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular sobre el crecimiento y la supervivencia del tumor se usó el modelo EG.7-OVA s.c. En d0 a los ratones C57BL/6 se les implantó s.c. con 3×10⁵ células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se asignaron a tres grupos diferentes (sin tratamiento previo, Z13Mad5Anaxa y Z14Mad5Anaxa). Los ratones se vacunaron dos veces en d5 y d13 después de la implantación del tumor mediante inyección s.c. de 0,5 nmol de Z13Mad5Anaxa o de Z14Mad5Anaxa en el flanco derecho.

55 Los resultados se muestran en la Figura 44. La vacunación con Z13Mad5Anaxa o con Z14Mad5Anaxa dio como resultado volúmenes tumorales significativamente reducidos en comparación con los ratones de control (Figura 44 A) así como tasas de supervivencia significativamente mayores en comparación con los ratones de control (Figura 44 B). Esos resultados indican que ambos complejos, Z13Mad5Anaxa y Z14Mad5Anaxa, son capaces de disminuir significativamente el crecimiento tumoral y prolongar significativamente la supervivencia.

60 Ejemplo 28: Comparación de las respuestas inmunitarias después de la vacunación con complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular (no se incluye en las reivindicaciones)

En este experimento se investigó el efecto de diferentes CPP en el complejo para su uso usando un complejo con el agonista de TLR "EDA". Por lo tanto, se usó la proteína de fusión EDAZ13Mad5 como se describe anteriormente (véase el Ejemplo 1).

- 5 Además, se diseñaron proteínas de fusión adicionales, que comprenden CPP distintos de Z13, en concreto Z14 (SEQ ID NO: 7) o Z18 (SEQ ID NO: 11). Esas proteínas de fusión también comprenden la proteína "MAD5", que consiste en diferentes epítomos CD8⁺ y CD4⁺ de varios antígenos y el péptido agonista de TLR4 "EDA". En consecuencia, las siguientes construcciones se diseñaron adicionalmente:

10 EDAZ14Mad5

Secuencia:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQCQVSRYSR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAEQLQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTKRY KNRVASRKS R AKFKQLLQHY
REVAAAKESL KISQAVHAAH AEINEAGREV VGVGALKVPR NQDWLGVPRF AKFASFEAQG
ALANIAVDKA NLDVEQLESI INFEKLTWT GS
(SEQ ID NO: 37)

15 EDAZ18Mad5

Secuencia:

MHHHHHHNID RPKGLAFTDV DVDSIKIAWE SPQCQVSRYSR VTYSSPEDGI RELFPAPDGE
DDTAEQLQGLR PGSEYTVSVV ALHDDMESQP LIGIQSTREV AAKSSENDER LRLLLKESLK
ISQAVHAAHA EINEAGREVV GVGALKVPRN QDWLGVPRFA KFAFASFEAQGA LANIAVDKAN
NLDVEQLESII NFEKLTWTG S
(SEQ ID NO: 38)

- 20 Se asignaron ratones C57BL/6 a ocho grupos diferentes (4 ratones por grupo): recibiendo tres grupos 2 nmol de EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5 o EDAZ18Mad5 y un control respectivo y recibiendo tres grupos cualquiera de 0,5 nmol de EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5 o EDAZ18Mad5 y un respectivo grupo control. Los ratones se vacunaron tres veces (Semana 0, Semana 2 y Semana 4) s.c. Los ratones se desangraron 7 días después de la 2^a y la 3^a vacunaciones y se realizó tinción de multímeros (un experimento con 4 ratones por grupo).

- 25 Los resultados se muestran en la Figura 45. Todos los grupos vacunados con EDAZ13Mad5, EDAZ14Mad5 o EDAZ18Mad5 mostraron un mayor porcentaje de células positivas para multímeros en comparación con el grupo de control. Estos resultados indican que los complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular son capaces de provocar una respuesta inmunitaria a diferentes dosis.

30 Ejemplo 29: Efecto de EDAZ14Mad5 sobre el crecimiento tumoral y la supervivencia en el modelo EG.7-OVA s.c. (no se incluye en las reivindicaciones)

- 35 Para investigar el efecto de EDAZ14Mad5 sobre el crecimiento y la supervivencia del tumor se usó el modelo EG.7-OVA s.c. (véanse el Ejemplo 4 y las Figuras 9-11 para conocer el efecto de EDAZ13Mad5 en el mismo modelo).

- 40 En d0 a los ratones C57BL/6 se les implantó s.c. con 3×10^5 células tumorales EG7-OVA en el flanco izquierdo y se asignaron a dos grupos diferentes (sin tratamiento previo y EDAZ14Mad5). Los ratones se vacunaron dos veces en d5 y d13 después de la implantación del tumor mediante inyección s.c. de 0,5 nmol de EDAZ14Mad5 en el flanco derecho.

- 45 Los resultados se muestran en la Figura 46. De manera similar a EDAZ13Mad5 (véanse el Ejemplo 4, las Figuras 9 - 11) la vacunación con EDAZ14Mad5 dio como resultado volúmenes tumorales significativamente reducidos en comparación con los ratones de control (Figura 46 A) así como tasas de supervivencia significativamente mayores en comparación con los ratones de control (Figura 46 B). Esos resultados indican que EDAZ14Mad5 es capaz de disminuir significativamente el crecimiento tumoral y prolongar significativamente la supervivencia, de manera similar a EDAZ13Mad5 (véanse el Ejemplo 4, las Figuras 9 - 11).

50

Ejemplo 30: Eficacia superior de la construcción de fusión Z13Mad5Anaxa en comparación con Z13Mad5 y Anaxa en un modelo de glioblastoma (no se incluye en las reivindicaciones)

Para investigar la eficacia de un complejo se eligió el modelo de glioblastoma (véase el Ejemplo 20). En concreto, Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7; SEQ ID NO: 28) se administró a un grupo de ratones, mientras que Z13Mad5 (SEQ ID NO: 29) y Anaxa (SEQ ID NO: 15) se administraron (ambos juntos) a otro grupo de ratones.

La migración dirigida de linfocitos T en el sitio del tumor se analizó en ratones portadores de tumores G1261-Quad (7-16 ratones por grupo) vacunados dos veces, en concreto el día 7 y el día 21 después de la implantación del tumor (día 0), con 2 nmol de vacuna Z13Mad5Anaxa. Un grupo vacunado con ambos, Z13Mad5 y Anaxa (equimolar a Z13Mad5Anaxa), se usó como control. Brevemente, se implantaron ratones C57BL/6 i.c. (intracranialmente) con 5×10^5 células tumorales G1261-Quad y se vacunaron dos veces (en d7 y d21 después de la implantación) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (grupo 1) o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa (grupo 2). El día 28, se analizaron la sangre y los leucocitos infiltrantes del cerebro (BIL), de tal manera que los linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL se cuantificaron en sangre y en BIL en d28 mediante tinción con multímeros (7 - 16 ratones por grupo).

Los resultados se muestran en la Figura 47. Se observó un porcentaje significativamente mayor de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL en la sangre de ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa en comparación con los ratones vacunados con ambos, Z13Mad5 y Anaxa (Fig. 47A). De forma similar, se observó una acumulación más fuerte de linfocitos T CD8 específicos de SHNFEKL en los BIL de ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa en comparación con ratones vacunados con Z13Mad5 y Anaxa por separado (Fig. 47B, $p = 0,0539$).

A continuación, se evaluó la secreción de citocinas. Para este fin, a ratones C57BL/6 se les implantaron i.c. 5×10^5 células tumorales G1261-Quad y se vacunaron dos veces (d7 y 21) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa. BIL se aislaron y se cultivaron durante 6 h con BMDC madurados cargados o no con el péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 35) en presencia de BrefeldinA antes de la tinción intracelular para citocinas.

Los resultados se muestran en la Figura 48. En general, se observó un alto nivel de secreción de citocinas en los linfocitos T CD8 infiltrantes del cerebro de ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa. En particular, se observó una secreción significativamente mayor de IFN- γ total y de IFN- γ y TNF- α juntos para los linfocitos T CD8 que se infiltran en el cerebro de ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa en comparación con ratones vacunados con Z13Mad5 y Anaxa por separado.

Tomado en conjunto, estos resultados demuestran que la vacuna Z13Mad5Anaxa (en comparación con Z13Mad5 y Anaxa administrados por separado) fue capaz de provocar una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8 específicos de SIINFEKL más fuerte en el cerebro de ratones portadores de tumores con una potente función efectora.

Los resultados obtenidos indican que Z13Mad5Anaxa es eficaz para provocar una alta respuesta inmunitaria CD8 específica de SIINFEKL infiltrante en el cerebro. Z13Mad5Anaxa es capaz de promover la secreción de citocinas por parte de los linfocitos T CD8 específicos de antígeno en el cerebro.

Ejemplo 31: Efecto de otra carga antigénica en el complejo (no se incluye en las reivindicaciones)

Para investigar el efecto de una carga antigénica diferente ("Mad8"), se diseñó otro complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un péptido agonista de TLR ("Z13Mad8Anaxa"). Z13Mad8Anaxa difiere de Z13Mad5Anaxa (descrito en el Ejemplo 7) en las cargas antigénicas. En particular, "Z13Mad8Anaxa" es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", comprendiendo la carga antigénica "MAD8" epítomos CD8 y CD4 de la glucoproteína 70, y el agonista peptídico de TLR "Anaxa". En lo sucesivo, la secuencia de aminoácidos de Z13Mad8Anaxa se muestra con el péptido de penetración celular "Z13" subrayado y el péptido agonista de TLR "Anaxa" en cursiva:

KRYKNRVASR KSRAKFKQLL QHYREVA^{AAK} SSENDRLRLLLK VTYHSPSYAY HQFERRAILN
RLVQFIKORI SVVQALVLT^S TVHERCKLS LEGDHSTPPS AYGSVKPYTN FDAE
(SEQ ID NO: 39)

Se vacunaron ratones Balb/c sin tratamiento previo (4 ratones por grupo) cuatro veces s.c. (semana 0, semana 2, semana 4 y semana 6 con 2 nmol de Z13Mad8Anaxa).

Para investigar las respuestas de los linfocitos T CD4 después de la vacunación, una semana después de la 4ª vacunación, los ratones se sacrificaron; los órganos se recuperaron y se realizó un ensayo Elispot *ex vivo* en células del bazo estimuladas con el péptido gp70CD4 (SEQ ID NO: 64) o el péptido gp70CD8 (SEQ ID NO: 65) para cuantificar los linfocitos T CD4 y CD8 específicas del epítipo productor de IFN- γ .

Los resultados se muestran en la Figura 49. Los ratones vacunados con Z13Mad8Anaxa mostraron un aumento significativo en las células productoras de IFN- γ en comparación con los ratones sin tratamiento previo. Estos datos muestran que la vacuna Z13Mad8Anaxa fue capaz de provocar una potente respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8 y CD4 específicos de epítipo y, por tanto, que el complejo es capaz de provocar una respuesta inmunitaria de autoantígeno.

Ejemplo 32: Efecto de otra carga antigénica en el complejo (no se incluye en las reivindicaciones)

Para investigar el efecto de una carga antigénica diferente adicional ("Mad11"), se diseñó otro complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un péptido agonista de TLR ("Z13Mad11Anaxa"). Z13Mad11Anaxa difiere de Z13Mad5Anaxa (descrito en el Ejemplo 7) en las cargas antigénicas. En particular, "Z13Mad11Anaxa" es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", comprendiendo la carga antigénica "MAD11" dos epítipos CD8 de survivina como se describe en Derouazi M, Wang Y, Marlu R, *et al.* Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector: Application to TRP-2. Bioengineered Bugs. 2010;1(1):51-60. doi:10.4161/bbug.1.1.9482 y el agonista del péptido TLR "Anaxa". En lo sucesivo, se muestra la secuencia de aminoácidos de Z13Mad11 Anaxa:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVA AAKSSENDRLRLLLKKNYRIATFKNWPFL EDCAMEELT
VSEFLKLD RQRSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSKPYTNF DAE
(SEQ ID NO: 40)

A ratones C57BL/6 (5 ratones por grupo) sin tratamiento previo se les implantó i.v. con 1×10^5 células tumorales de melanoma B16 y se vacunaron dos veces (d0 y d10) ' mediante inyección subcutánea de 1 nmol de Z13Mad11Anaxa.

El día 18 se sacrificaron los ratones, los órganos se recuperaron y se realizó el ensayo Elispot *ex vivo* en células del bazo estimuladas con los péptidos de survivina survivina20-28 (SEQ ID NO: 67) y survivina97-104: (SEQ ID NO: 68) para cuantificar linfocitos T específicos de survivina productores de IFN- γ .

Los resultados se muestran en la Figura 50. Los ratones vacunados con Z13Mad11Anaxa mostraron menos metástasis en comparación con los ratones sin tratamiento previo (Fig. 50A). Por otra parte, en el bazo de ratones vacunados con Z13Mad11 Anaxa se observaron números significativamente mayores de linfocitos T específicos de survivina productores de IFN- γ (Fig. 49B).

Los resultados obtenidos muestran que Z13Mad11Anaxa es eficaz para reducir el número de metástasis y Z13Mad11Anaxa es capaz de promover la secreción de citocinas por parte de los linfocitos T CD8 específicos de antígeno en el bazo.

Ejemplo 33: Efecto de otra carga antigénica en el complejo (no se incluye en las reivindicaciones)

Para investigar el efecto de una carga antigénica diferente adicional ("Mad9"), otro complejo que comprende un péptido de penetración celular, se diseñó un antígeno diferente y un péptido agonista de TLR ("Z13Mad9Anaxa"). Z13Mad9Anaxa difiere de Z13Mad5Anaxa (descrito en el Ejemplo 7) en la carga antigénica. En particular, "Z13Mad9Anaxa" es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", la carga antigénica "Mad9" que comprende el neoantígeno identificado por Yadav *et al.* Nature. 27 de nov de 2014;515(7528):572-6 de línea celular tumoral MC-38 y el agonista peptídico de TLR "Anaxa". En lo sucesivo, la secuencia de aminoácidos de Z13Mad9Anaxa se muestra con el péptido de penetración celular "Z13" subrayado y el péptido agonista de TLR "Anaxa" en cursiva:

KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVA AAKSSENDRLRLLLKHLELASMTNMELMSSIVSTVHEI
LCKLSLEGDHSTPPSAYGSKPYTNF DAE
(SEQ ID NO: 41)

Se vacunaron ratones C57BL/6 sin tratamiento previo (4 ratones por grupo) cuatro veces s.c. (semana 0, semana 2, semana 4 y semana 6 con 2 nmol de Z13Mad9Anaxa. Para investigar las respuestas de los linfocitos T CD8 después de la vacunación, una semana después de la 4ª vacunación, se sacrificó a los ratones, se recuperaron los órganos y se realizó el ensayo Elispot en células del bazo después de un período de 7 días de reestimulación *in vitro* con estimulado con péptido adpgk (SEQ ID NO: 66) para cuantificar linfocitos T CD8 específicos de epítipo productores de IFN- γ .

Los resultados se muestran en la Figura 51. Los ratones vacunados con Z13Mad9Anaxa mostraron un aumento

significativo en los linfocitos T CD8 específicos del neoantígeno efector en comparación con los ratones sin tratamiento previo.

Ejemplo 34: Comparación de las respuestas inmunitarias después de la vacunación con complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular (no se incluye en las reivindicaciones)

En este experimento se investigó el efecto de otro CPP diferente en el complejo usando un complejo con el agonista de TLR "Anaxa". Por lo tanto, se usó la proteína de fusión Z13Mad5Anaxa como se describe anteriormente (véase el Ejemplo 7, SEQ ID NO: 28).

Además, se diseñó una proteína de fusión adicional, que comprende el TAT CPP combinado con enlazadores de furina como se describe en Lu *et al.*, Multiepitope trojan antigen peptide vaccines for the induction of antitumor CTL and Th immune responses J. Immunol., 172 (2004), pp. 4575-4582. Esa proteína de fusión comprende también la proteína "MAD5", que consiste en diferentes epítomos CD8⁺ y CD4⁺ de varios antígenos y el péptido agonista de TLR4 "Anaxa". En consecuencia, adicionalmente se diseñó la siguiente construcción:

TatFMad5Anaxa

Secuencia:

```

KKRRRQRRRRVKKRISQAVHAAHAEINEACRRVKKVPRNQDWLRVKRASFEAQCGALANIAVD
KARVKRSIINFELRVKRSTVHEILCKLSLEGDHIPTPPSAYGKPYTNFDAE

```

(SEQ ID NO: 46)

se asignaron ratones C57BL/6 a tres grupos diferentes (8 ratones por grupo): recibiendo un grupo 2 nmol de Z13Mad5Anaxa, recibiendo un grupo 2 nmol de TatFMad5Anaxa y un control respectivo. Los ratones fueron vacunados dos veces (Semana 0 y Semana 2) s.c. con 2 nmol de Z13Mad5Anaxa o 2 nmol de TatFMad5Anaxa. Los ratones se desangraron 7 días después de la 2ª vacunación y se realizó tinción de multímeros (8 ratones por grupo).

Los resultados se muestran en la Figura 52. Los ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa o TatFMad5Anaxa mostraron un mayor porcentaje de células positivas para multímeros en comparación con el grupo de control. Estos resultados indican que los complejos que tienen diferentes péptidos de penetración celular son capaces de provocar una respuesta inmunitaria a diferentes dosis. Sin embargo, el CPP derivado de ZEBRA (Z13) fue mejor que el CPP TAT.

Ejemplo 35: Eficacia superior de la construcción de fusión Z13Mad5Anaxa en comparación con Z13Mad5 y Anaxa en ratones sin tratamiento previo (no se incluye en las reivindicaciones)

A continuación, la eficacia de un complejo se investigó en ratones sin tratamiento previo. En concreto, Z13Mad5Anaxa (véase el Ejemplo 7; SEQ ID NO: 28) se administró a un grupo de ratones, mientras que Z13Mad5 (SEQ ID NO: 29) y Anaxa (SEQ ID NO: 15) se administraron (ambos juntos) a otro grupo de ratones.

Se vacunaron ratones C57BL/6 del grupo Z13Mad5Anaxa y del grupo Z13Mad5 + Anaxa una vez (Semana 0) mediante inyección s.c. de 2 nmol de Z13Mad5Anaxa (grupo 1) o 2 nmol de Z13Mad5 y 2 nmol de Anaxa (grupo 2). El día 14, la sangre se analizó, de tal manera que los linfocitos T CD8 específicos de SIINFELK se cuantificaron en sangre y en BIL mediante tinción con multímeros (4 - 8 ratones por grupo).

Los resultados se muestran en la Figura 53. Se observó un porcentaje significativamente mayor de linfocitos T CD8 específicos de SIINFELK en la sangre de ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa en comparación con ratones vacunados con Z13Mad5 y Anaxa por separado (Fig. 53).

Tomado en conjunto, estos resultados demuestran que la vacuna Z13Mad5Anaxa (en comparación con Z13Mad5 y Anaxa administradas por separado) fue capaz de provocar una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8 específicos de SIINFELK más fuerte en la periferia.

Ejemplo 36: Efecto de otra carga antigénica en el complejo (no se incluye en las reivindicaciones)

Para investigar el efecto de una carga antigénica diferente adicional ("Mad12"), otro complejo que comprende un péptido de penetración celular, se diseñó un antígeno diferente y un péptido agonista de TLR ("Z13Mad12Anaxa"). Z13Mad12Anaxa difiere de Z13Mad5Anaxa (descrito en el Ejemplo 7) en la carga antigénica. En particular, "Z13Mad12Anaxa" es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13", la carga antigénica "MAD12" que comprende tres neoantígenos identificados por Yadav *et al.* Nature. 27 de nov de 2014;515(7528):572-6 de línea celular tumoral MC-38 y el agonista peptídico de TLR "Anaxa". En lo sucesivo, se

muestra la secuencia de aminoácidos de Z13Mad12Anaxa:

KRYKNRVA5RKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLKLFRAAQLANDVVLQIMEHLELA
SMTNMELMSSIVVISASIVFNLLLELGSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYC5VKPYTNFDAE
(SEQ ID NO: 69)

- 5 Se vacunaron ratones C57BL/6 sin tratamiento previo (4 ratones por grupo) dos veces s.c. (semana 0, semana 2) con 2 nmol de Z13Mad12Anaxa. Para investigar las respuestas de los linfocitos T CD8 después de la vacunación, una semana después de la 2ª vacunación, la sangre se analizó, de tal manera que los linfocitos T CD8 específicos del neoantígeno reps1 se cuantificaron en sangre y en BIL mediante tinción con multímeros (4 ratones por grupo).
- 10 Los resultados se muestran en la Figura 54. Los ratones vacunados con Z13Mad12Anaxa mostraron un aumento significativo en los linfocitos T CD8 específicos del neoantígeno efector en comparación con los ratones sin tratamiento previo.
- Ejemplo 37: Maduración *in vitro* de células dendríticas humanas (no se incluye en las reivindicaciones)
- 15 El objetivo de este estudio fue investigar la capacidad de un complejo para su uso ("Z13Mad5Anaxa", SEQ ID NO: 28, véase el Ejemplo 7) para inducir la maduración de células dendríticas en comparación con un complejo que carece de un péptido agonista de TLR ("Z13Mad5", SEQ ID NO: 29, véase el Ejemplo 1).
- 20 Se investigó la capacidad el polipéptido Z13Mad5Anaxa y el polipéptido Z13Mad5 para inducir la maduración de células dendríticas (DC) humanas. Después de la incubación durante la noche con 300 nM de proteína, la expresión de marcadores de activación (CD86, CD80, CD83 y HLA-DR) se evaluó en las DC humanas mediante FACS (Figura 55). Se usaron los mismos volúmenes de tampón de cada proteína como controles negativos.
- 25 Los resultados se muestran en la Fig. 55. Mientras que Z13Mad5Anaxa indujo la maduración de las DC humanas, mostrado por la regulación positiva de CD86, HLADR y CD83, Z13Mad5 no fue capaz de activar las DC humanas. Estos resultados indican que la porción Anaxa de la proteína es responsable de la regulación positiva de los marcadores de activación en las DC humanas.
- 30 Ejemplo 38: Respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8 durante el transcurso de la vacunación repetida (no se incluye en las reivindicaciones)
- 35 Para investigar si un conjunto de linfocitos T efectores podría mantenerse durante varios meses, se realizó vacunación repetida. En concreto, Se vacunaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea seis veces (semanas 0, 2, 4, 8, 12, 16) con 2 nmol de la construcción Z13Mad5Anaxa (SEQ ID NO: 28). Siete días después de cada vacunación (y antes de algunas vacunas), los ratones se desangraron y se realizó tinción con pentámero para controlar la respuesta inmunitaria específica de OVA en la sangre (dos experimentos con 4 ratones por grupo). En la Fig. 56, se muestra el porcentaje de linfocitos T CD8+ positivos a pentámero para ratones vacunados con Z13Mad5Anaxa y para ratones de control.
- 40 Estos datos muestran que podría mantenerse un conjunto de linfocitos T efectores durante cuatro meses (17 semanas) con seis vacunaciones.
- Ejemplo 39: Evaluación del complejo en el modelo murino de cáncer colorrectal MC38 (no se incluye en las reivindicaciones)
- 45 Para evaluar los efectos del complejo en un modelo murino de cáncer colorrectal, se eligió el modelo de cáncer colorrectal murino MC38. MC38 es una línea celular de carcinoma de colon.
- 50 A ratones C57BL/6 sin tratamiento previo se les implantaron s.c. con 2×10^5 células tumorales MC38 en el flanco izquierdo y se vacunaron dos veces (día 21 y día 7 antes de la implantación del tumor) mediante inyección subcutánea de 2 nmol de la construcción Z13Mad11 Anaxa (véase el Ejemplo 32, SEQ ID NO: 40) en el flanco derecho. La carga antigénica "Mad11" contiene dos epítomos de survivina expresados por el modelo colorrectal murino MC38.
- 55 Los resultados se muestran en la Figura 57. Los ratones vacunados con Z13Mad11 Anaxa mostraron un volumen tumoral significativamente menor en comparación con los ratones sin tratamiento previo (Fig. 57A). Por otra parte, los ratones vacunados con Z13Mad11Anaxa mostraron una tasa de supervivencia significativamente mayor (Fig. 57B).
- 60 Los resultados obtenidos muestran que Z13Mad11Anaxa fue capaz de reducir y retrasar significativamente el crecimiento del tumor en comparación con el control. Por otra parte, aumentó la tasa de supervivencia de los ratones vacunados con Z13Mad11Anaxa.

Ejemplo 40: Estudio preliminar de toxicidad en ratones (no se incluye en las reivindicaciones)

Para evaluar la toxicidad del complejo en ratones, se inyectó Z13Mad5Anaxa (SEQ ID NO: 28) a 2 nmol s.c. y i.v. en ratones C57BL/6 sin tratamiento previo. El muestreo de sangre se realizó a las 0,5, 1,5 y 3 h después de la administración. Se usó un kit multiplex comercial (Luminex) para la detección y cuantificación de citocinas en sangre y se tomaron muestras de cuatro ratones en cada momento. Sin embargo, no se pudo detectar ninguna expresión de citocinas proinflamatorias. Cabe señalar que el kit multiplex se comparó con un ELISA clásico con resultados similares (datos no mostrados).

A continuación, la dosis de Z13Mad5Anaxa (SEQ ID NO: 28) se aumentó a 10 nmol. Sin embargo, nuevamente no se detectaron citocinas después de la administración s.c. A diferencia de la administración s.c., se observó un aumento transitorio de IL-6 y TNF α 1,5 h después de la administración i.v. Sin embargo, este ligero aumento desapareció después de 3 h (Fig. 58). La inyección subcutánea de 10 nmol de Z13Mad5Anaxa en ratones no indujo la liberación de citocinas hasta 6 h después del tratamiento (datos no mostrados).

Ejemplo 41: Efectos de un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR en la localización de los linfocitos T en el sitio del tumor MC-38 (no se incluye en las reivindicaciones)

Para evaluar los efectos de un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR en la localización de los linfocitos T en el sitio del tumor, los ratones se vacunaron con péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR en el modelo de tumor MC-38. El día 27, se sacrificaron ratones y se realizó tinción FACS para controlar la respuesta inmunitaria específica de neoantígeno en los TIL (linfocitos infiltrantes del tumor).

Ratones C57BL/6 (cuatro ratones por grupo, hembra, 7 semanas de edad) se les implantó s.c. con 2×10^5 células tumorales MC-38 en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, se vacunaron ratones de los grupos "Z13Mad12Anaxa" los días 3, los días 10 y 17 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad12Anaxa (véase el Ejemplo 36; SEQ ID NO: 69) en la base de la cola.

Como se muestra en las Figuras 59, 60 y 61, los linfocitos T específicos de neoantígeno se acumulan en el sitio del tumor en ratones vacunados. El porcentaje de células positivas para múltiples aumentó significativamente en ratones vacunados con Z13Mad12Anaxa. El porcentaje más bajo de células positivas para múltiples se encontró en los ratones de control.

Ejemplo 42: Activación de células dendríticas humanas mediante construcciones humanas (no se incluyen en las reivindicaciones)

El objetivo de este estudio fue investigar la capacidad de diferentes complejos que comprenden diferentes cargas antigénicas humanas para inducir la maduración de células dendríticas humanas. Para este fin, cada una de las construcciones ATP110 (SEQ ID NO: 72), ATP112 (SEQ ID NO: 74), ATP115 (SEQ ID NO: 77), ATP117 (SEQ ID NO: 79), ATP118 (SEQ ID NO: 80), ATP119 (SEQ ID NO: 81), ATP120 (SEQ ID NO: 82), ATP122 (SEQ ID NO: 84), ATP123 (SEQ ID NO: 85) y ATP125 (SEQ ID NO: 87) se probaron. El indicador biológico usado para la evaluación de la activación de las DC fue el Índice de Activación que indica el porcentaje de activación en función de la intensidad de expresión de cuatro antígenos de membrana: HLA-DR, CD80, CD83 y CD86.

Después de la incubación durante la noche con 300 nM o 600 nM de cada una de las construcciones mencionadas anteriormente (ATP110 (SEQ ID NO: 72), ATP112 (SEQ ID NO: 74), ATP115 (SEQ ID NO: 77), ATP117 (SEQ ID NO: 79), ATP118 (SEQ ID NO: 80), ATP119 (SEQ ID NO: 81), ATP120 (SEQ ID NO: 82), ATP122 (SEQ ID NO: 84), ATP123 (SEQ ID NO: 85) y ATP125 (SEQ ID NO: 87)), la expresión de marcadores de activación (CD86, CD80, CD83 y HLA-DR) se evaluó en las células dendríticas humanas mediante FACS (Figuras 62 - 71). Se usaron los mismos volúmenes de tampón de cada construcción como controles negativos.

Los resultados se muestran en las Fig. 62 - 71 y todas las construcciones probadas muestran la maduración de las células dendríticas mostrada por la regulación positiva de CD86, HLA-DR y CD83.

Ejemplo 43: Efectos de la combinación de un inhibidor de PD1 y un complejo que comprende un péptido de penetración celular, diferentes antígenos y un agonista peptídico de TLR sobre el crecimiento tumoral y la tasa de supervivencia en un modelo de carcinoma de colon (no se incluye en las reivindicaciones)

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

Para este fin, a ratones C57BL/6 (trece a catorce ratones por grupo, hembra, 7 semanas de edad) se les implantó s.c. con 2×10^5 células tumorales MC-38 en el flanco izquierdo (día 0). Después de la implantación del tumor, se vacunaron

ratones de los grupos "Z13Mad12Anaxa" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1" los días 3, 10 y 17 por vía subcutánea con 2 nmol de Z13Mad12Anaxa (véase el Ejemplo 36; SEQ ID NO: 69) en la base de la cola. 200 µg de anticuerpo anti-PD1 (clon RMP1-14 (BioXcell, West Lebanon, NH, EE.UU.) se administraron i.p. en cada uno de los días 6, 10, 13, 17, 20, 24 y 27 a ratones de los grupos "anti-PD1" y "Z13Mad12Anaxa + anti-PD1". En los días 10 y 17, cuando se administraron ambos, Z13Mad12Anaxa y anticuerpo, el anticuerpo se administró i.p. justo después de la administración s.c. de Z13Mad12Anaxa. El tamaño del tumor se midió con un calibrador.

Como se muestra en las Figuras 72 y 73, el tratamiento con el inhibidor de PD1 solo o con Z13Mad12Anaxa solo dio como resultado una reducción significativa del volumen del tumor (Fig. 72A) y una supervivencia aumentada (Fig. 72B), en comparación con el grupo de control. Sin embargo, la combinación de ambos, el inhibidor de PD1 y Z13Mad12Anaxa, dio como resultado la mejora más pronunciada, en concreto una fuerte disminución del volumen del tumor y un fuerte aumento de las tasas de supervivencia. Cabe destacar que, en el grupo "Z13Mad12Anaxa + aPD1" solo tres ratones desarrollaron tumores (mientras que 10 ratones permanecieron libres de tumores), mientras que en el grupo "aPD1" y en el grupo "Z13Mad12Anaxa" ocho y diez ratones, respectivamente, desarrollaron tumores. En el grupo de control todos los ratones desarrollaron tumores. Estos datos muestran que una combinación de ambos, terapia anti-PD1 y vacunación Z13Mad12Anaxa, es más eficaz que la terapia anti-PD1 sola o la vacunación Z13Mad12Anaxa sola.

Como se muestra en la Figura 73, el número de ratones libres de tumores en el grupo "Z13Mad12Anaxa + aPD1" (10 ratones de 13 ratones) es mayor que la suma de los números de ratones libres de tumores en el grupo "aPD1" (6 ratones de 14 ratones) y en el grupo "Z13Mad12Anaxa" (3 ratones de 13 ratones) juntos. Por tanto, estos resultados indican un efecto sinérgico de la terapia anti-PD1 y la vacunación Z13Mad12Anaxa.

Ejemplo 44: Respuesta inmunitaria provocada en ratones después de la vacunación con ATP128

Otra construcción humana, ATP128 (SEQ ID NO: 89), que comprende un péptido de penetración celular, epítomos de tres antígenos (Survivina, CEA y ASCL2) y un péptido agonista de TLR se diseñó. En particular, "ATP128" (SEQ ID NO: 89) es una proteína de fusión que comprende el péptido de penetración celular "Z13" (SEQ ID NO: 6), epítomos de tres antígenos: survivina, CEA y ASCL2, y una variante de secuencia del agonista peptídico de TLR "Anaxa" (es decir, un agonista peptídico de TLR de acuerdo con SEQ ID NO: 71). En lo sucesivo, se muestra la secuencia de aminoácidos de ATP128:

```
KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAANKSSENDRLRLLLKNRTLTLEFNVTRNDARAYVSGIQ
NSVSANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNN
GTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPCLSAAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLGSA
VKKQFEELTLGEFLKLDREAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPFHGGASKKLSKVETLR
SAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGCLRPOAVRPSAPRGPSEGA LSPAERELLDFFSSWLGGYST
VHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGCVKPYTNFDAE
(SEQ ID NO: 89)
```

Los ratones C57BL/6 sin tratamiento previo (5 ratones por grupo, hembra, 7 semanas de edad) se vacunaron mediante inyección subcutánea de 4 nmol de ATP128 (SEQ ID NO: 89). Los ratones control recibieron vehículo (tampón de vacuna). Siete días después del tratamiento los ratones se desangraron y se realizó el ensayo Elispot *ex vivo* en células sanguíneas estimuladas con células dendríticas de ratón cargadas con ATP128 para cuantificar linfocitos T específicos de vacuna productoras de IFN-γ.

Los resultados se muestran en la Figura 74. Los ratones vacunados con ATP128 mostraron una mayor respuesta inmunitaria específica de ATP128 en comparación con los ratones sin tratamiento previo.

Los resultados obtenidos muestran que ATP128 es eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en ratones.

Ejemplo 45: Activación de células dendríticas humanas mediante la construcción ATP128

El objetivo de este estudio fue investigar la capacidad del ATP128 (SEQ ID NO: 89), que comprende una carga antigénica humana, para inducir la maduración de células dendríticas humanas (DC humanas). Para este fin, se probó ATP128 (SEQ ID NO: 89). El indicador biológico usado para la evaluación de la activación de las DC fue el Índice de Activación (Figura 75) que indica el porcentaje de activación en función de la intensidad de expresión de cuatro antígenos de membrana: HLA-DR, CD80, CD83 y CD86.

Después de la incubación durante la noche con 300 nM de ATP128 (SEQ ID NO: 89), la expresión de los marcadores

de activación (CD86, CD80, CD83 y HLA-DR) se evaluaron en células dendríticas humanas mediante FACS (Figura 75). Se usó el mismo volumen de tampón como control negativo mientras que se usó MPLA como control positivo.

Los resultados se muestran en la Figura 75. Los resultados indican que ATP128 puede activar potentemente las DC humanas.

Ejemplo 46: Activación de células dendríticas humanas mediante la construcción ATP128

Para confirmar que las células humanas son capaces de procesar y presentar los péptidos epitópicos incluidos en ATP128 (SEQ ID NO: 89), células dendríticas humanas (DC humanas) de 2 donantes diferentes (denominados donantes "9" y "10") se cargaron durante la noche con ATP128 y se procesaron para HLA Clase I y Clase II/purificación de péptidos presentados, elución de péptidos y caracterización por espectroscopia de masas. Brevemente, los grupos de péptidos de muestras de DC humanas congeladas se obtuvieron mediante inmunoprecipitación usando anticuerpos específicos de HLA, tratamiento ácido y ultrafiltración. Los grupos de péptidos HLA se separaron de acuerdo con su hidrofobicidad mediante cromatografía de fase inversa y los péptidos eluidos se analizaron en un espectrómetro de masas (Thermo Fisher Scientific). Los datos se recopilaron y se procesaron automáticamente analizando las señales de masa de péptidos no fragmentados así como los espectros de fragmentos que contienen información de secuencia de péptidos. Las tasas de falso descubrimiento (FDR) se determinaron mediante el algoritmo Percolator (Käll L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ (2007) Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. Nat Methods 4(11):923-925)) basado en el procesamiento contra una base de datos señuelo que consiste en la base de datos diana barajada. Para HLA de clase I, las longitudes de los péptidos se limitaron a 8-12 aa de longitud. Para HLA de clase II, los péptidos se limitaron a 12-25 aa de longitud. La anotación HLA se realizó usando SYFPEITHI (www.syfpeithi.de).

Los datos han demostrado que las DC humanas cargadas con ATP128 son capaces de procesar y presentar péptidos epitópicos tanto de clase I como de clase II derivados del dominio multiantigénico (Figura 76). Se identificaron péptidos derivados de todos los antígenos en el grupo de clase I. Se identificó un mayor número de péptidos unidos de clase II en todas las porciones de antígeno de la vacuna.

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

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|--------------|---|--|
| SEQ ID NO: 1 | RQIKIYFQNRMMKWK | CPP: Penetratina |
| SEQ ID NO: 2 | YGRKKRRQRR | CPP: TAT mínimo |
| SEQ ID NO: 3 | MMDPNSTSEDKFTDPYQVPFVQAFDQATRV YQDLGGPSQAPLPCVLWPVLPELPQGQLTAY HVSTAPGWSFAPQPAPENAYQAYAAPQLFP VSDITQNNQTNQAGGEAPQPGDNSTVQTAA AVVFACPGANQGQQLADIGVPQPAPVAAPAR RTRKPQQPESLEECDSELEIKRYKNRNASRKCRK FKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLLKQMCPSL DVDSIIPRTPDVLHEDLLNF | Secuencia de aminoácidos ZEBRA (secuencia natural del virus de Epstein - Barr (EBV)) (YP_401673) |
| SEQ ID NO: 4 | KRYKNRNASRKCRKFKQLLQHYREVAAAKSSE NDRLRLLLKQMC | CPP1 (Z11) |
| SEQ ID NO: 5 | KRYKNRNASRKCRKFKQLLQHYREVAAAKSSE NDRLRLLLK | CPP2 (Z12) |
| SEQ ID NO: 6 | KRYKNRNASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSE NDRLRLLLK | CPP3 (Z13) |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|---|-------------------------------------|
| SEQ ID NO: 7 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAK | CPP4 (Z14) |
| SEQ ID NO: 8 | KRYKNRVASRKSRAKFK | CPP5 (Z15) |
| SEQ ID NO: 9 | QHYREVAAAKSSSEND | CPP6 (Z16) |
| SEQ ID NO: 10 | QLLQHYREVAAAK | CPP7 (Z17) |
| SEQ ID NO: 11 | REVAAAKSSSENDRLRLLK | CPP8 (Z18) |
| SEQ ID NO: 12 | KRYKNRVA | CPP9 (Z19) |
| SEQ ID NO: 13 | VASRKSRAKFK | CPP10 (Z20) |
| SEQ ID NO: 14 | ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGVGAL KVPRNQDWLGVPRFAKFAFASFEAQGALA NIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTEWTGS | Carga MAD5 |
| SEQ ID NO: 15 | STVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | Agonista del péptido TLR2 Anaxa |
| SEQ ID NO: 16 | DDDK | sitio diana de la enteroquinasa |
| SEQ ID NO: 17 | IEDGR | sitio diana del factor Xa |
| SEQ ID NO: 18 | LVPRGS | sitio diana de la trombina |
| SEQ ID NO: 19 | ENLYFQG | sitio diana de la proteasa TEV |
| SEQ ID NO: 20 | LEVLFQGP | Diana de la proteasa de preescisión |
| SEQ ID NO: 21 | RX(R/K)R | sitio diana de la furina |
| SEQ ID NO: 22 | GGGGG | enlazador peptídico |
| SEQ ID NO: 23 | GGGG | enlazador peptídico |
| SEQ ID NO: 24 | EQLE | enlazador peptídico |
| SEQ ID NO: 25 | TEWT | enlazador peptídico |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|---|---------------|
| SEQ ID NO: 26 | MHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIA WESPQGQVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAP DGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDD MESQPLIGIQSTKRYKNRVASRKSRAKFKQ LLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKESLKISQ AVHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRN QDWLGVPFRAKFAFASFEAQGALANIAVDK ANLDVEQLESIINFEKLTEWTGS | EDAZ13Mad5 |
| SEQ ID NO: 27 | MHHHHHHHSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSA YGSVKPYTNFDAEKRYKNRVASRKSRAKF KQLLQHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKESLKI SQAVHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPR NQDWLGVPFRAKFAFASFEAQGALANIAVD KANLDVEQLESIINFEKLTEWTGS | AnaxaZ13Mad5 |
| SEQ ID NO: 28 | MHHHHHHHKRYKNRVASRKSRAKFKQLL QHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKESLKISQA VHAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRNQD WLGVPFRAKFAFASFEAQGALANIAVDKANL DVEQLESIINFEKLTEWTGSSTVHEILCKLSL EGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | Z13Mad5Anaxa |
| SEQ ID NO: 29 | MHHHHHHHKRYKNRVASRKSRAKFKQLL QHYREVAAAKSSSENDRLRLLLKESLKISQAV HAAHAEINEAGREVVGVGALKVPRNQD WLGVPFRAKFAFASFEAQGALANIAVDKANL DVEQLESIINFEKLTEWTGS | Z13Mad5 |
| SEQ ID NO: 30 | MHHHHHHHESLKISQAVHAAHAEINEAGREV GVGALKVPRNQDWLGVPFRAKFAFASFEAQ GALANIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTEWTG S | Mad5 |
| SEQ ID NO: 31 | MHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIA WESPQGQVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAP DGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDD MESQPLIGIQSTESLKISQAVHAAHAEINE AGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPFRAK FASFEAQGALANIAVDKANLDVEQLESIIN FEKLTEWTGS | EdaMad5 |
| SEQ ID NO: 32 | MHHHHHHHESLKISQAVHAAHAEINEAG REVVGVGALKVPRNQDWLGVPFRAKFAF FEAQGALANIAVDKANLDVEQLESIINFEK LTEWTGSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAY GSVKPYTNFDAE | Mad5Anaxa |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|---|-----------------|
| SEQ ID NO: 33 | MHHHHHHKRYKNRVASRSRAKFKQLL QHYREVAAAKESLKISQAVHAAHAEINE AGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPFRA KFASFEAQGALANIAVDKANLDVEQLESI INFEKLTWGTGSSTVHEILCKLSLEGDHST PPSAYGSVKPYTNFDAE | Z14 Mad5Anaxa |
| SEQ ID NO: 34 | MHHHHHHHREVAAAKSENDRLRLLLKES LKISQAVHAAHAEINEAGREVVGVGALKV PRNQDWLGVPFRAKFASFEAQGALANIA VDKANLDVEQLESIINFEKLTWGTGSSTVH EILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDA E | Z18 Mad5Anaxa |
| SEQ ID NO: 35 | SIINFEKL | SIINFEKL OVACD8 |
| SEQ ID NO: 36 | ISQAVHAAHAEINEAGR | Péptido OVACD4 |
| SEQ ID NO: 37 | MHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIA WESPQGQVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAP DGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDD MESQPLIGIQSTKRYKNRVASRSRAKFKQ LLQHYREVAAAKESLKISQAVHAAHAEIN EAGREVVGVGALKVPRNQDWLGVPFRA KFASFEAQGALANIAVDKANLDVEQLESII NFEKLTWGTGS | EDAZ14Mad5 |
| SEQ ID NO: 38 | MHHHHHHNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIA WESPQGQVSRVRYTYSSPEDGIRELFPAP DGEDDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDD MESQPLIGIQSTREVAAAKSENDRLRLLL KESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGVGA LKVPRNQDWLGVPFRAKFASFEAQGALA NIAVDKANLDVEQLESIINFEKLTWGTGS | EDAZ18Mad5 |
| SEQ ID NO: 39 | KRYKNRVASRSRAKFKQLLQHYREVAAA KSENDRLRLLLKVYHSPSYAYHQFERRA ILNRLVQFIKDRISVVQALVLTSTVHEILCK LSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTN FDAE | Z13Mad8Anaxa |
| SEQ ID NO: 40 | KRYKNRVASRSRAKFKQLLQHYREVAAA KSENDRLRLLLKNYRIATFKNWPFLDCA MEELTVSEFLKLDQRSTVHEILCKLSLEGD HSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | Z13Mad11Anaxa |
| SEQ ID NO: 41 | KRYKNRVASRSRAKFKQLLQHYREVAAAKSEN DRLRLLKHLELASMTNMELMSSIVSTVHEILCKLS LEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | Z13Mad9Anaxa |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|--|---------------|
| SEQ ID NO: 42 | HLELASMTNMELMSSIV | Mad9 |
| SEQ ID NO: 43 | VTYHSPSYAYHQFERRAILN | Mad8 |
| SEQ ID NO: 44 | NYRIATFKNWPFLDCAMEELTVSEFLKLD | Mad11 |
| SEQ ID NO: 45 | NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQCQVSRYSR VTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELQGLRPGSEY TVSVVALHDDMESQPLIGIQST | EDA |
| SEQ ID NO: 46 | RKKRRQRRRRVKRISQAVHAAHAEINEAGRRVK RKVPRNQDWLRVKRASFEAQGALANIAVDKAR VKRSIINFELRVKRVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSA YGSVKPYTNFDAE | TatFMad5Anaxa |
| SEQ ID NO: 47 | MAPPQVLAFLGLLAAATATFAAAQEECVENYK LAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSCLA CLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNNDGLYD PDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRR DKDTEITCSEVRVWIIELKHKAREKPYDSKSLR TALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDL VQNS SQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFH SKKM DLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPE FSMQGL KAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVISR KKRMAYEK AEIKEMGEMHRELNA | EpCAM |
| SEQ ID NO: 48 | GLKAGVIAV | Epítipo EpCAM |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|---|---------------|
| SEQ ID NO: 49 | MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGE KETSATQRSSVPSSTEKNAVSMTSSVLSSHSPGSG SSTTQGQDVTLPATEPASGSAATWGQDVTSV PVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS PDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDNRPALGSTAPPVHNVTASGSASGS ASTLVHNGTSARATTPASKSTPFSIPSHHSDTPT TLASHSTKTDASSTHHSSVPLTSSNHSTSPQLST GVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPTDYYQELQRDIS EMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFR EGTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVS DVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLLVLCVLVALAIV YLIALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYP TYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLSYT NPAVAATSANL | MUC-1 |
| SEQ ID NO: 50 | GSTAPPVHN | Epítipo MUC-1 |
| SEQ ID NO: 51 | TAPPAHGVTS | Epítipo MUC-1 |
| SEQ ID NO: 52 | MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCAC TPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFCEKELEGW EPDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFL KLDRERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQ LAAMD | survivina |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|--|------------------------|
| SEQ ID NO: 53 | RISTFKNWPF | epítipo de survivina |
| SEQ ID NO: 54 | MESPSAPPHRWCI PWQRLLLTASLLTFWNPPTTA KLTIESTPFNVAEGKEVLLL VHNLPQH LFGYSWY KGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIY PNASLLIQNIIQNDTG FYTLHVIKSDLVNEEATG QFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPET QDATYLWWWNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLF NVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYG PDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYS WVFNQTFQQTQELFIPNITVNNSGSYTCQAH NSDTGLNRRTTITVYAEPKPFITSNNSNPVED EDAVALTCEPEIQNTTYLWWWNNQSLPVSPRLQ LSNDNRRTLTL SVTRNDVGPYECGIQNKLSVDH SDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYRPGVNL SLSCH AASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNS GLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISS NNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWWNG QSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVC GIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPISPPDSSYL SGANLNL SCHSASNPSQYSWRINGIPQQHTQ VLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSIT VSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVAL | CEA |
| SEQ ID NO: 55 | YLSGANLNL | Epítipo CEA |
| SEQ ID NO: 56 | SWRINGIPQQ | Epítipo CEA |
| SEQ ID NO: 57 | MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYD PTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAM RDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIK RVKDESDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDL ARSYGIPFIETSAKTRQVEDAFYTLVREIRQYRLK KISKEETPGCVKIKKCIIM | Kirsten Ras |
| SEQ ID NO: 58 | VVGAGGVG | Epítipo de Kirsten Ras |
| SEQ ID NO: 59 | MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPAT EEQEAASSSTLVEVTLGEVPAESPDPQSPQGA SSLPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLES EFQAALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGS VVGNWQYFFPVIFSKAFSSLQLVFGIELMEVDPIG HLYIFATCLGLSYDGLLDGNQIMPAGLLIIVLAI AREGDCAPEEKIWEELSVLEVFEGREDSILGDPKK LLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPRA LVETSYVKVLHMHMVKISGGPHIS YPPLHEWVLREGEE | MAGE-A3 |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|--|---------------------|
| SEQ ID NO: 60 | KVAELVHFL | Epítipo MAGE-A3 |
| SEQ ID NO: 61 | MAFVCLAIGCLYTFLLSTTFGCTSSSDTEIKVNPPQ DFEIVDPGYLGYYLQWQPPLSLDHFKECTVEYE LKYNIGSETWKTITKLNHYKDGFDLNKGIEAKI HTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWISPQGIPET KVQDMDCVYYNWQYLLCSWKPGIGVLLDTNY NLFYWYEGLDHALQCVDIKADGQNIGCRFPY LEASDYKDFYICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIV KPLPPVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCFDYEI EIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNETRQLCFVVR SKVNIYCSDDGIWSEWSDKQCWEGEDLSKKTLL RFWLPFGFILLVIFVTGLLLRKPNTYPKMIEFFCD T | IL13Ralpha2 |
| SEQ ID NO: 62 | LPFGFIL | Epítipo IL13Ralpha2 |
| SEQ ID NO: 63 | LFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTNMELMSSI VVISASIIVFNLLELEG | <u>Mad12</u> |
| SEQ ID NO: 64 | LVQFIKDRISVVQA | péptido gp70CD4 |
| SEQ ID NO: 65 | SPSYVYHQF | péptido gp70CD8 |
| SEQ ID NO: 66 | ASMTNMELM | péptido adpgk |
| SEQ ID NO: 67 | ATKNWPFL | survivina20-28 |
| SEQ ID NO: 68 | TVSEFLKL | survivina97-104 |
| SEQ ID NO: 69 | KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAKSSN DRLRLLKLFRAAQLANDVVLQIMEHLELASMTN MELMSSIVVISASIIVFNLLELEGSTVHEILCKLSLEG DHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | Z13Mad12Anaxa |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|---|---|
| SEQ ID NO: 70 | MELAALCRWGLLALLPPGAASTQVCTGTDMKL RLPASPETHLDMRLHLYQGCQVVQGNLELTYLP TNASLSFLQDIQEVQGYVLIHQNVRQVPLQRL RIVRGTLQFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGA SPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTI LWKDIFHKNNQLALTIDTNRSRACHPCSPMCK GSRCWGESSEDCQSLTRTVCAAGCARCKGPLPT DCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICE LHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTFGASCVTA CPYNYLSTDVGSTLVCPLHNQEVTAEEDGTQRC EKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFA GCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQV FETLEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRI LHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIH HNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPE DECVGEGGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCS QFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHP ECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCV ARCPGKVPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINC THSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVV VLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPL TPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGT VYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEIL DEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLM PYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCMIQAKG MSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFG LARLLDIDETEHADGGKVPIKWMALLESILRRRFT HQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIP DLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECR PRFRELVSFESRMARDPQRFVVIQNEIDLGPASPL DSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCP DPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEP SEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGL QSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLT CSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGA TLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLT QGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPER GAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV | Her2/neu |
| SEQ ID NO: 71 | STVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | Variante de secuencia del agonista peptídico "Anaxa" de TLR |
| SEQ ID NO: 72 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLKAPPQVLAFLGLLAAATAYVDEKAPEFS MQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPS AYGSVKPYTNFDAE | ATP110 |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|--|---------------|
| SEQ ID NO: 73 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSA NRSDPVTDPSSYLSGANLNLSSHSASPQYSWRIN GIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLATG RNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVG VALILGDPKKLLTQHVFQENYLEYRQVPGSDPAS YEFLWGPRLVETS YVKVALSRKVAELVHFLLLKY RAREPVTKAEMLGSVVAPPQVLAFGLLAAATAY VDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSL EGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP111 |
| SEQ ID NO: 74 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSA NRSDPVTDPSSYLSGANLNLSSHSASPQYSWRIN GIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLATG RNNSIVKSITVSASGTSPGLSLGDPKKLLTQHVFQ ENYLEYRQVPGSDPAS YEFLWGPRLVETS YVKV ALS R KVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVAP PQVLAFGLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVI AVIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYT NFDAE | ATP112 |
| SEQ ID NO: 75 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSA NRSDPVTDPSSYLSGANLNLSSHSASPQYSWRIN GIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLATG RNNSIVKSITVSASGTSPGLSLGDPKKLLTQHVFQ ENYLEYRQVPGSDPAS YEFLWGPRLVETS YVKV ALS R KVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVAP PQVLAFGLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVI AVIVVAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA HGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSSSTVHEILCKL SLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP113 |
| SEQ ID NO: 76 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSA NRSDPVTDPSSYLSGANLNLSSHSASPQYSWRIN GIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLATG RNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPTLPAPWQPFLKD HRISTFKNWPFLEGS AVKKQFEELTLGEFLKLDRE RAPPQVLAFGLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLK AGVIAVIVVAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST APPAHGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSSSTVHEI LCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP114 |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|--|---------------|
| SEQ ID NO: 77 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSA NRSDPVTPDSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRIN GIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLATG RNNSIVKSITVSASGTSPGLSEYKLVVVGAVGVG KSALTAPPQVLAFLGLLAAATAYVDEKAPEFSMQ GLKAGVIAVIVVAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAP GSTAPPAHGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSSST VHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP115 |
| SEQ ID NO: 78 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSA NRSDPVTPDSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRIN GIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLATG RNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPTLPPAWQPFLKD HRISTFKNWPFLEGS AVKKQFEELTLGEFLKLDRE RAPPQVLAFLGLLAAATAYVDEKAPEFSMQGLK AGVIAVIVVLGDPKLLTQH FVQENYLEYRQVP GSDPASYEFLWGPRALVETSYVKVALSRKVAELV HFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVSTVHEILCKLSLE GDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP116 |
| SEQ ID NO: 79 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSA NRSDPVTPDSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRIN GIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLATG RNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPPQVLAFLGLLAA ATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVAPGSTAP PAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPA LGSTAPPVHNVTSSSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSA YGSVKPYTNFDAE | ATP117 |
| SEQ ID NO: 80 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLKRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSA NRSDPVTPDSSYLSGANLNLSSHASAPQYSWRIN GIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLATG RNNSIVKSITVSASGTSPGLSAPPQVLAFLGLLAA ATAYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEIL CKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP118 |
| SEQ ID NO: 81 | KRYKNRVASRKSRAKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLKLGD PKLLTQH FVQENYLEYRQVPGS DPASYEFLWGPRALVETSYVKVALSRKVAELVHF LLLKYRAREPVTKAEMLGSVVAPTLP PAWQPFLK DHRISTFKNWPFLEGS AVKKQFEELTLGEFLKLDRE ERAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHG VTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSSSTVHEILCKLSLE GDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP119 |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|---|---------------|
| SEQ ID NO: 82 | KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSA NRSDPVTLPDSSYLSGANLNLSSHSASPQYSWRIN GIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLATG RNNSIVKSITVSASGTSPGLSSTVHEILCKLSLEGD HSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP120 |
| SEQ ID NO: 83 | KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVS ANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSSHSASPQY SWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVS NLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMI GVLVGVALIAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGST APPAHGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSAAPPQV LAFGLLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIA VIVVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTN FDAE | ATP121 |
| SEQ ID NO: 84 | KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVS ANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSSHSASPQY SWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVS NLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPAL GSTAPPVHNVTSAAPPQVLAFGLLLAAATALIYYV DEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLE GDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP122 |
| SEQ ID NO: 85 | KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVS ANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSSHSASPQY SWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVS NLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPGSTAPP AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDRPAL GSTAPPVHNVTSAAPPQVLAFGLLLAAATALIYYV DEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVSTVHEILCKLSLE GDHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP123 |
| SEQ ID NO: 86 | KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVS ANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSSHSASPQY SWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVS NLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLPAPW QPFLKDHRISTFKNWPFLGSAVKKQFEELTLGEF LKLDREAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAP PAHGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSAAPPQVLA FGLLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVI VVSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFD AE | ATP124 |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|--|---------------|
| SEQ ID NO: 87 | KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVS ANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQY SWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVS NLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLP PAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSVKKQFEELTLGEF LKLDREAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAP PAHGVTSAPDRPALGSTAPPVHNVTSAAPPQVLA FGLLLAAATALIYYVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVI VVSTVHEILSKLSLEGDHSTPPSAYGSVKPYTNFD AE | ATP125 |
| SEQ ID NO: 88 | KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVS ANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQY SWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVS NLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLP PAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSVKKQFEELTLGEF LKLDREAPQVLAFLGLLLAAATALIYYVDEKAPE FSMQGLKAGVIAVIVVAAVARRNERERNRVKLV NLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIR ALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGP SEGALSPAERELDFSSWLGGYSTVHEILSKLSLEG DHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP127 |
| SEQ ID NO: 89 | KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVS ANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQY SWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVS NLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLP PAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSVKKQFEELTLGEF LKLDREAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQ HVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEH DAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGALSPA ERELDFSSWLGGYSTVHEILSKLSLEGDHSTPPSA YGSVKPYTNFDAE | ATP128 |
| SEQ ID NO: 90 | KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVS ANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQY SWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVS NLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLP PAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGSVKKQFEELTLGEF LKLDREAKNKIAAVARRNERERNRVKLVNLGF QALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIRALQ RLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPSEGA LSPAERELDFSSWLGGYSTVHEILSKLSLEGDHST PPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP129 |

(continuación)

| SEQ ID NO | Secuencia | Observaciones |
|---------------|---|----------------------------|
| SEQ ID NO: 91 | KRYKNRVASRKSRKFKQLLQHYREVAAAKSSEN DRLRLLLKNRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVS ANRSDPVTLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQY SWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVS NLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLP PAWQPFLKDHRISTFKNWPFLGSAVKKQFEELTLGEF LKLDREKAKNKIAAVARRNERERNRVKLVNLGF QALRQHVPFHGGASKKLSKVETLRSAYEYIRALQR LLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTT PVAASPSRASSSPGRGGSSEPGSPRSAYSSDDSGS EGALSPAERELDFSSWLGGYSTVHEILSKLSLEG DHSTPPSAYGSVKPYTNFDAE | ATP130 |
| SEQ ID NO: 92 | MDGGTLPRSAPPAPPVPVGCARRRPAPELLRC SRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVN LGFQALRQHVPFHGGASKKLSKVETLRSAYEYIRA LQRLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPP GTTTPVAASPSRASSSPGRGGSSEPGSPRSAYSSDD SGCEGALSPAERELDFSSWLGGY | ASCL2 |
| SEQ ID NO: 93 | SAVEYIRALQ | Epítipo ASCL2 |
| SEQ ID NO: 94 | ERELDFSSW | Epítipo ASCL2 |
| SEQ ID NO: 95 | APTLPAPWQPFLKDHRISTFKNWPFLGSAVKK QFEELTLGEFLKLDREK | Fragmento de survivina |
| SEQ ID NO: 96 | NRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSANRSDPV TLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQYSWRINGI PQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLATGRN NSIVKSITVSASGTSPGLSA | Fragmento de CEA |
| SEQ ID NO: 97 | AAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPFHGG ASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLAEHDAVRNAL AGGLRPQAVRPSAPRGPSSEGALSPAERELDFSS WLGGY | Fragmento de ASCL2 |
| SEQ ID NO: 98 | NRTLTLFNVTRNDARAYVSGIQNSVSANRSDPV TLDVLPDSSYLSGANLNLSCHSASPQYSWRINGI PQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLATGRN NSIVKSITVSASGTSPGLSAAPTLPAPWQPFLKDH RISTFKNWPFLGSAVKKQFEELTLGEFLKLDREK AAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPFHGG ASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLAEHDAVRNAL AGGLRPQAVRPSAPRGPSSEGALSPAERELDFSS WLGGY | carga antigénica de ATP128 |

REIVINDICACIONES

1. Un complejo que comprende:

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

en donde los componentes a) - c) están unidos covalentemente, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal, en donde el complejo comprende un epítipo de ASCL2, en donde el agonista del péptido TLR es un agonista del péptido TLR2 y/o un agonista del péptido TLR4, y el complejo es un polipéptido o una proteína, en particular un polipéptido recombinante o una proteína recombinante.

2. El complejo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido de penetración celular

- (i) tiene una longitud de la secuencia de aminoácidos de dicho péptido de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente de 15 a 45 aminoácidos en total; y/o
- (ii) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento del dominio mínimo de ZEBRA, extendiéndose dicho dominio mínimo desde el resto 170 al resto 220 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con SEQ ID NO: 3, en donde, opcionalmente, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han sustituido, se han eliminado y/o se han añadido sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido, teniendo el fragmento del dominio mínimo de ZEBRA una longitud de 5 a 50 aminoácidos en total, preferentemente de 10 a 45 aminoácidos en total, más preferentemente de 15 a 45 aminoácidos en total.

3. El complejo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una Ser (S) en el equivalente de la posición 189 de la secuencia de aminoácidos de ZEBRA de acuerdo con SEQ ID NO: 3.

4. El complejo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde el péptido de penetración celular tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 4 - 13 o variantes de secuencia de los mismos sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido que comparte al menos un 90 % de identidad de secuencia sin anular la capacidad de penetración celular de dicho péptido.

5. El complejo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el antígeno o el epítipo antigénico comprende o consiste en un epítipo tumoral, preferentemente en un epítipo de cáncer colorrectal.

6. El complejo para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el epítipo tumoral es un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en EpCAM, HER-2, MUC-1, TOMM34, RNF 43, KOC1, VEGFR, PHCG, survivina, CEA, TGFpR2, p53, KRas, OGT, CASP5, COA-1, MAGE, SART e IL13Ralfa2.

7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones reivindicación 1 - 6, en donde el complejo comprende

- (i) un epítipo de survivina;
- (ii) un epítipo de CEA; y
- (iii) un epítipo de ASCL2.

8. El complejo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el complejo comprende en dirección N- a C-terminal:

- (ii) un epítipo de CEA;
- (i) un epítipo de survivina; y
- (iii) un epítipo de ASCL2.

9. El complejo para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el complejo comprende en dirección N- a C-terminal:

- (i) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 54, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia;
- (ii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia; y

(iii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 92, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia.

10. El complejo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 9, en donde el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 96 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia; un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia; y un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 97 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia.

11. El complejo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 - 10, en donde el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 98 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia.

12. El complejo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el epítipo tumoral es un epítipo de un neoantígeno, preferentemente un epítipo de un neoantígeno específico del cáncer colorrectal.

13. El complejo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que comprende, preferentemente en dirección N- a C-terminal, los siguientes componentes:

(i) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia;

(ii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 96 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia;

(iii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia;

(iv) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 97 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia; y

(v) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 71; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia.

14. El complejo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicho complejo comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO: 88 - 91; o dicho complejo comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 88 - 91.

15. El complejo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicho complejo comprende o consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 89 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia.

16. Un complejo que comprende:

- a) un péptido de penetración celular;
- b) al menos tres epítopos antigénicos; y
- c) un agonista peptídico de TLR,

en donde los componentes a) - c) están unidos covalentemente, en donde el agonista del péptido TLR es un agonista del péptido TLR2 y/o un agonista del péptido TLR4, y en donde los al menos tres epítopos antigénicos comprenden (i) un epítipo de survivina, (ii) un epítipo de CEA y (iii) un epítipo de ASCL2.

17. El complejo de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el complejo comprende en dirección N- a C-terminal:

(i) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 54, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia;

(ii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia; y

(iii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 92, o un fragmento del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos, o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia.

18. El complejo de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en donde el complejo comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 98 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene

al menos el 90 % de identidad de secuencia.

19. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 - 18, en donde el complejo es un polipéptido recombinante o una proteína recombinante.

20. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 - 19, en donde el péptido de penetración celular es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2-4.

21. El complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 - 20 que comprende, preferentemente en dirección N- a C-terminal, los siguientes componentes:

- (i) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia;
- (ii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 96 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia;
- (iii) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 95 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia;
- (iv) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 97 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia; y
- (v) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 71; o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia,

en donde los componentes (i) - (v) están opcionalmente enlazados mediante un enlazador o espaciador.

22. El complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 - 21, en donde dicho complejo comprende o consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 89 o una variante de secuencia funcional del mismo que tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia.

23. Un ácido nucleico que codifica el complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en donde el complejo es un polipéptido o una proteína.

24. Un vector que comprende el ácido nucleico como se define en la reivindicación 23.

25. Una célula hospedadora que comprende el vector como se define en la reivindicación 24.

26. Una célula cargada con un complejo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, preferentemente en donde dicha célula es una célula presentadora de antígenos, más preferentemente una célula dendrítica.

27. Una composición que comprende:

- (i) un complejo como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22;
- (ii) un ácido nucleico como se define en la reivindicación 23;
- (iii) un vector como se define en la reivindicación 24;
- (iv) una célula hospedadora como se define en la reivindicación 25; y/o
- (v) una célula cargada con un complejo como se define en la reivindicación 26.

28. Una vacuna que comprende:

- (i) un complejo como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22;
- (ii) un ácido nucleico como se define en la reivindicación 23;
- (iii) un vector como se define en la reivindicación 24;
- (iv) una célula hospedadora como se define en la reivindicación 25; y/o
- (v) una célula cargada con un complejo como se define en la reivindicación 26.

29. Una composición farmacéutica que comprende el complejo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 o la célula como se define en la reivindicación 26 y un portador farmacéuticamente aceptable.

30. Una combinación de

- (i) un complejo como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22; y
- (ii) un agente quimioterapéutico, un fármaco dirigido y/o un agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario.

31. (i) El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 23;

(ii) el vector de acuerdo con la reivindicación 24;

- (iii) la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 25;
- (iv) la célula cargada de acuerdo con la reivindicación 26;
- (v) la composición de acuerdo con la reivindicación 27;
- (vi) la vacuna de acuerdo con la reivindicación 28;
- o
- (vii) la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 29

para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal.

32. Una combinación de

- (i) un complejo como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22; y
 - (ii) un agente quimioterapéutico, un fármaco dirigido y/o un agente inmunoterapéutico, tal como un modulador de puntos de control inmunitario,
- para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cáncer colorrectal.

33. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el modulador de puntos de control inmunitario es un inhibidor de PD-1.

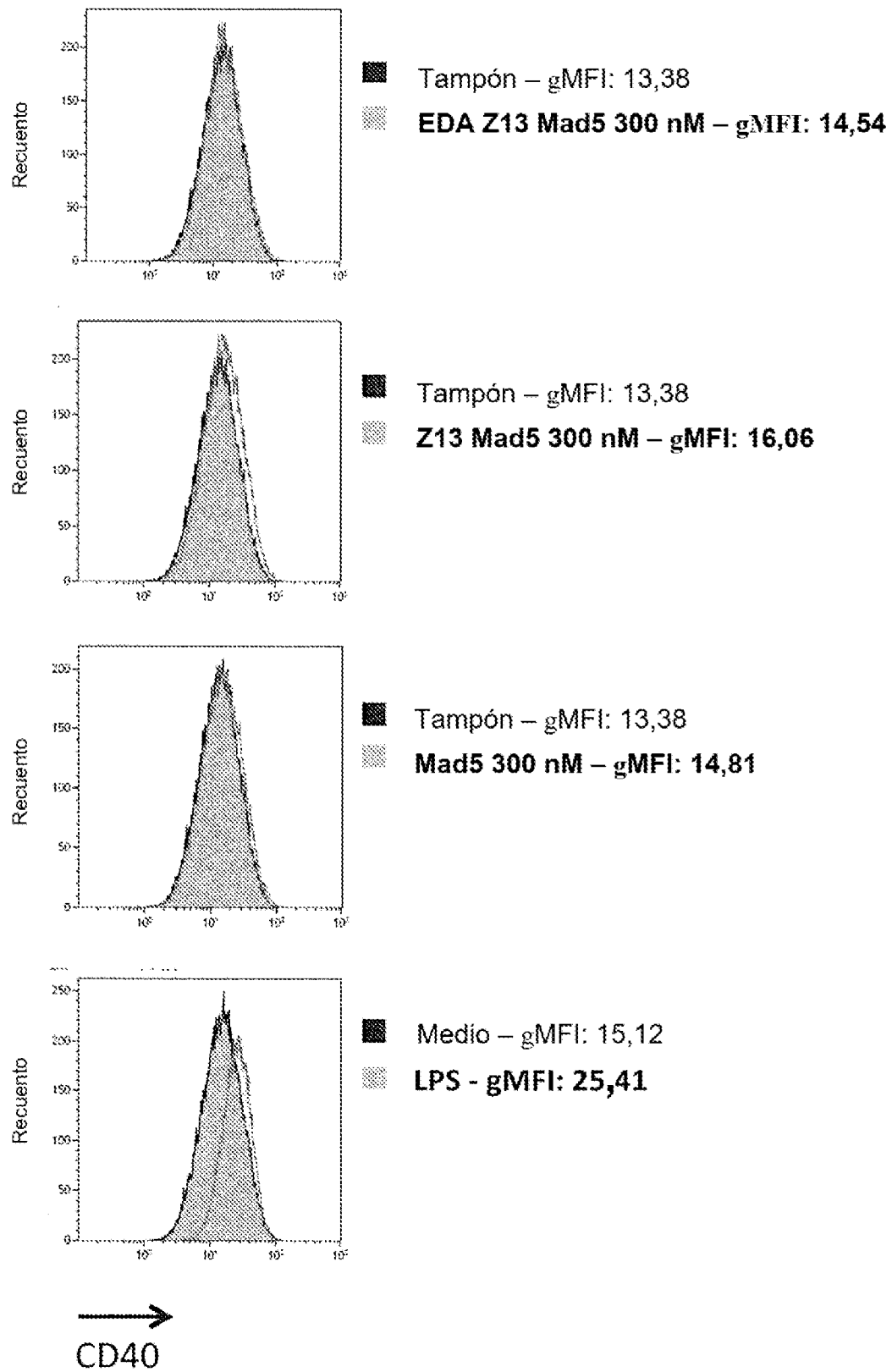


Fig. 1

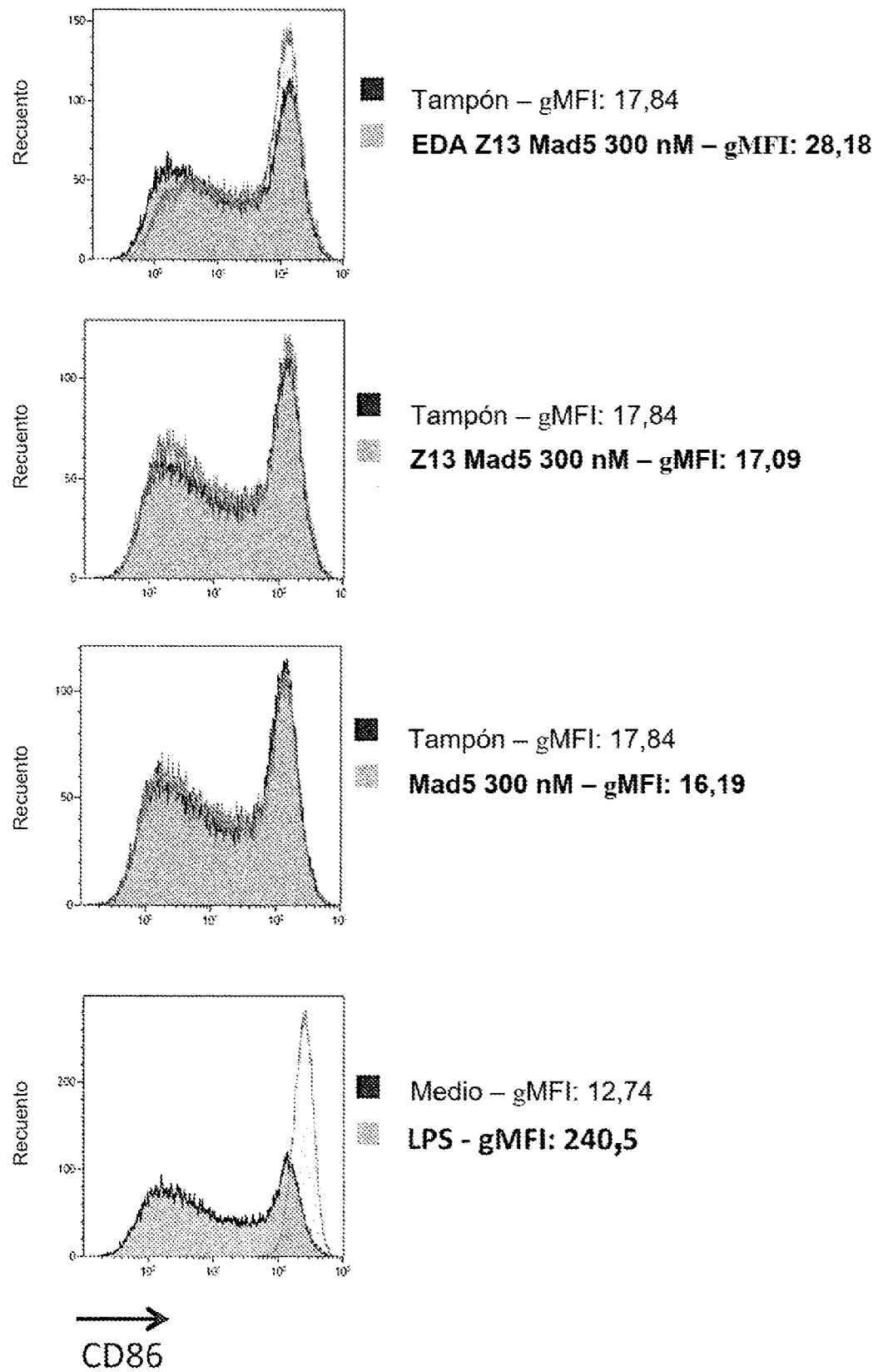


Fig. 2

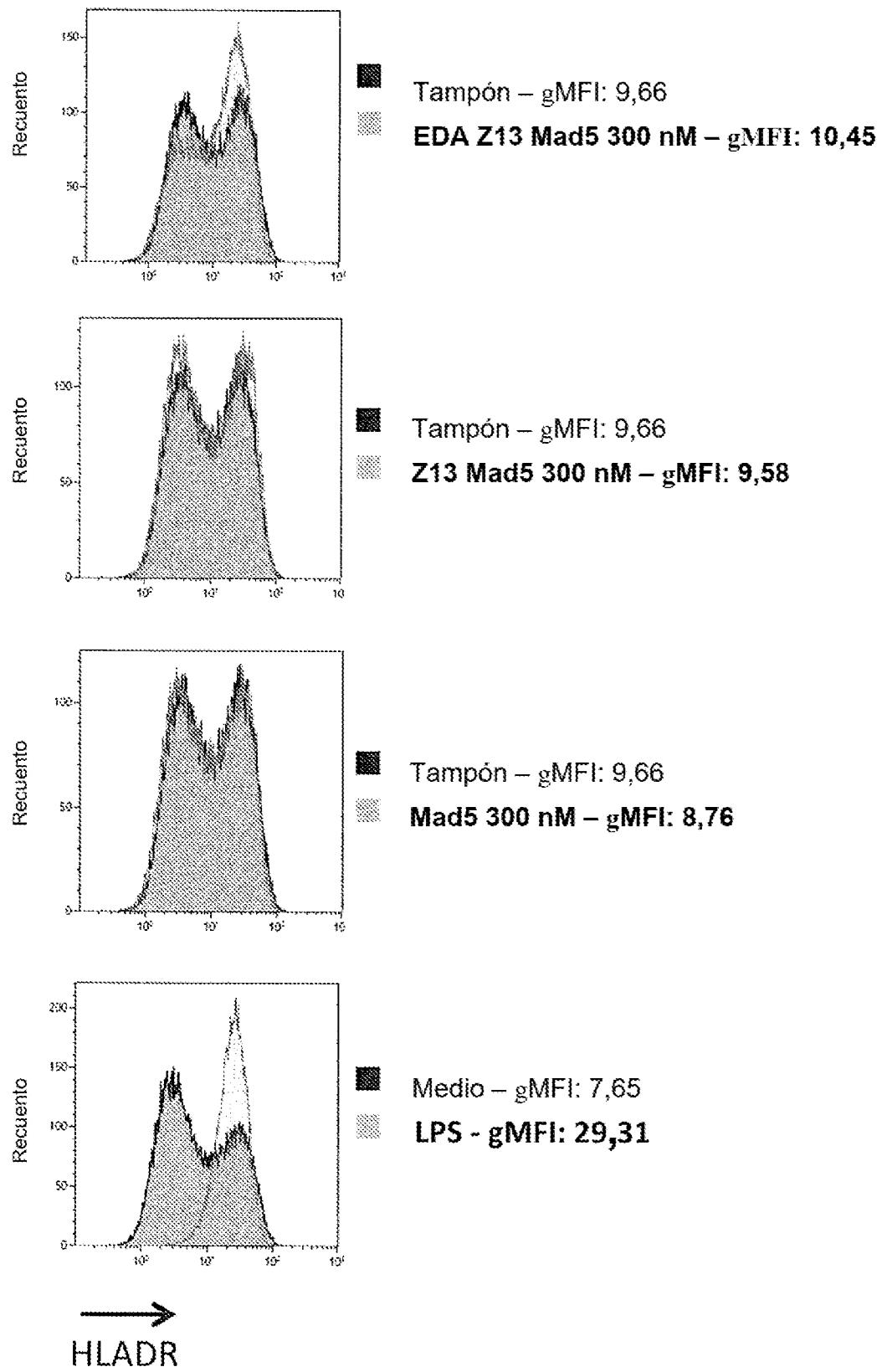


Fig. 3

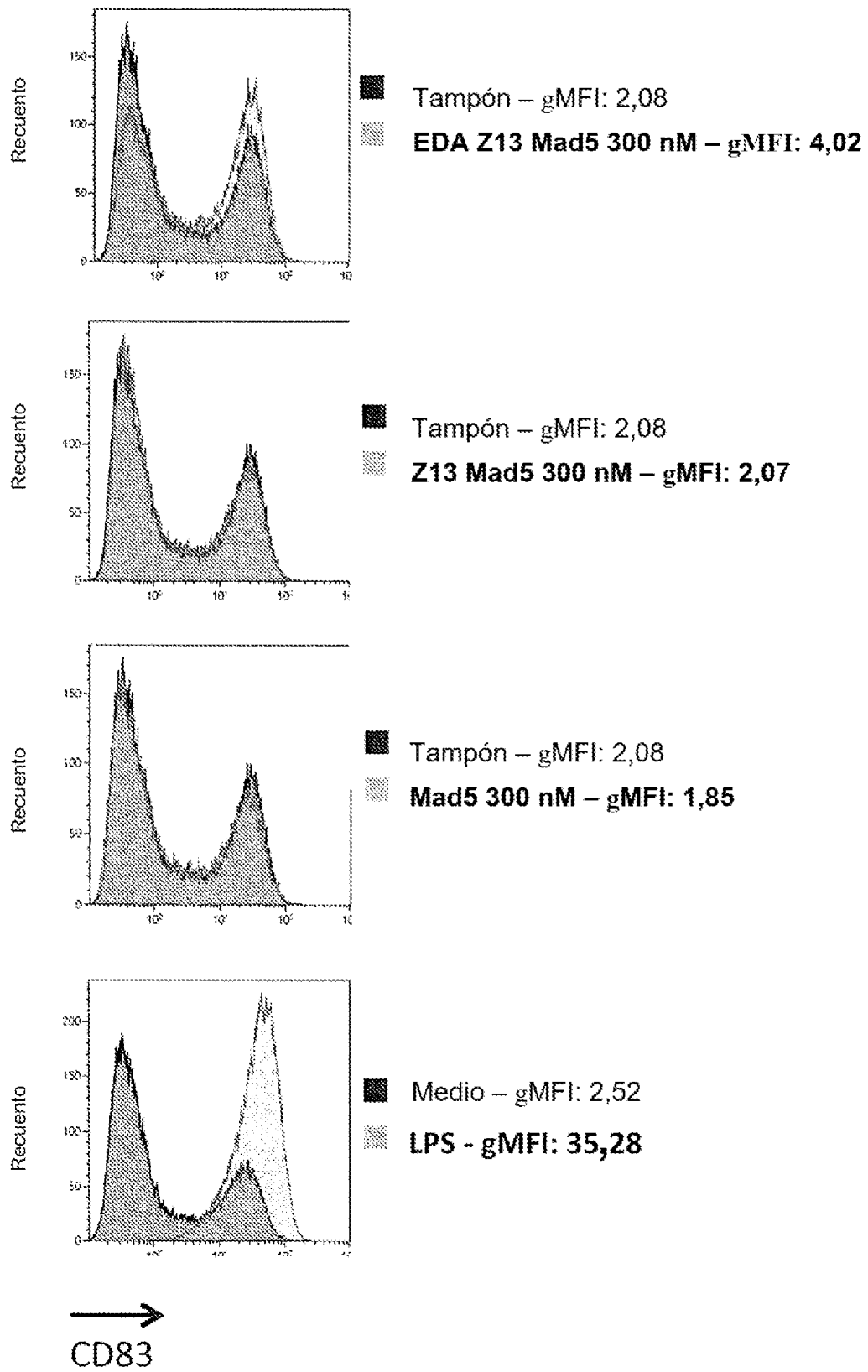


Fig. 4

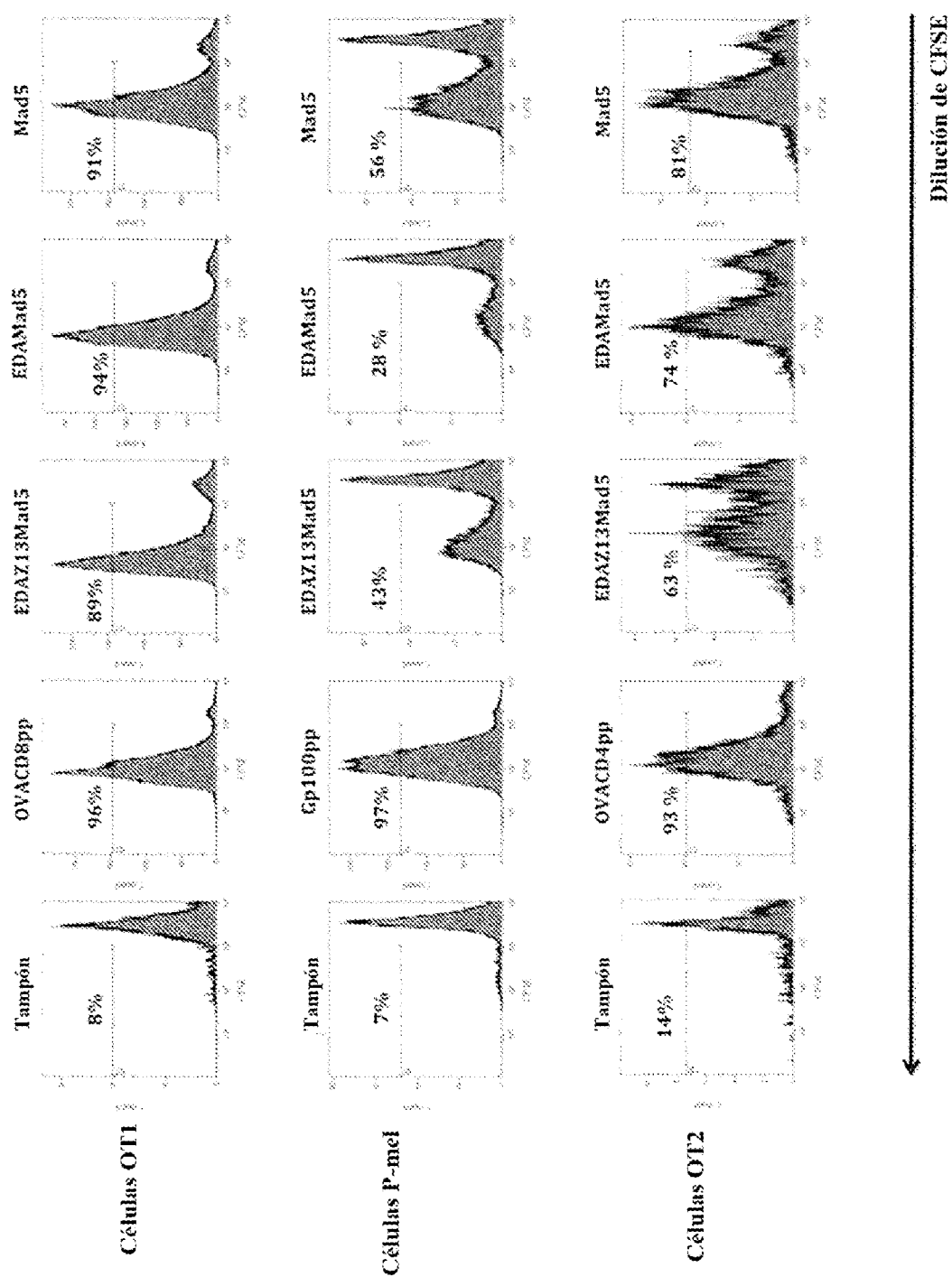
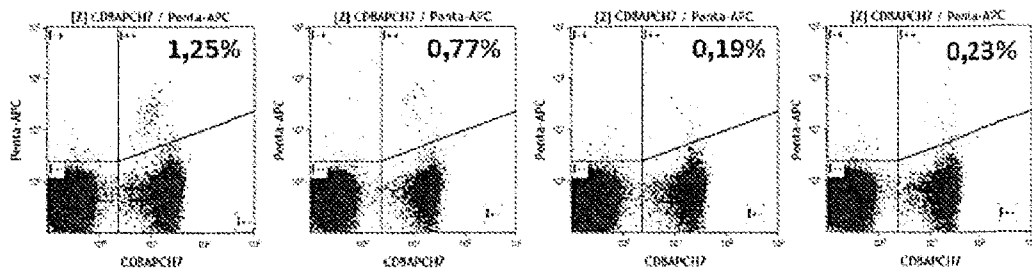
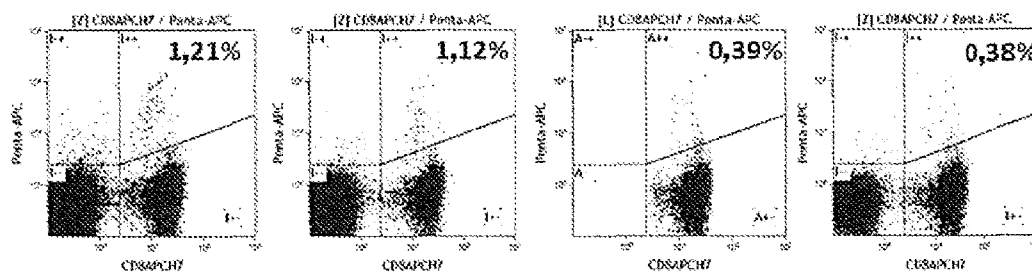


Fig. 5

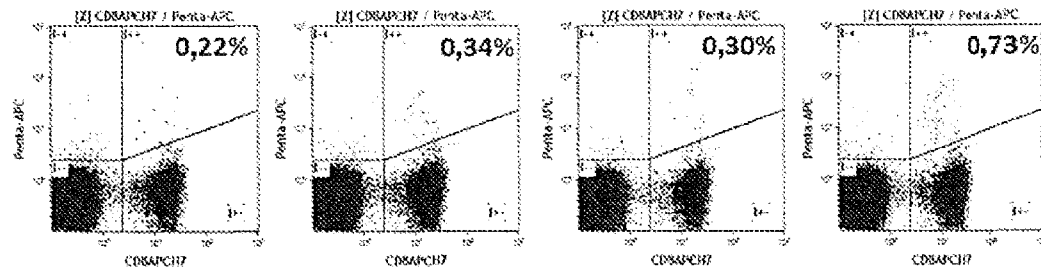
2 nmol de proteína inyectada
EDA-MAD5



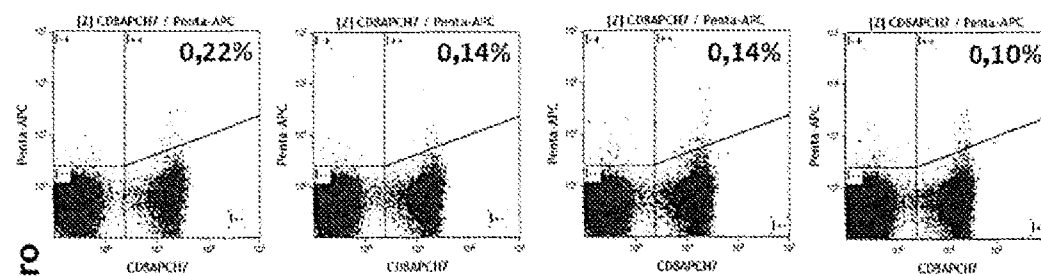
EDA-Z13-MAD5



MAD5+MPLA



Sin tratamiento previo

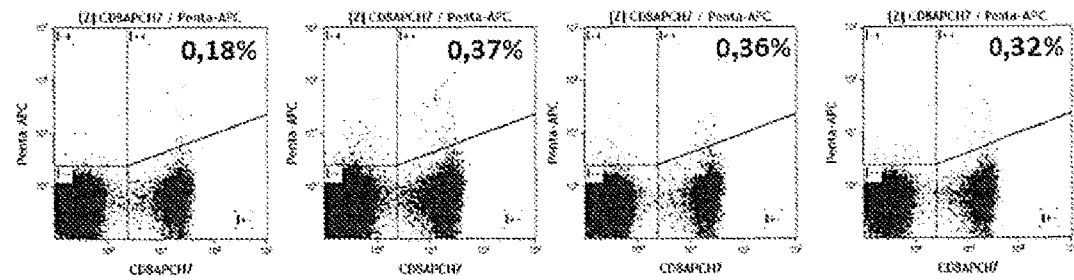


Pentámero
CD8

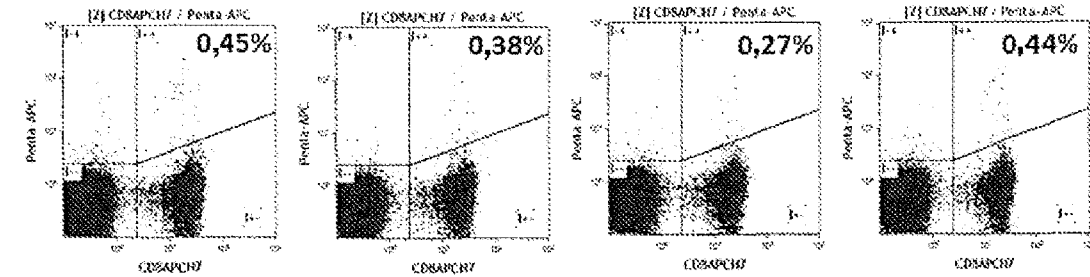
Fig. 6

10 nmol de proteína inyectada

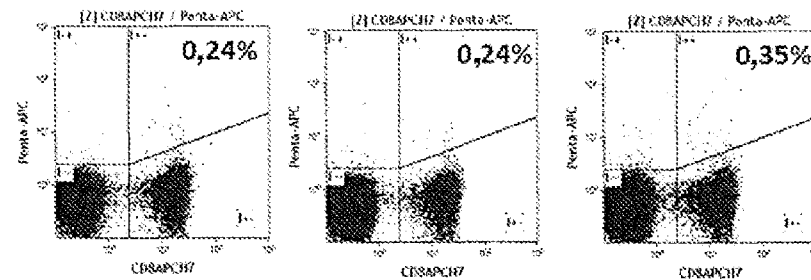
EDA-MAD5



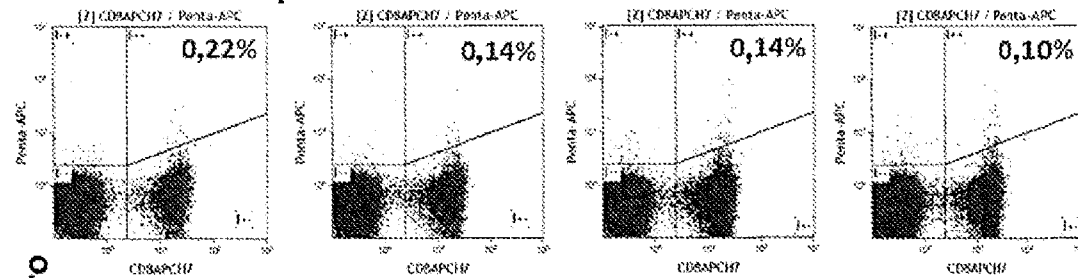
EDA-Z13-MAD5



MAD5+MPLA



Sin tratamiento previo



Pentámero
CD8

Fig. 7

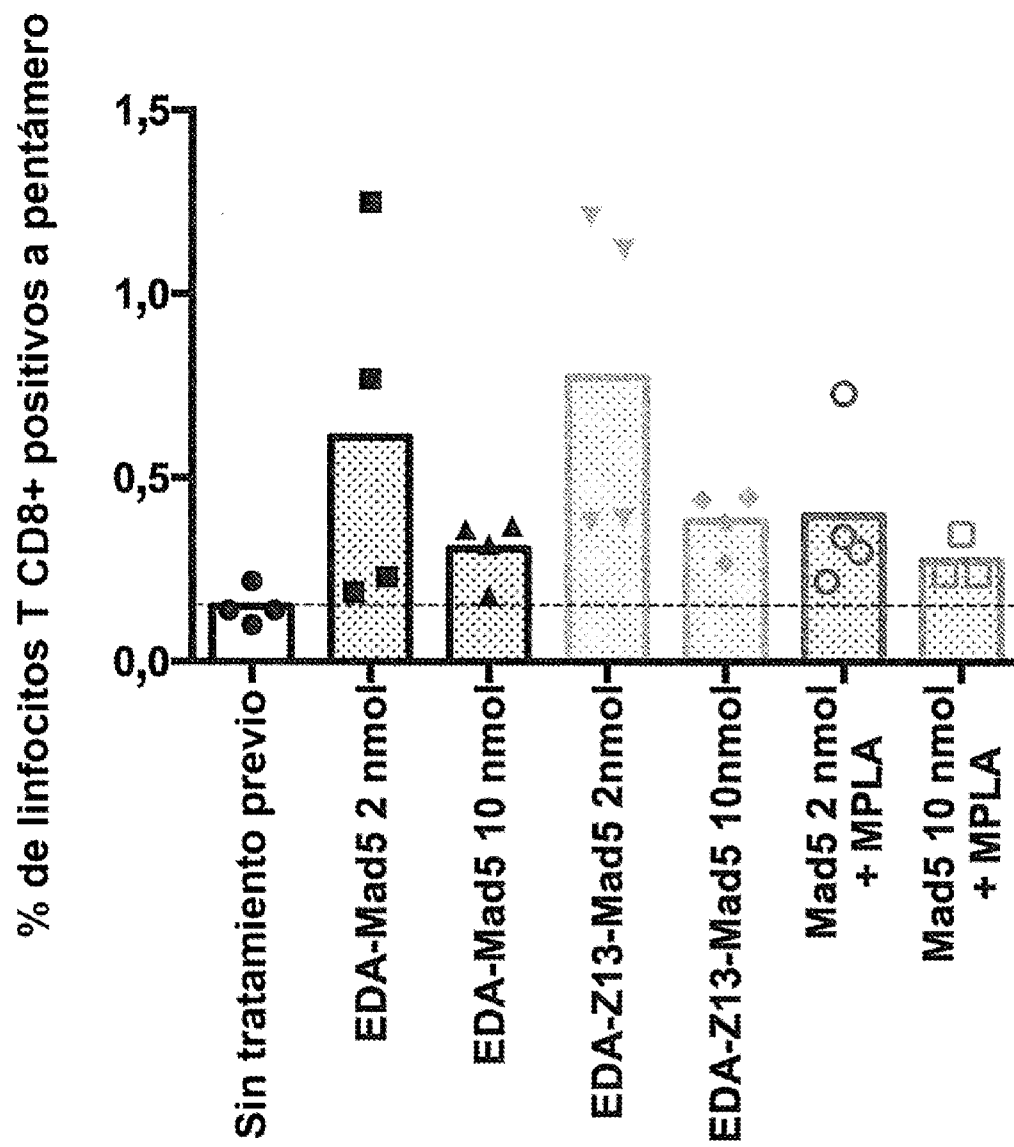


Fig. 8

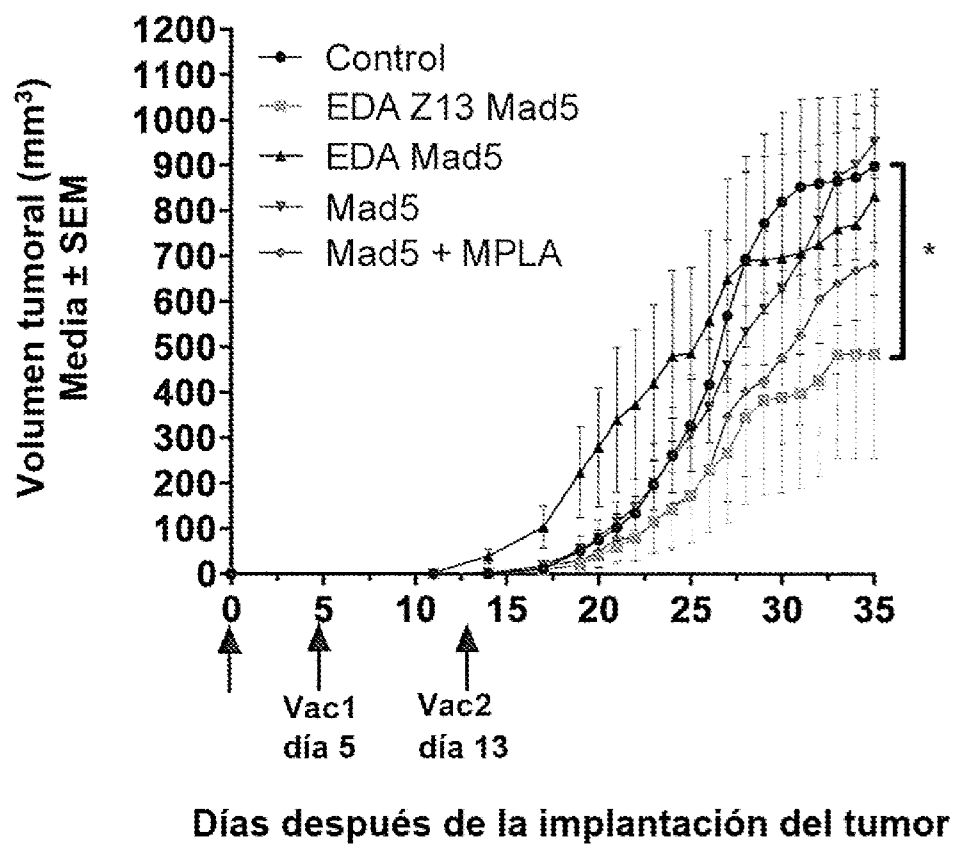


Fig. 9

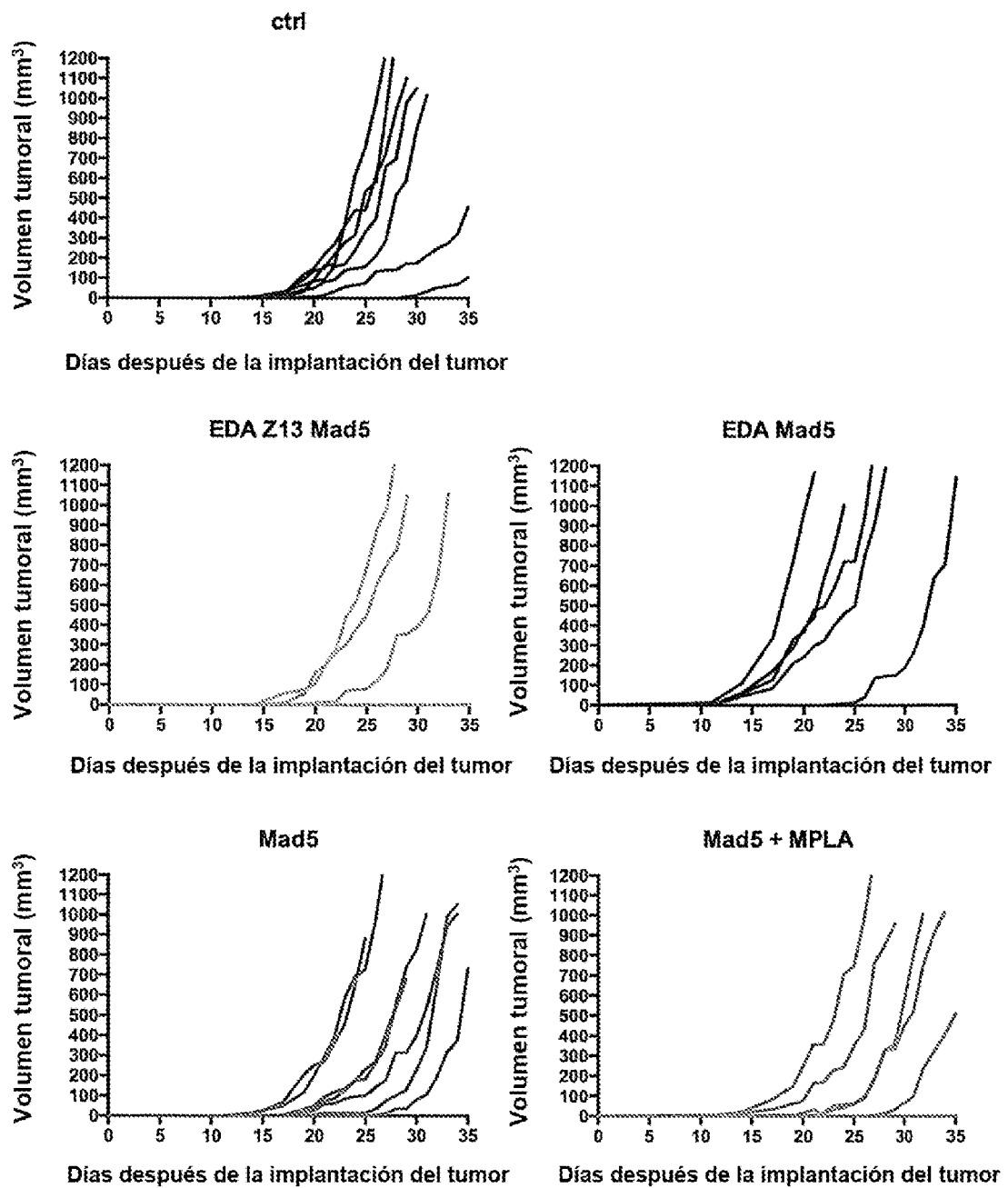
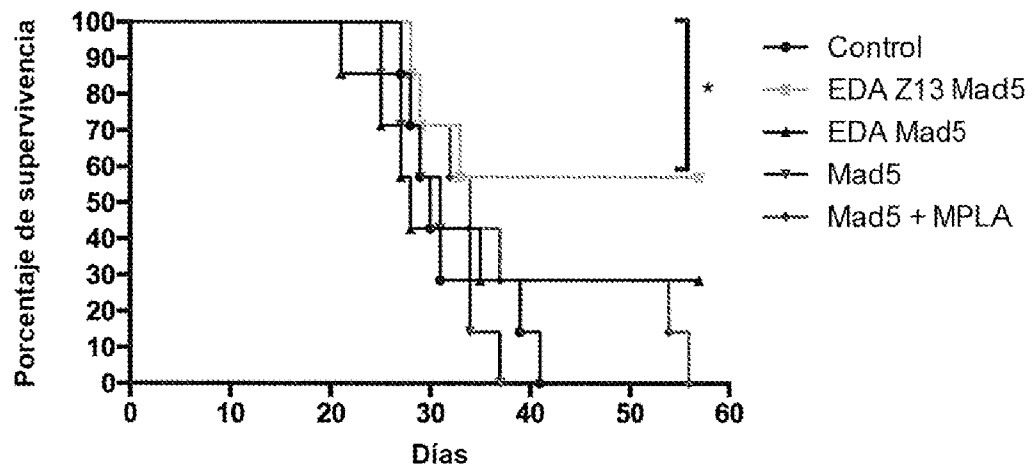


Fig. 10

A



B

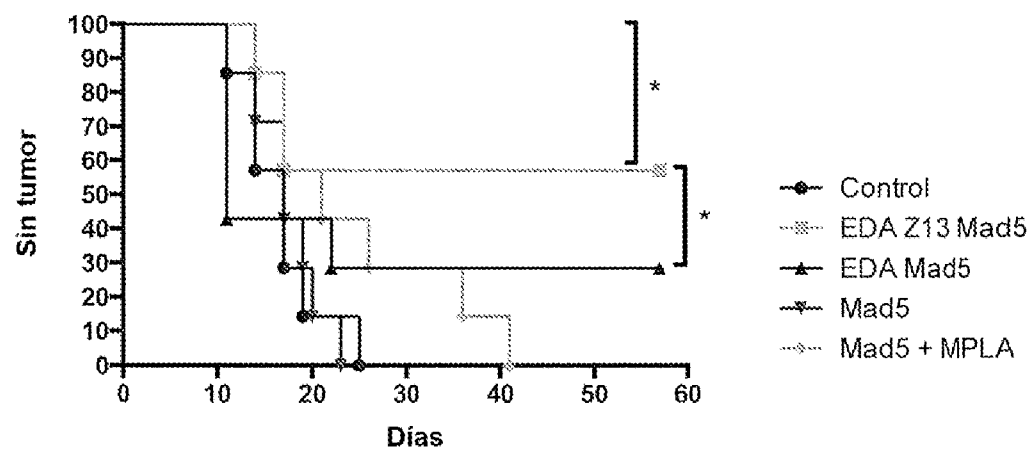


Fig. 11

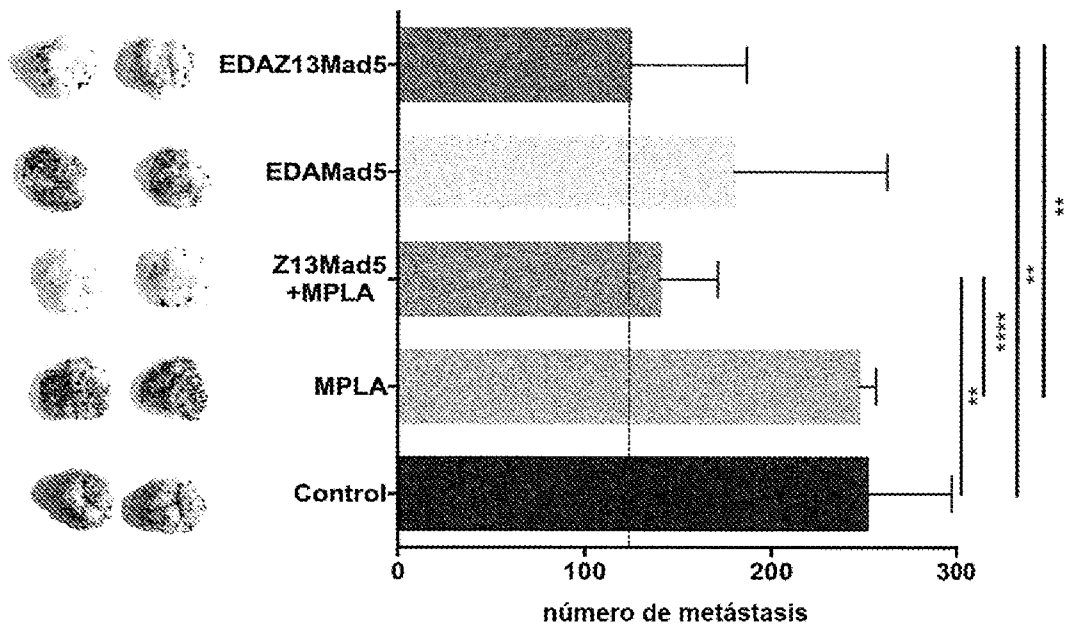


Fig. 12

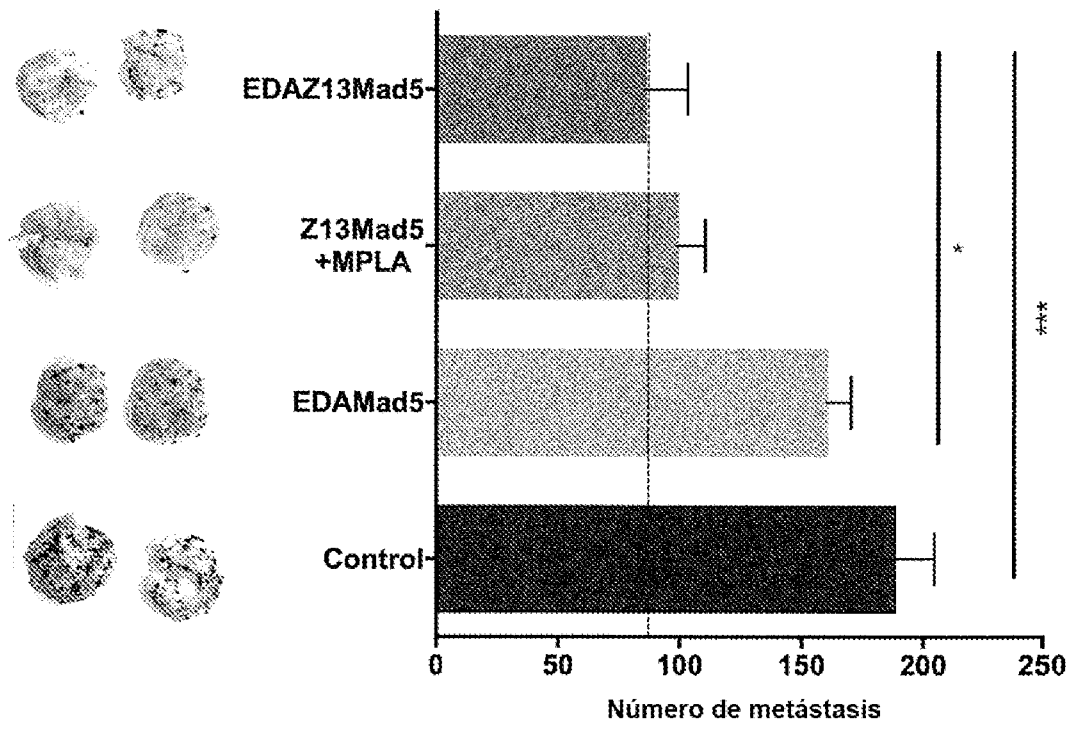


Fig. 13

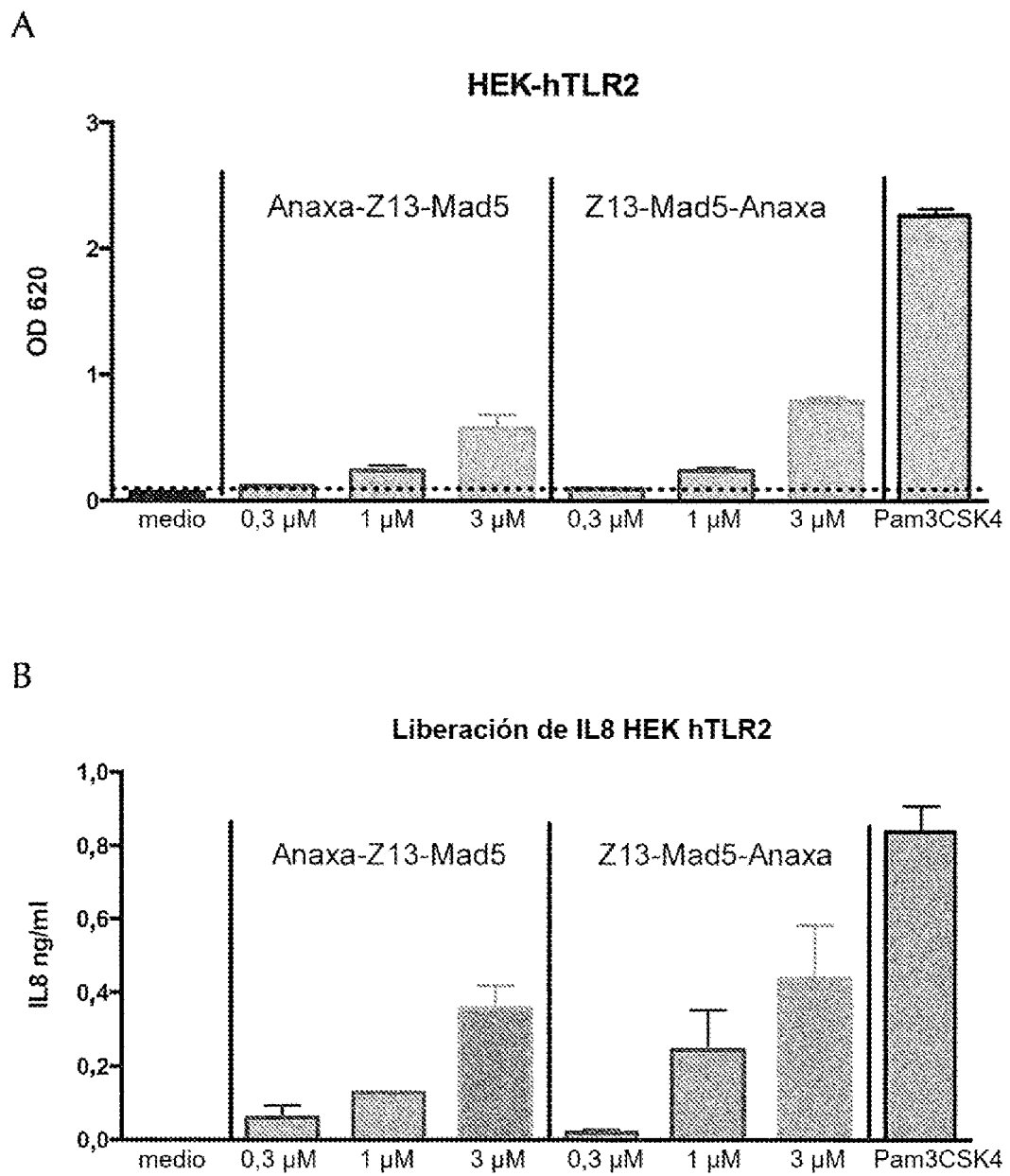


Fig. 14

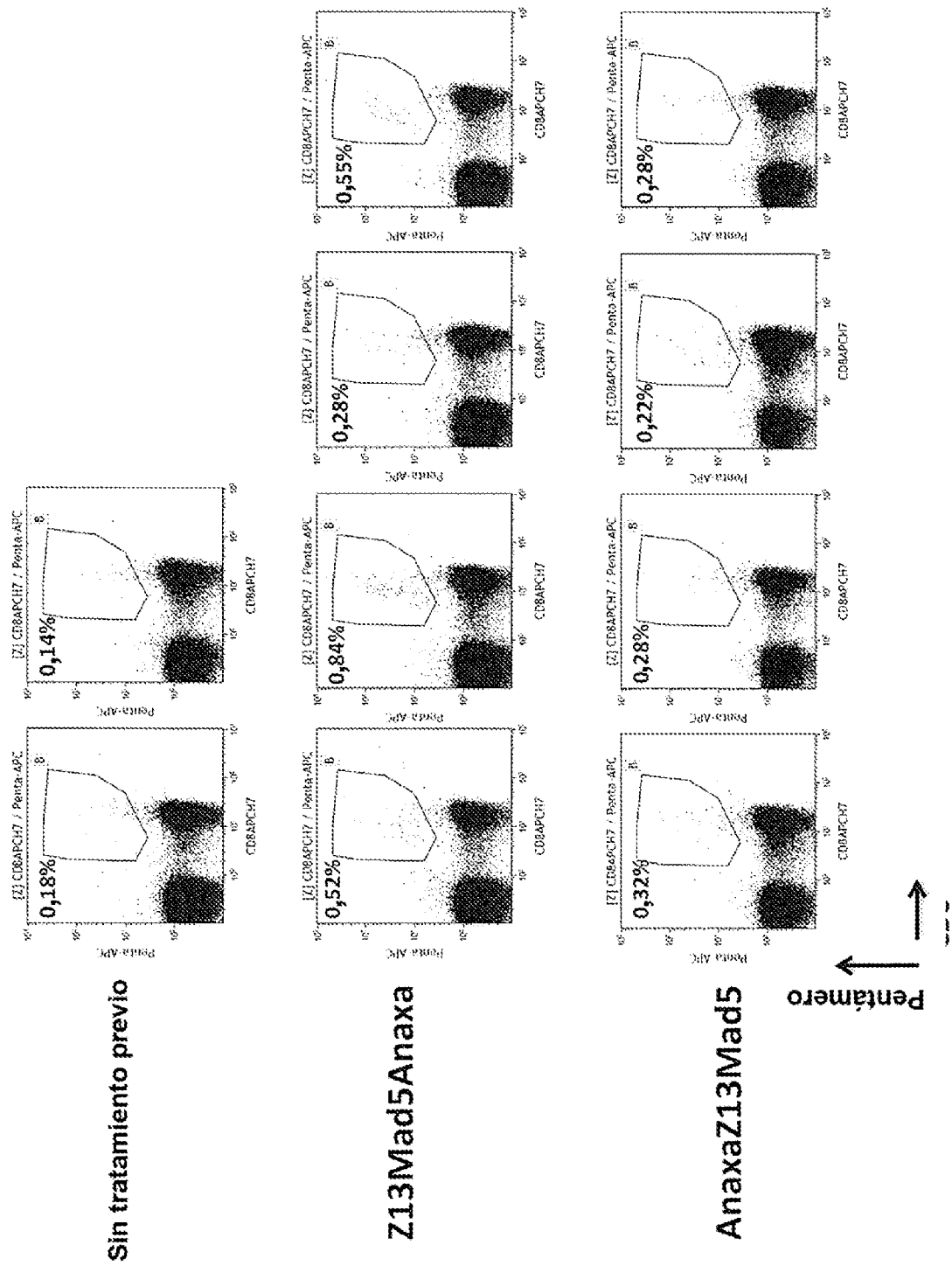


Fig. 15

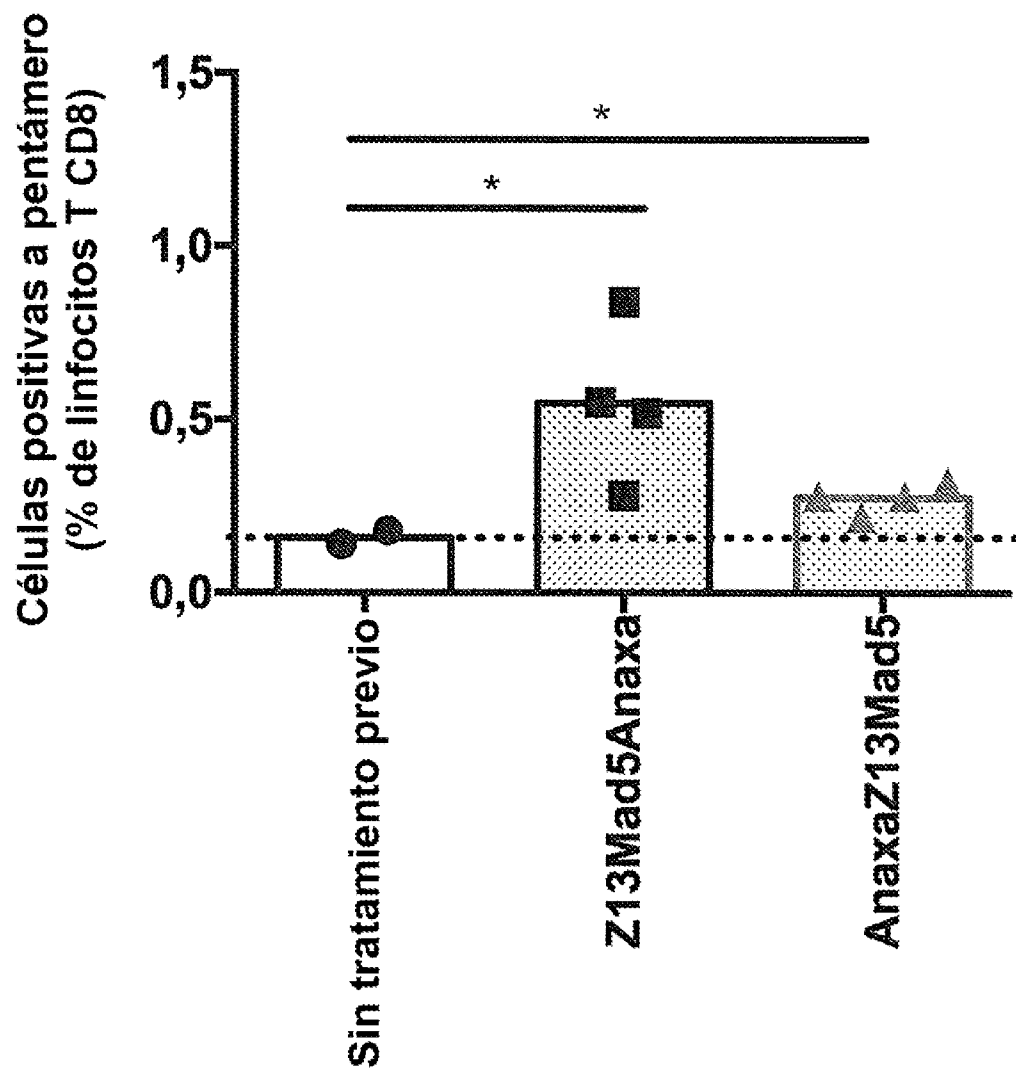


Fig. 16

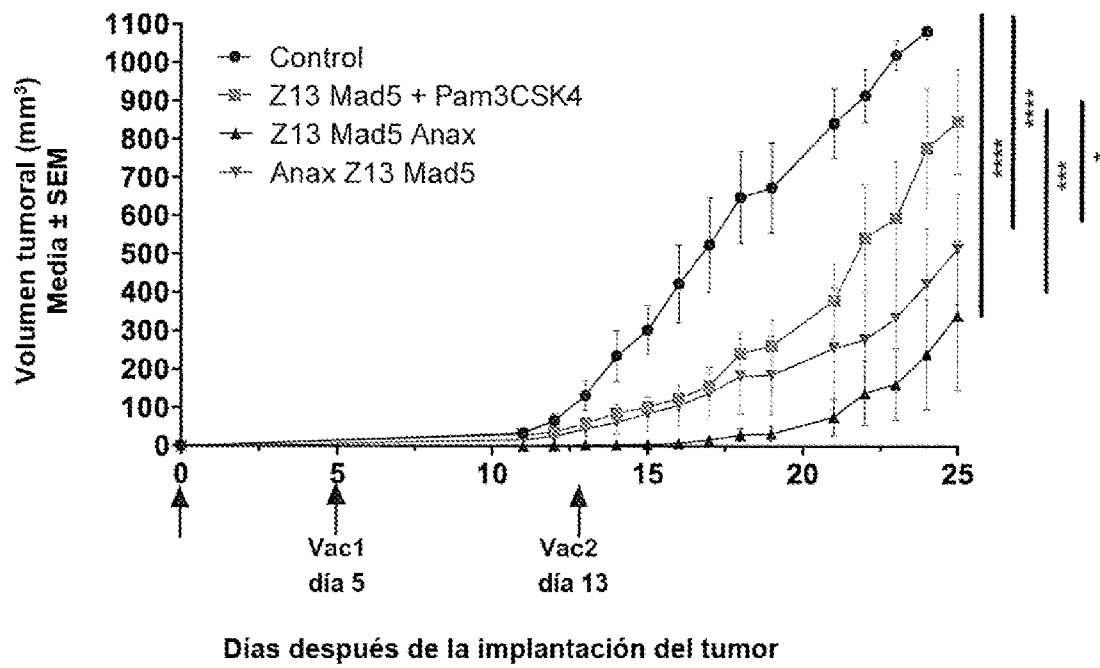


Fig. 17

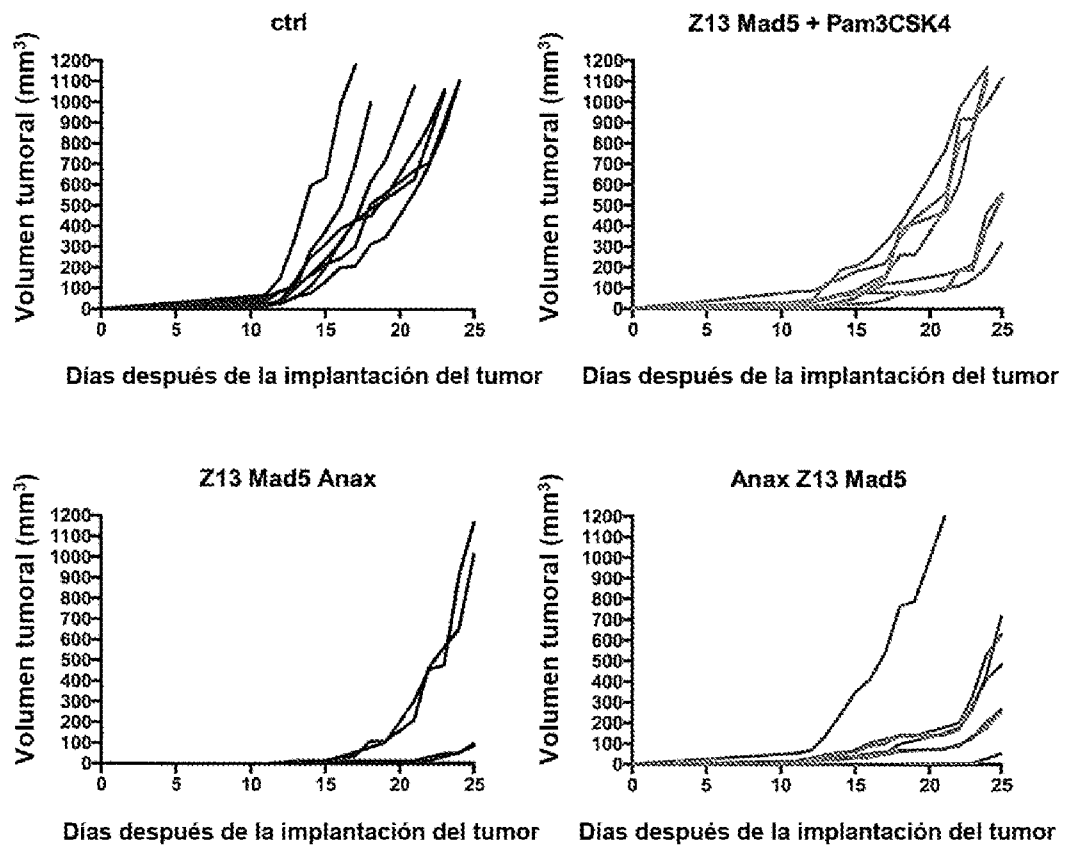


Fig. 18

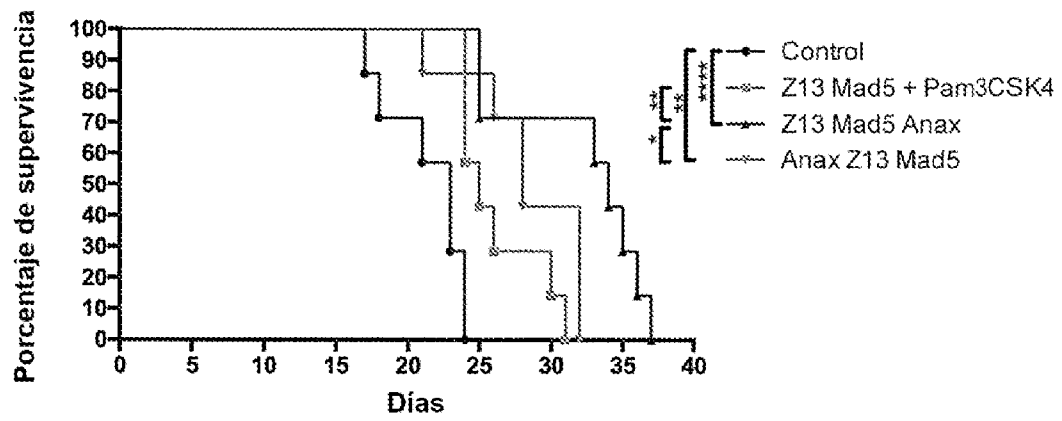


Fig. 19

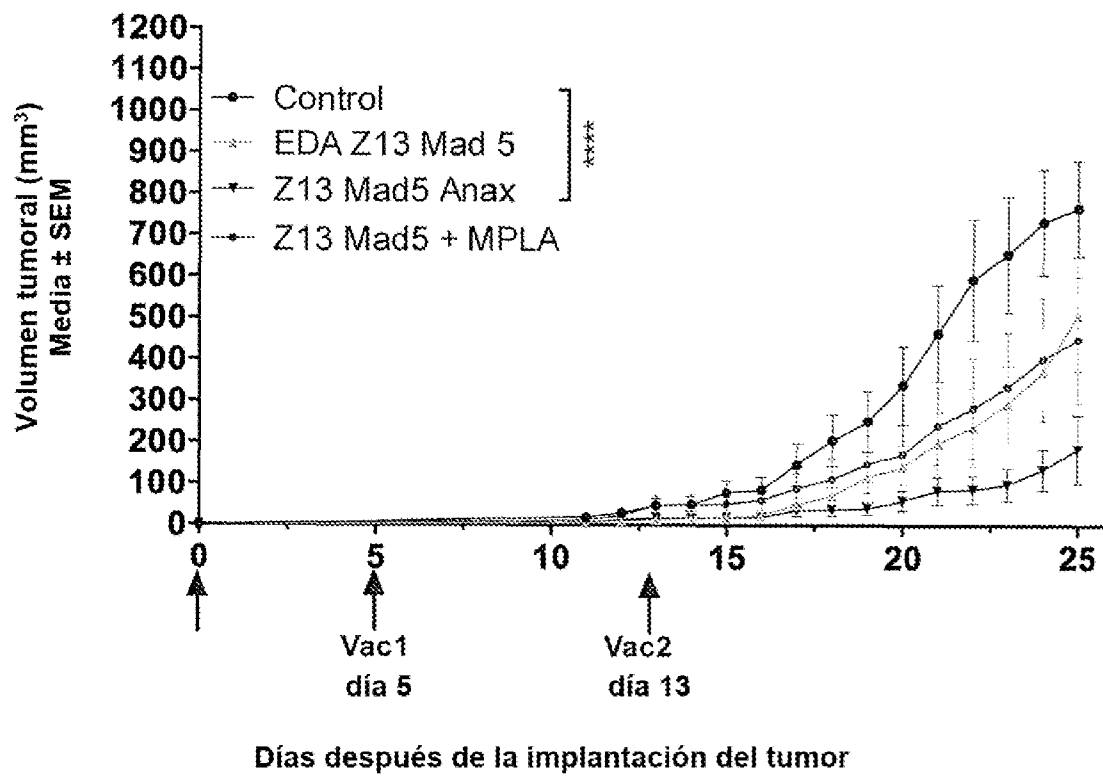


Fig. 20

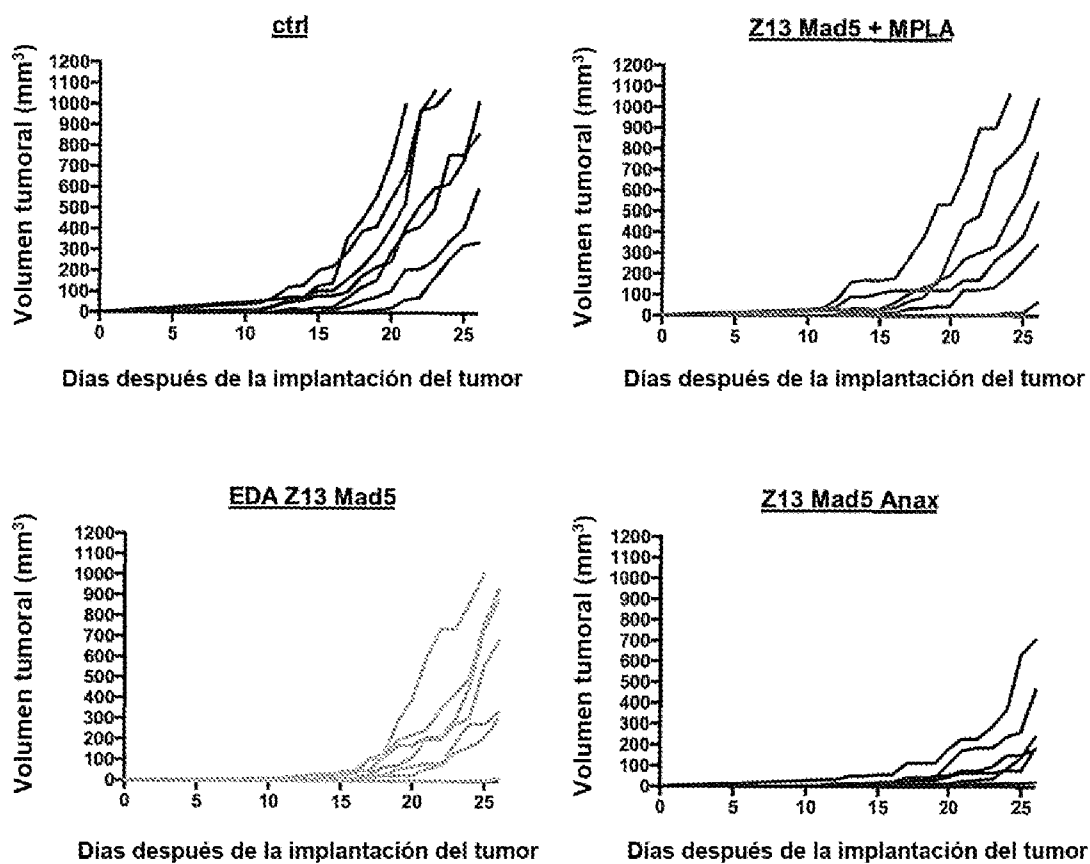


Fig. 21

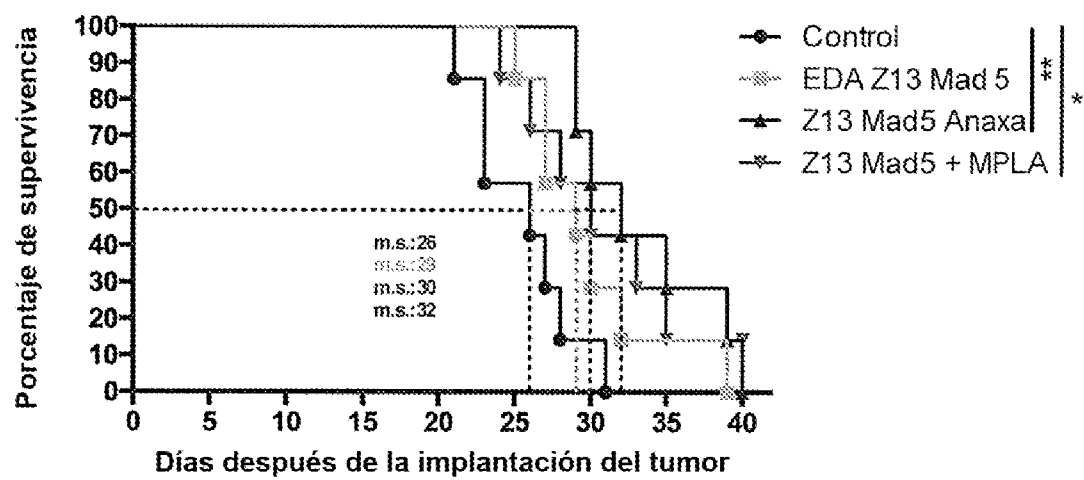


Fig. 22

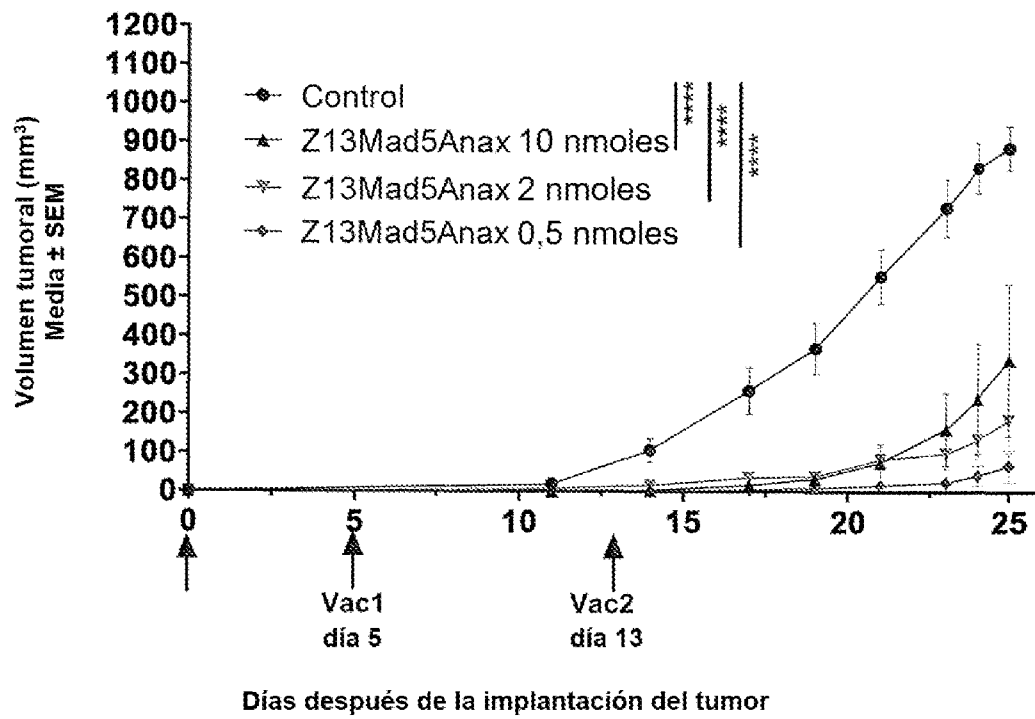
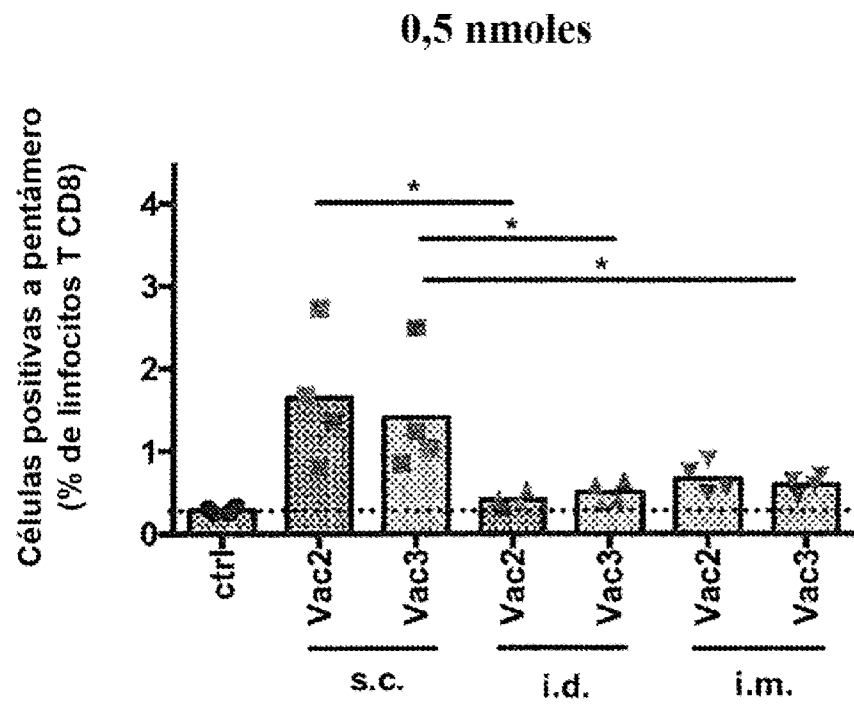


Fig. 23

A



B

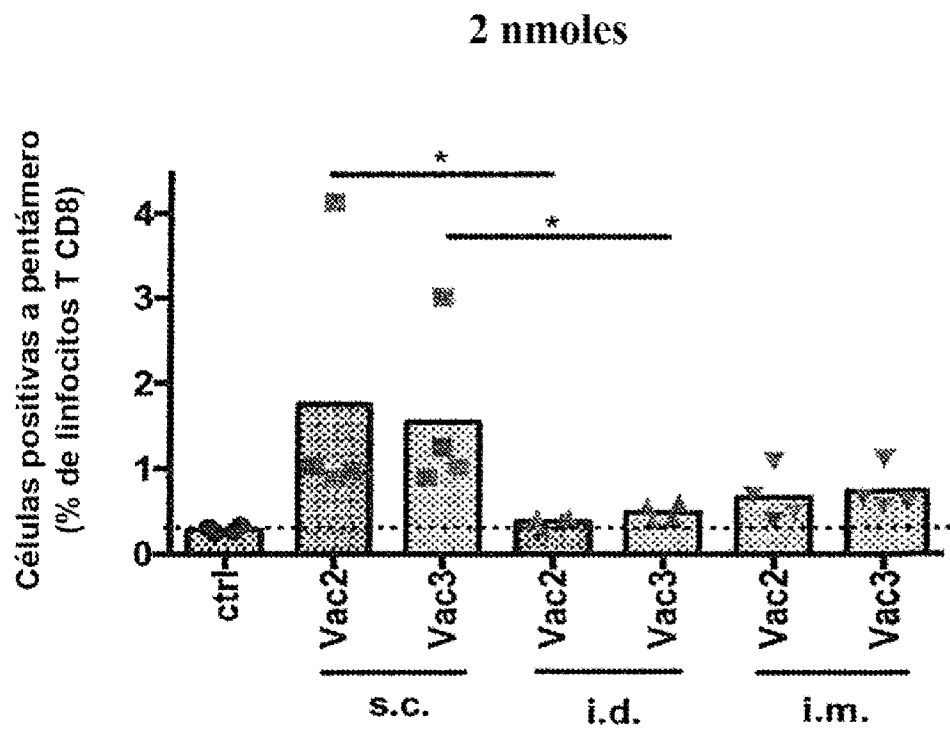
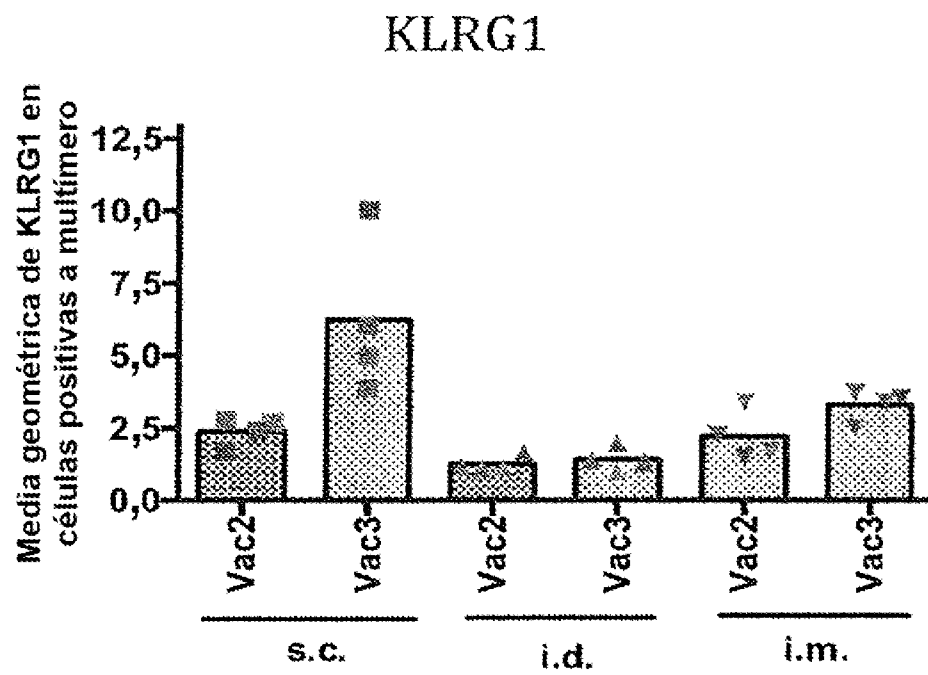


Fig. 24

A



B

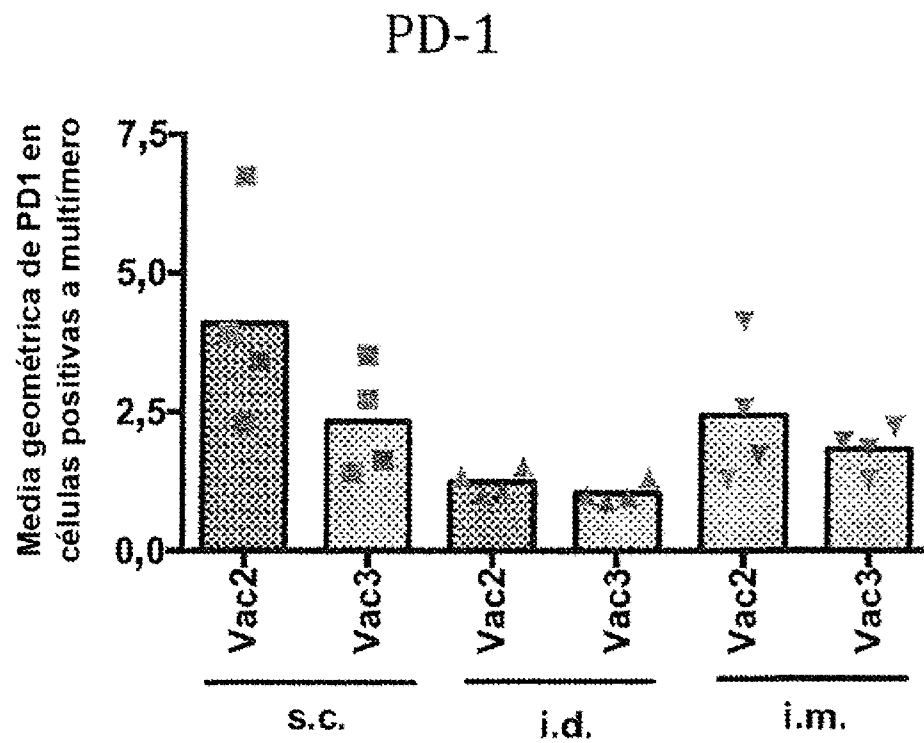


Fig. 25

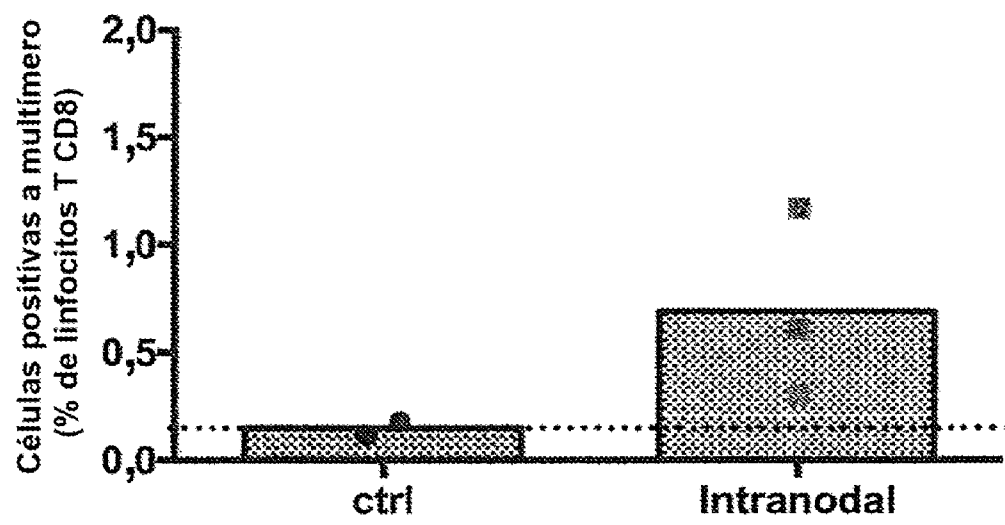


Fig. 26

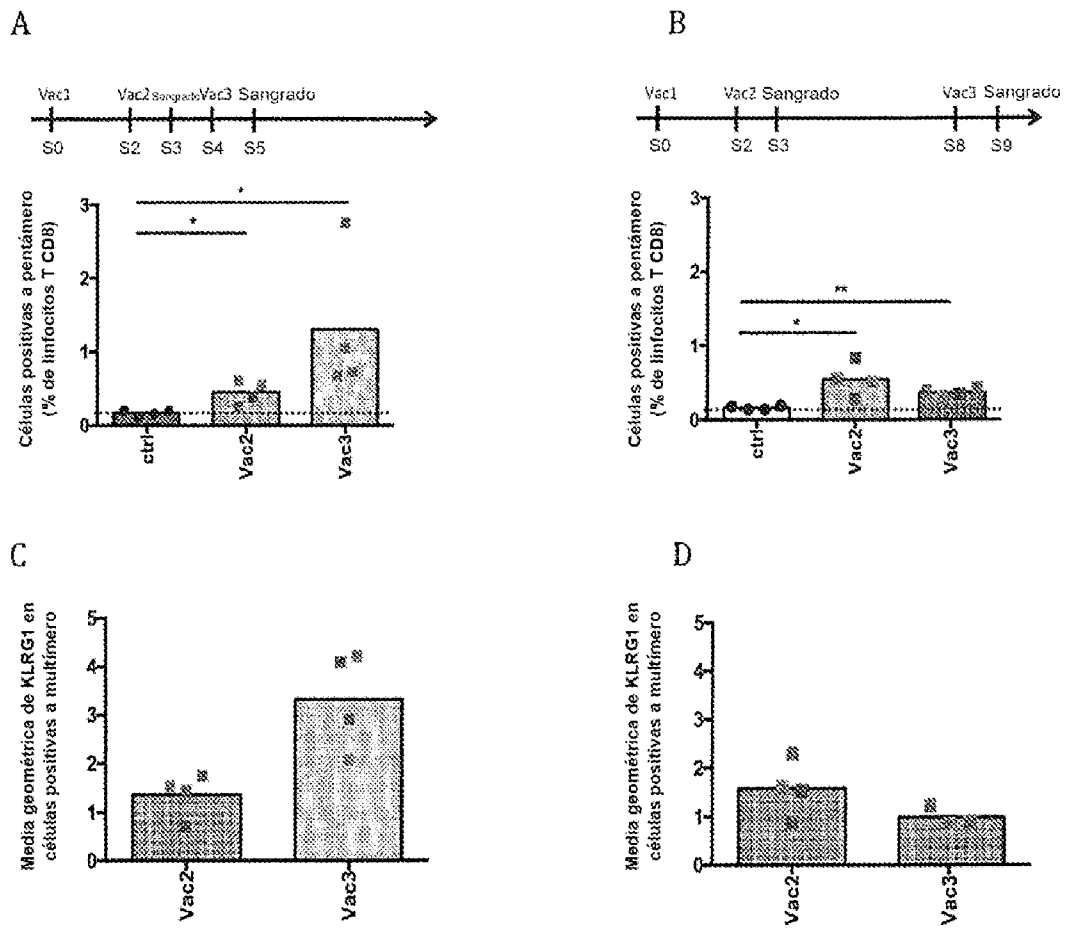


Fig. 27

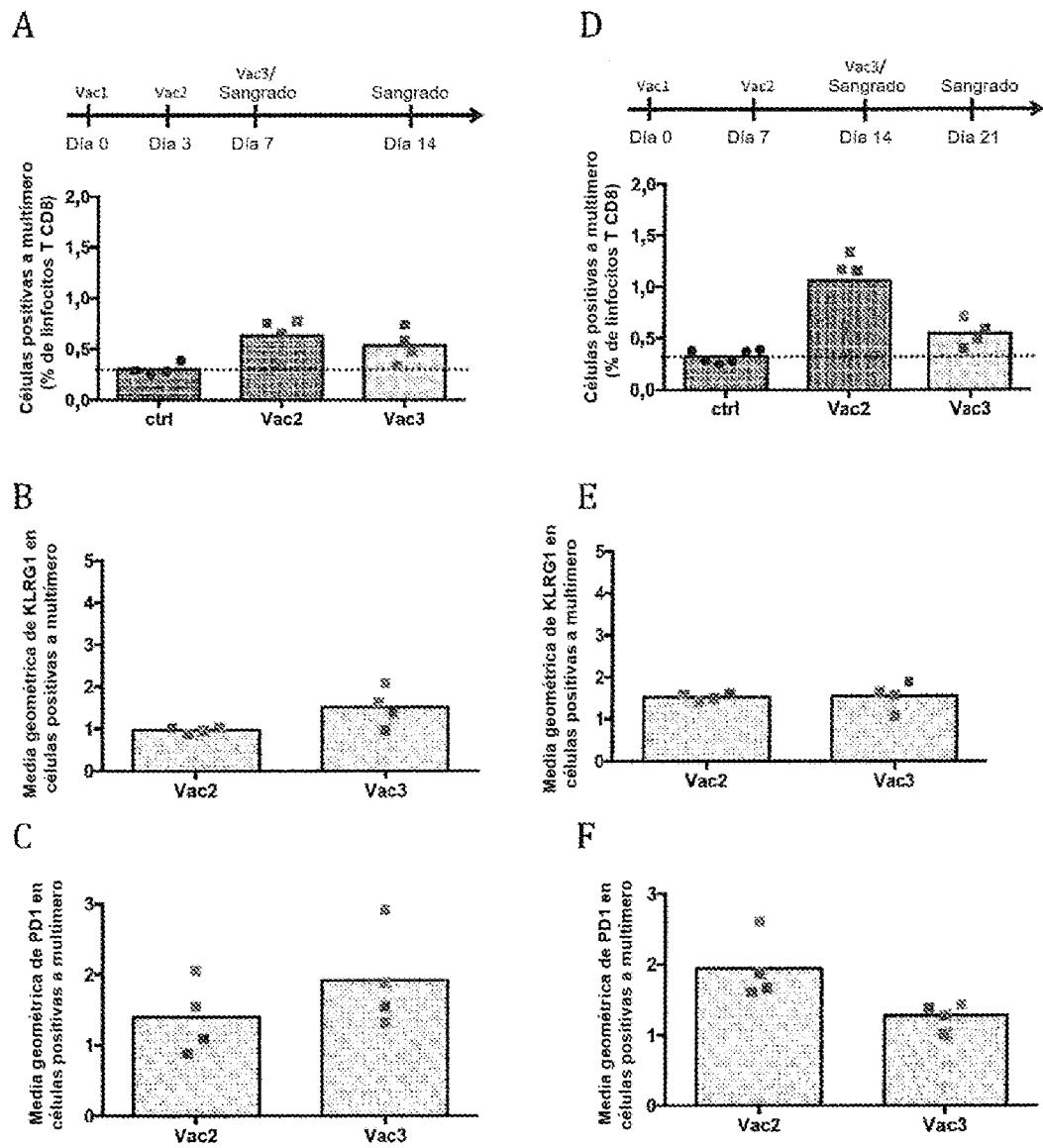


Fig. 28

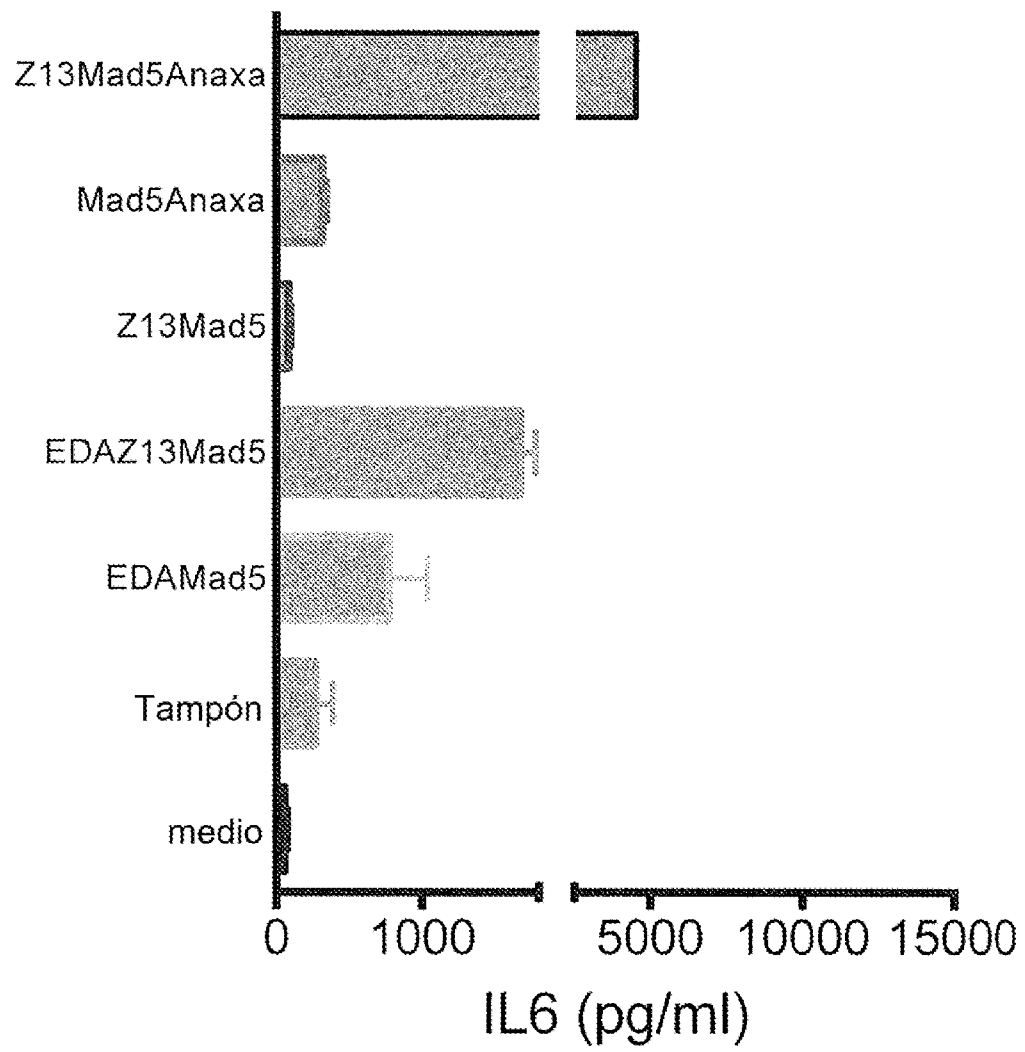


Fig. 29

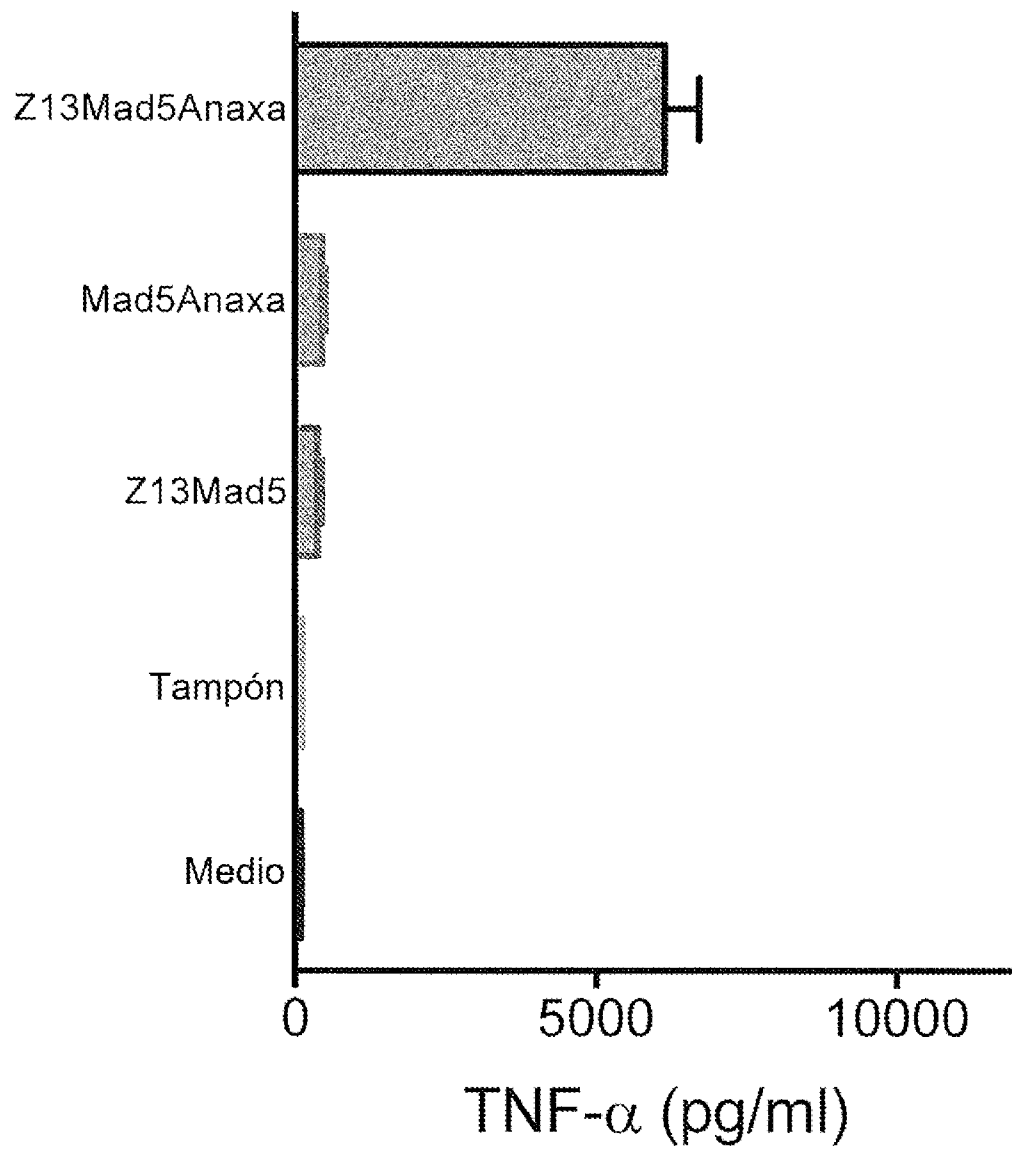


Fig. 30

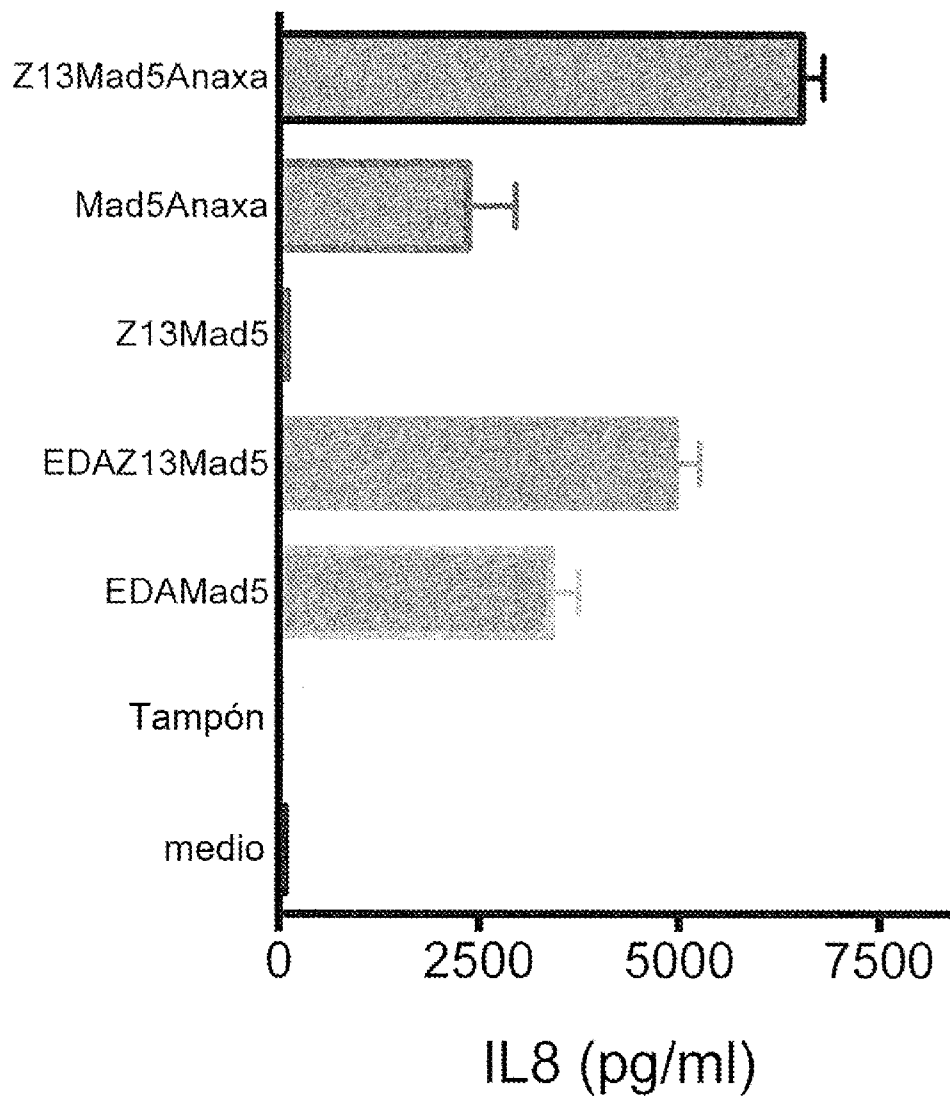


Fig. 31

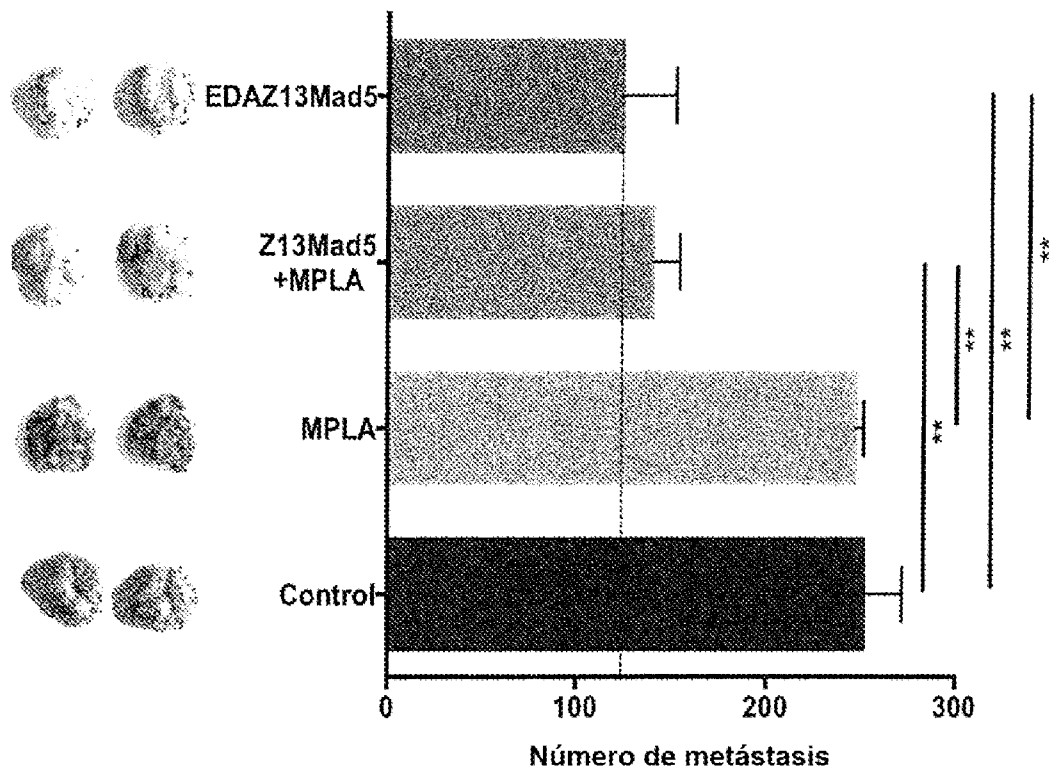


Fig. 32

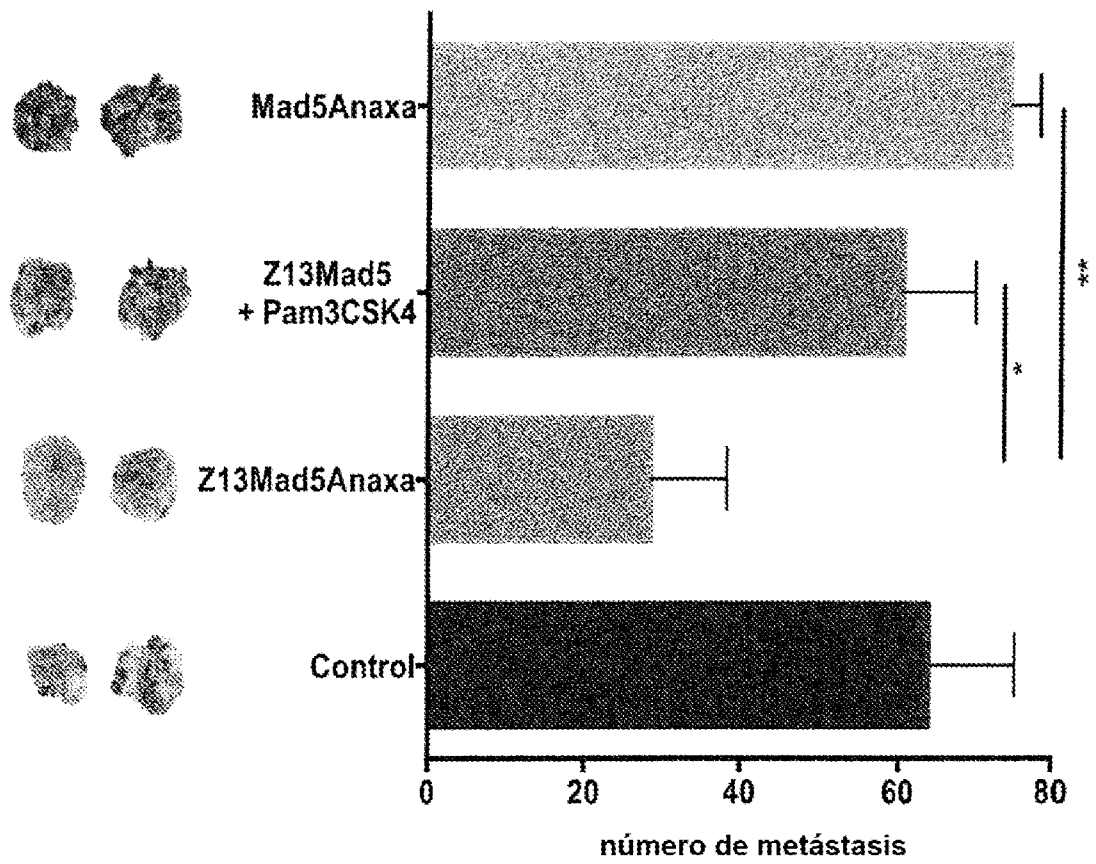


Fig. 33

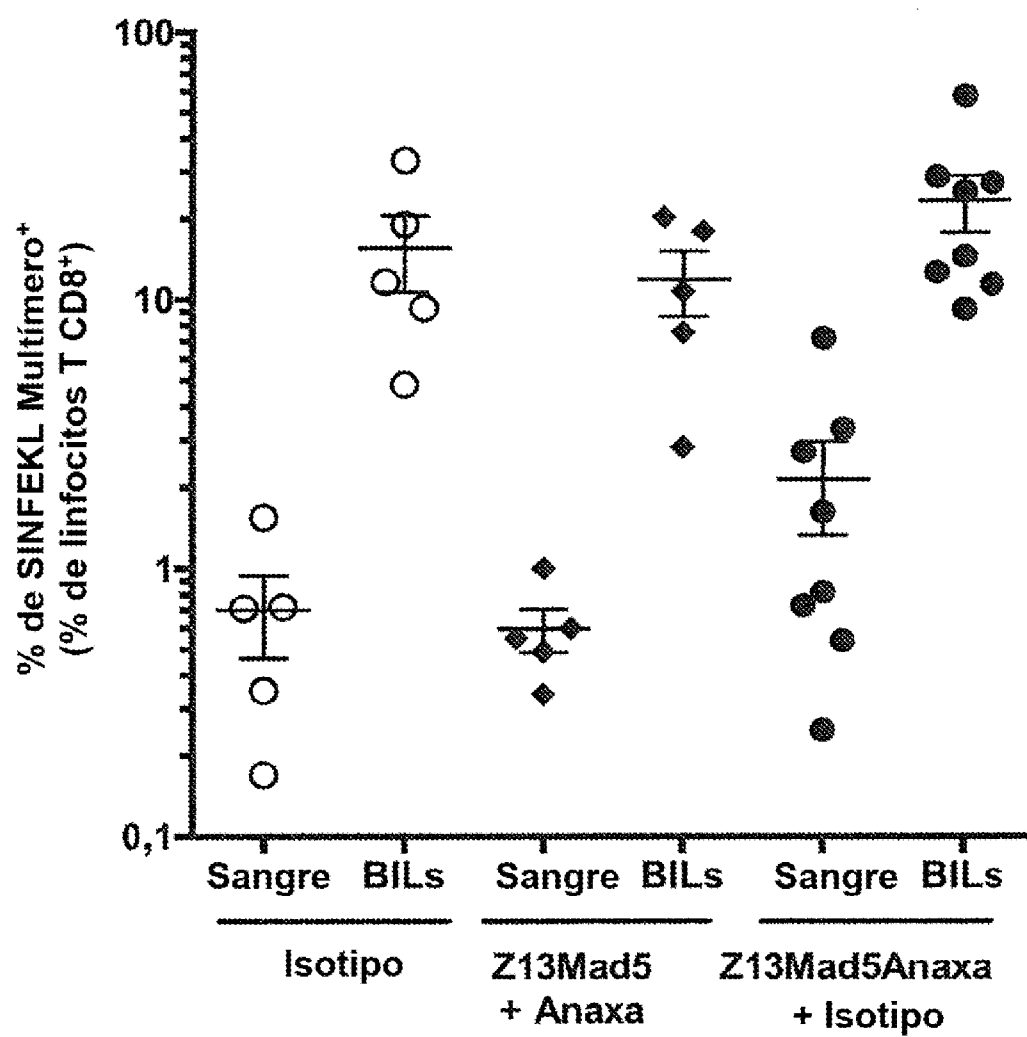


Fig. 34

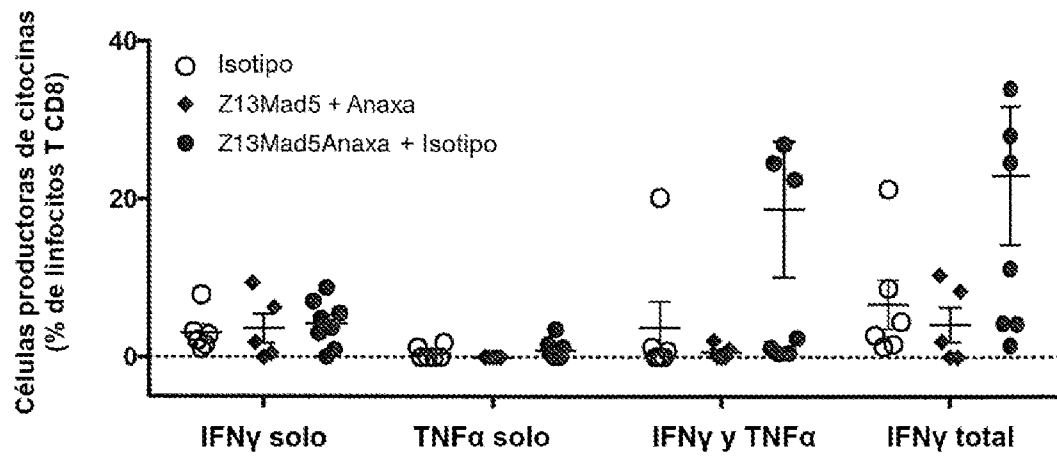


Fig. 35

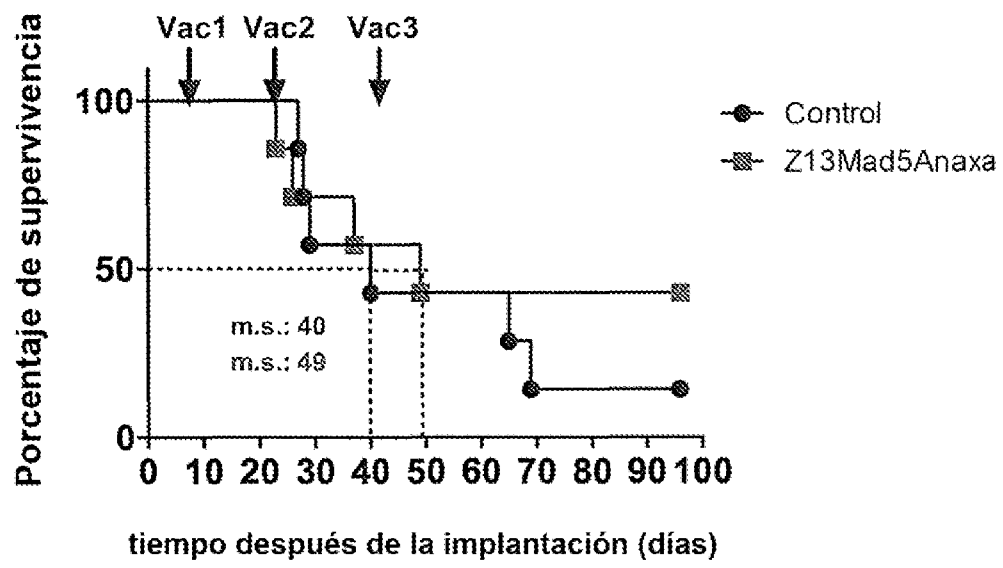
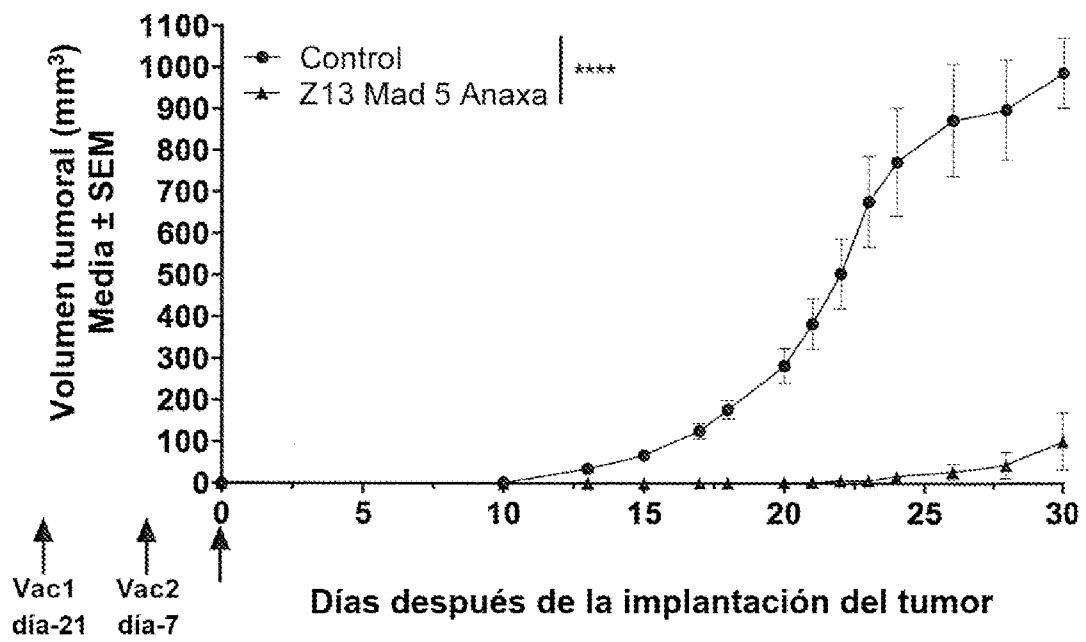


Fig. 36

A



B

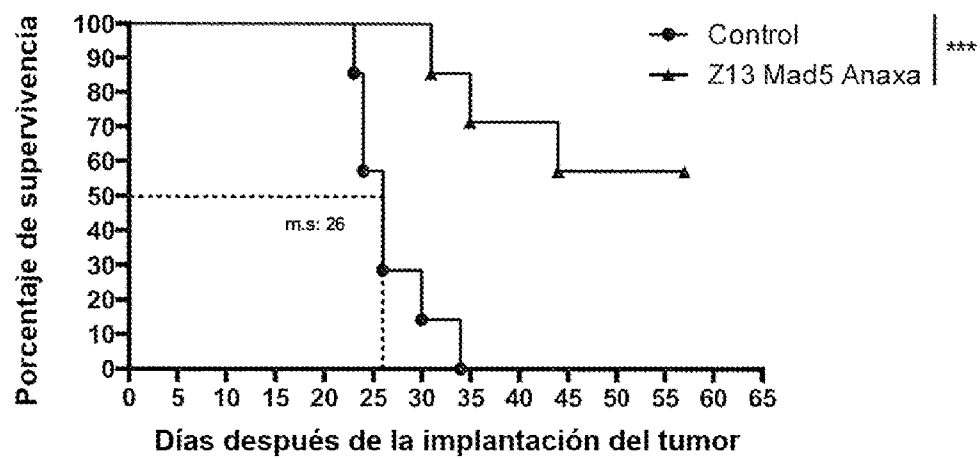
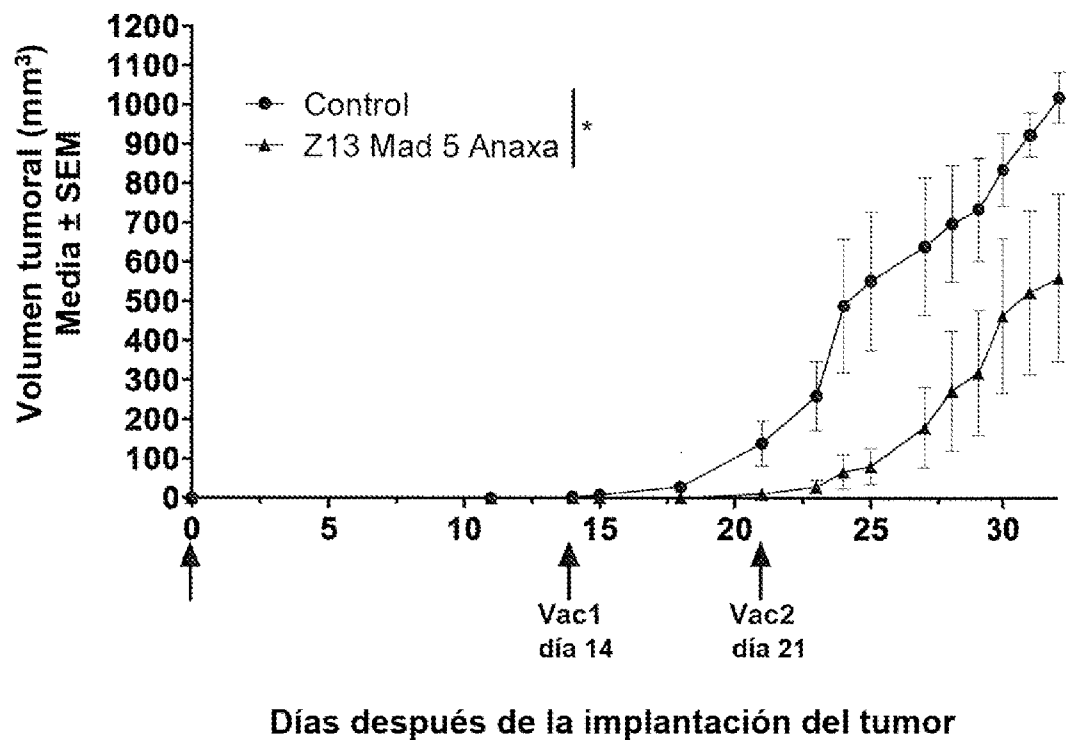


Fig. 37

A



B

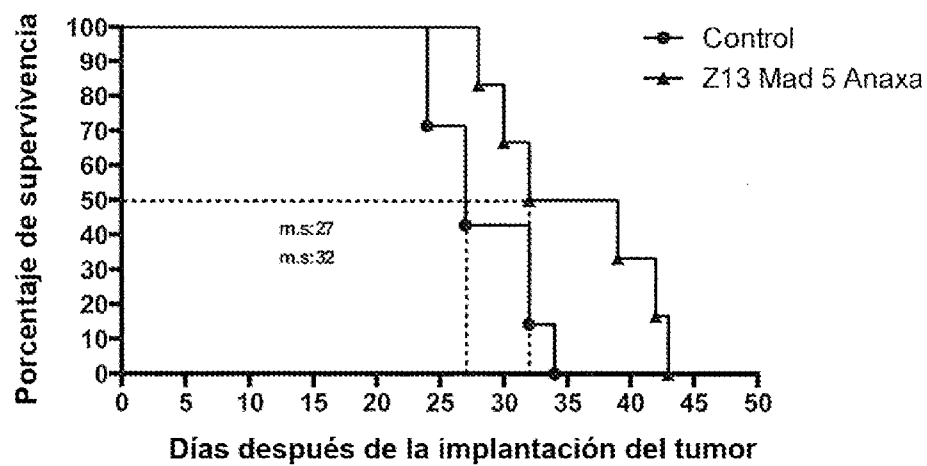
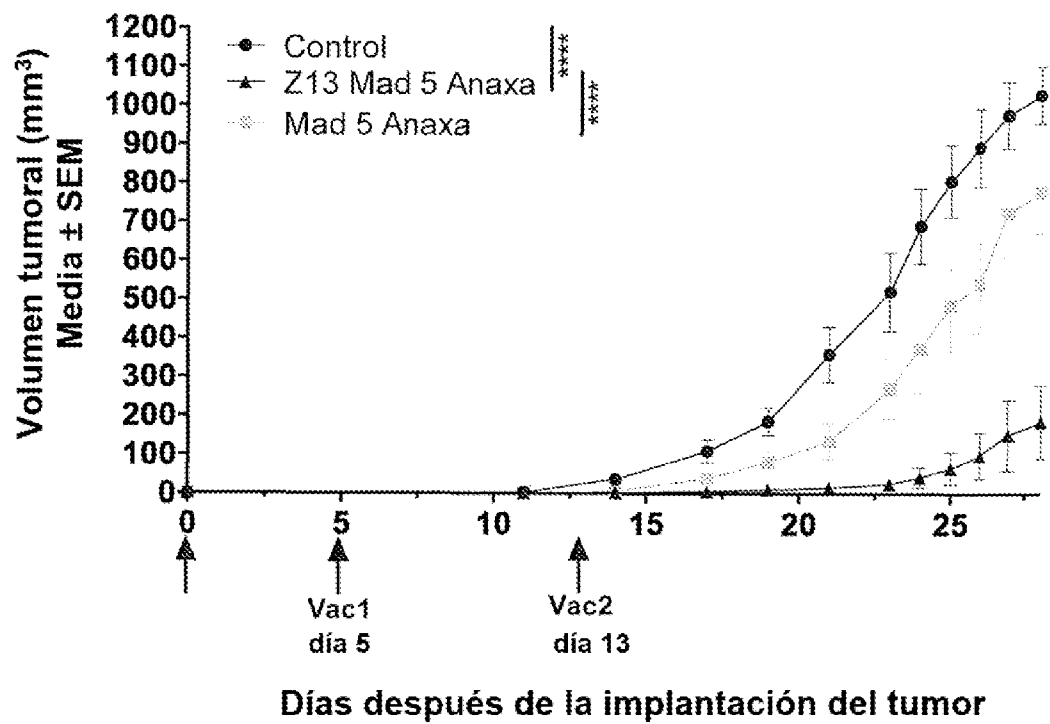


Fig. 38

A



B

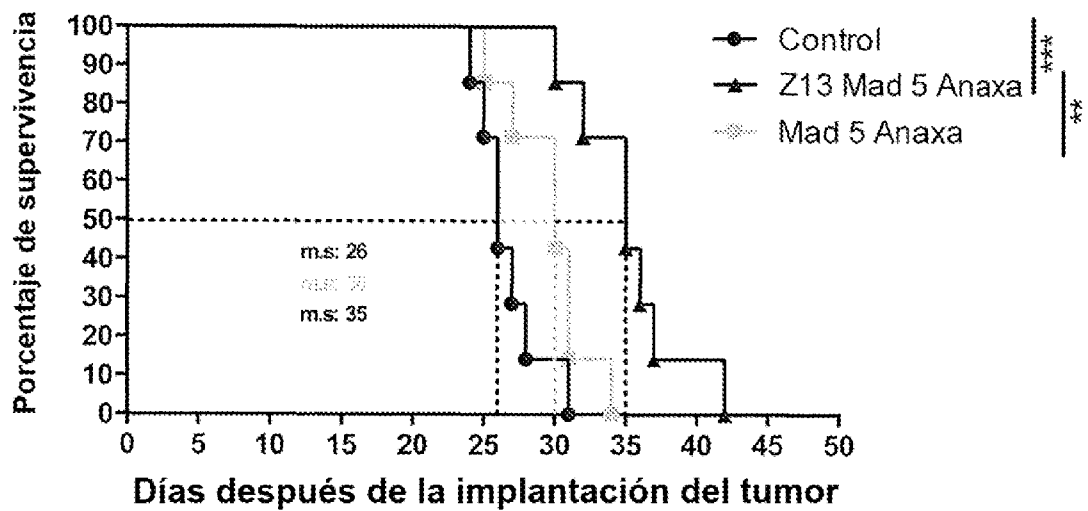
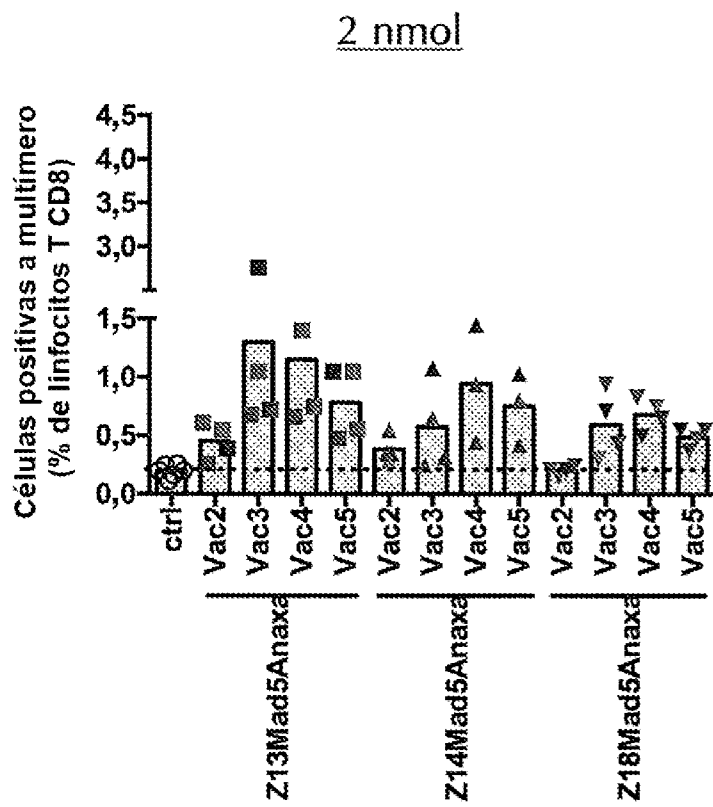


Fig. 39

A



B

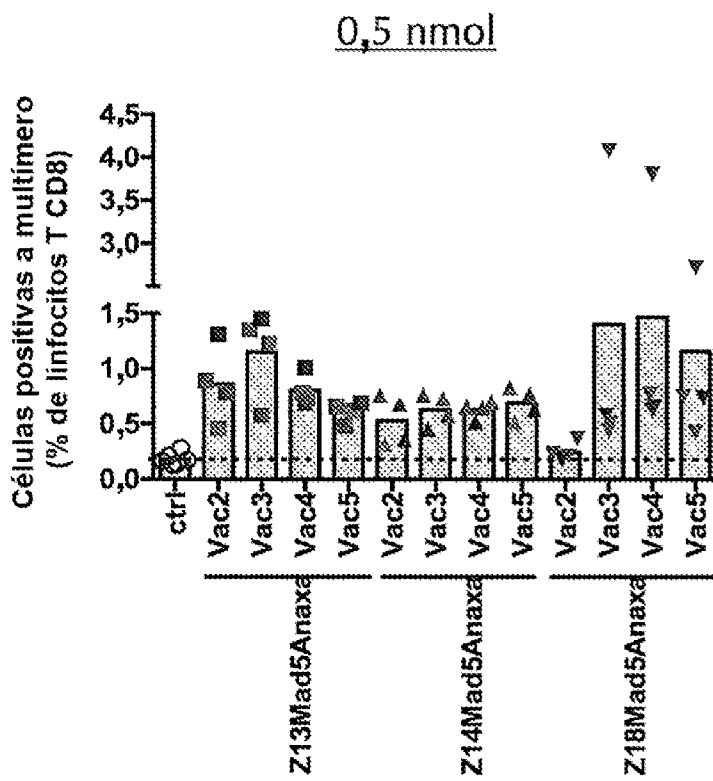


Fig. 40

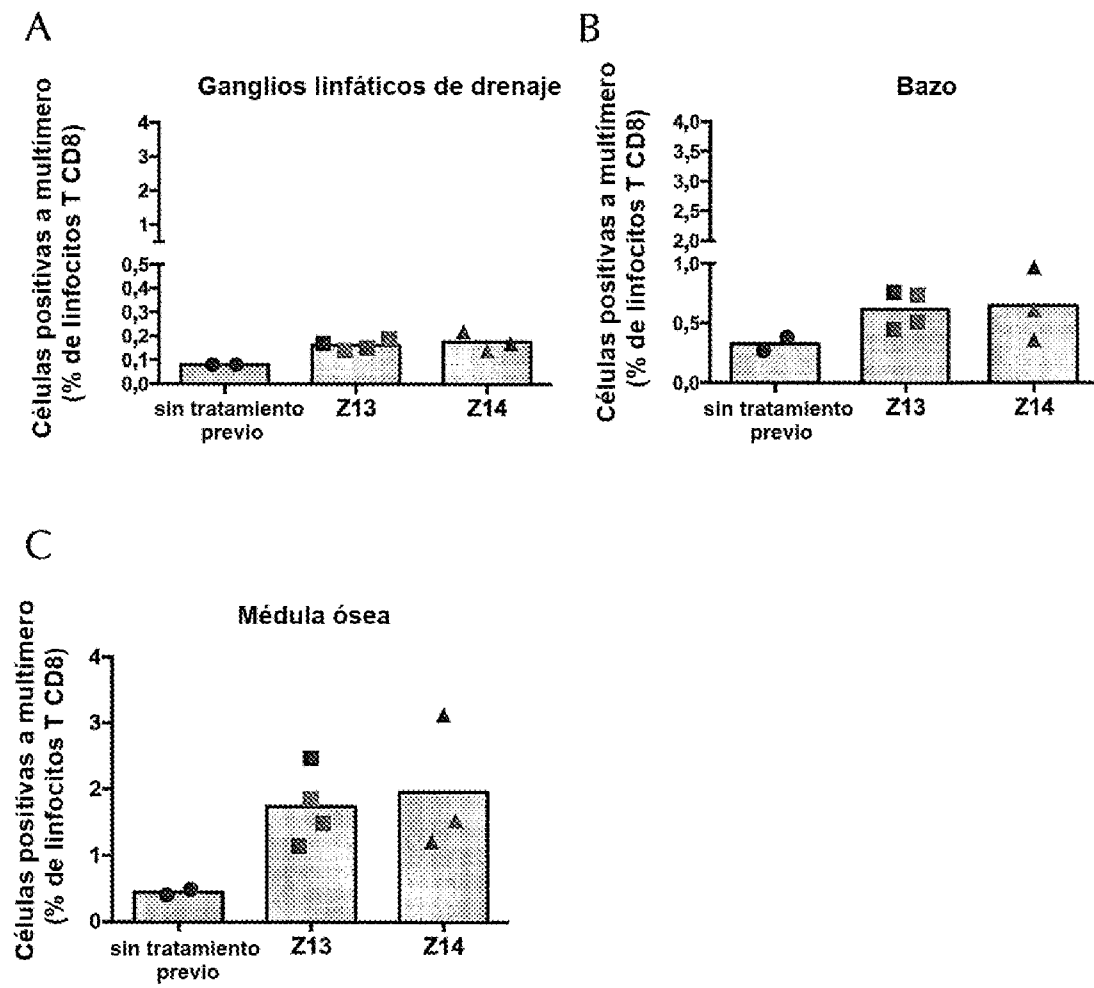
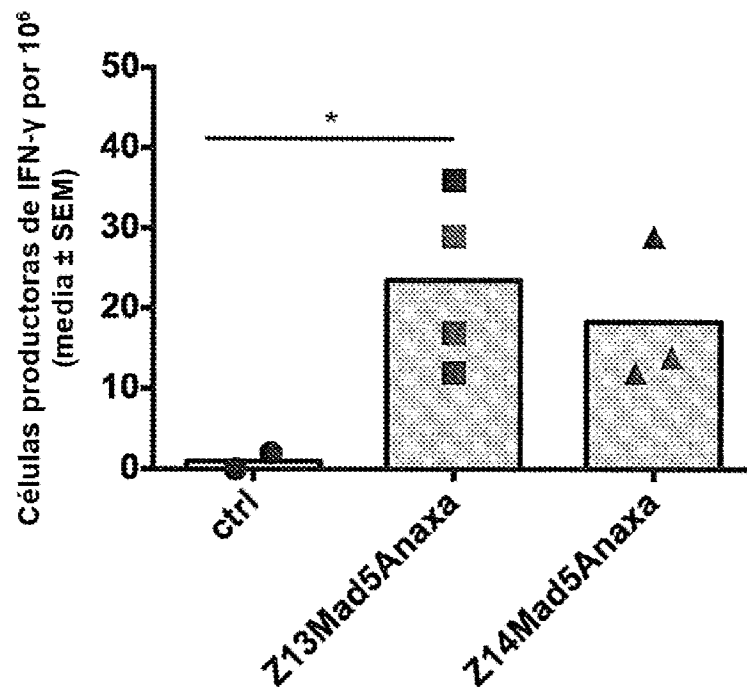


Fig. 41

A



B

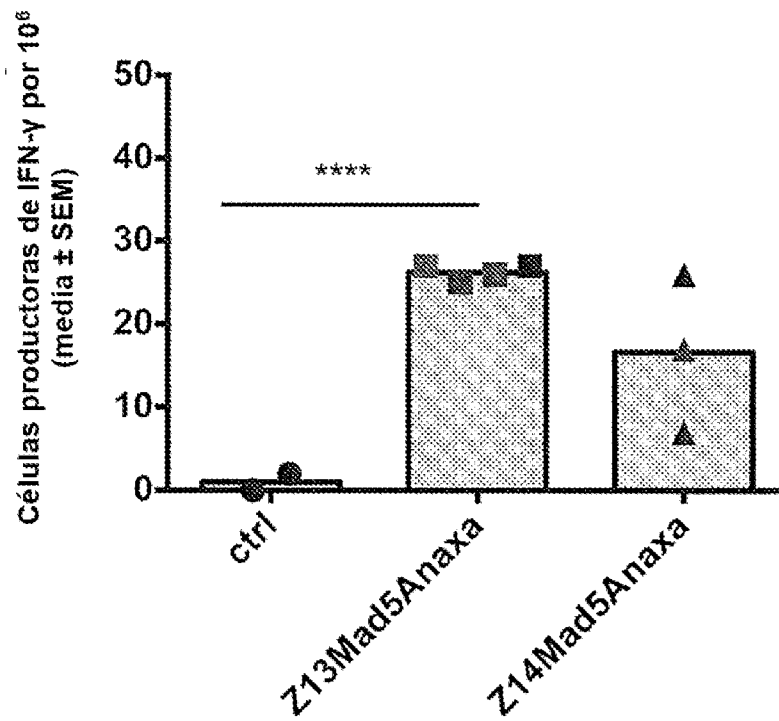


Fig. 42

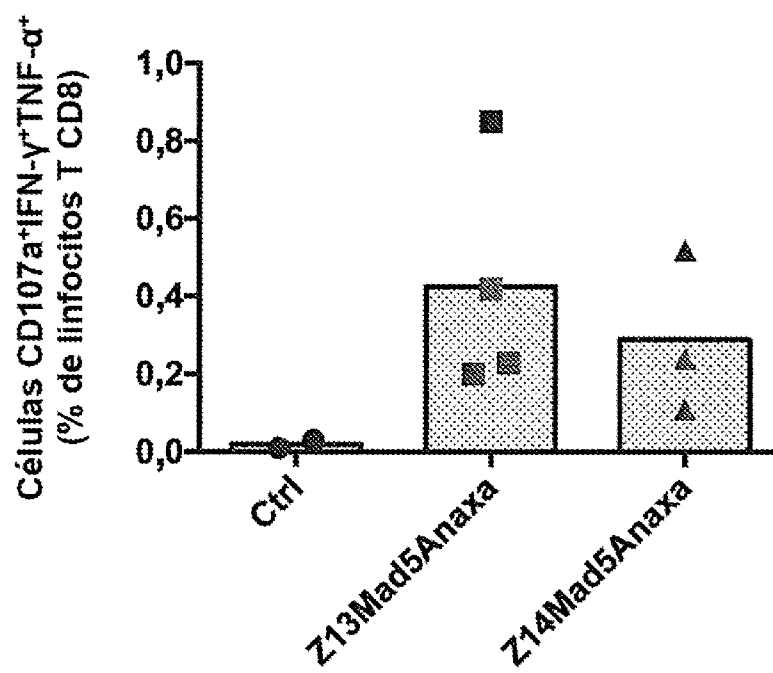
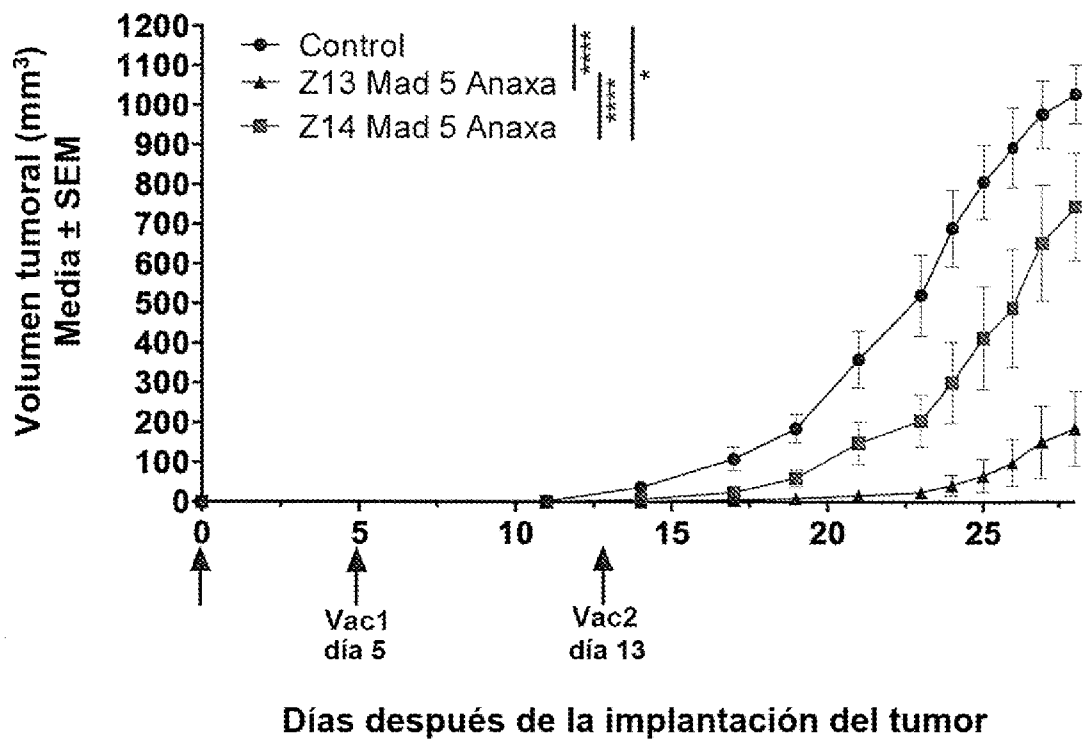


Fig. 43

A



B

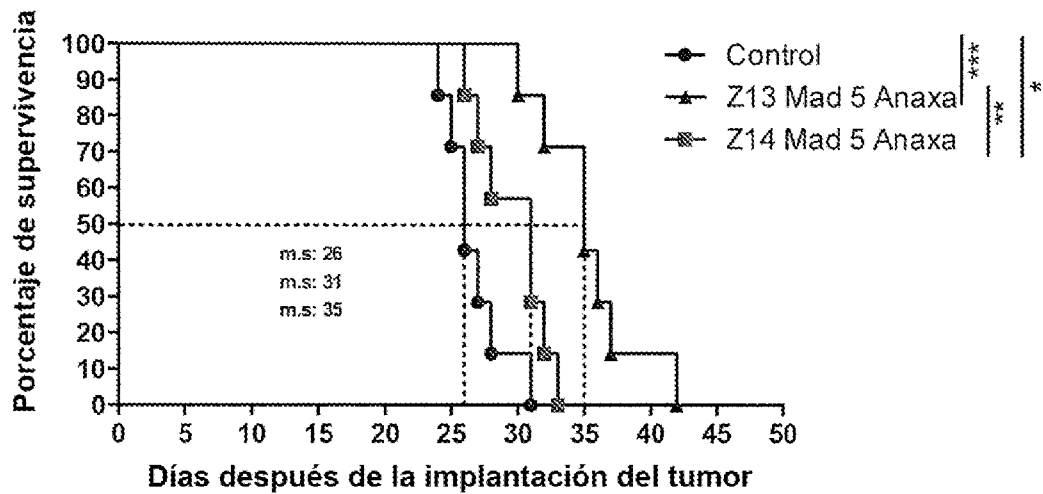
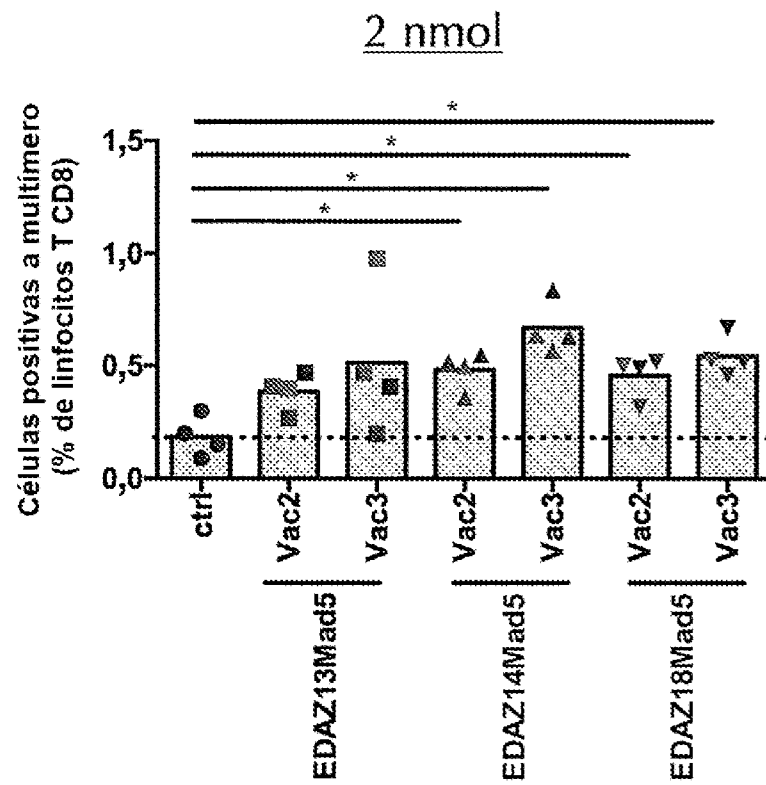


Fig. 44

A



B

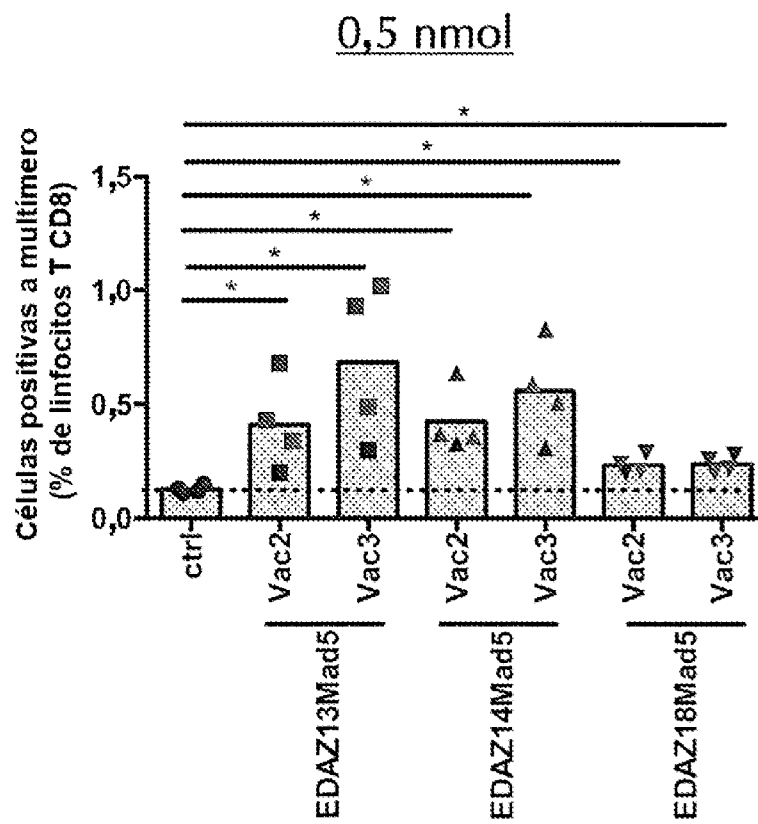
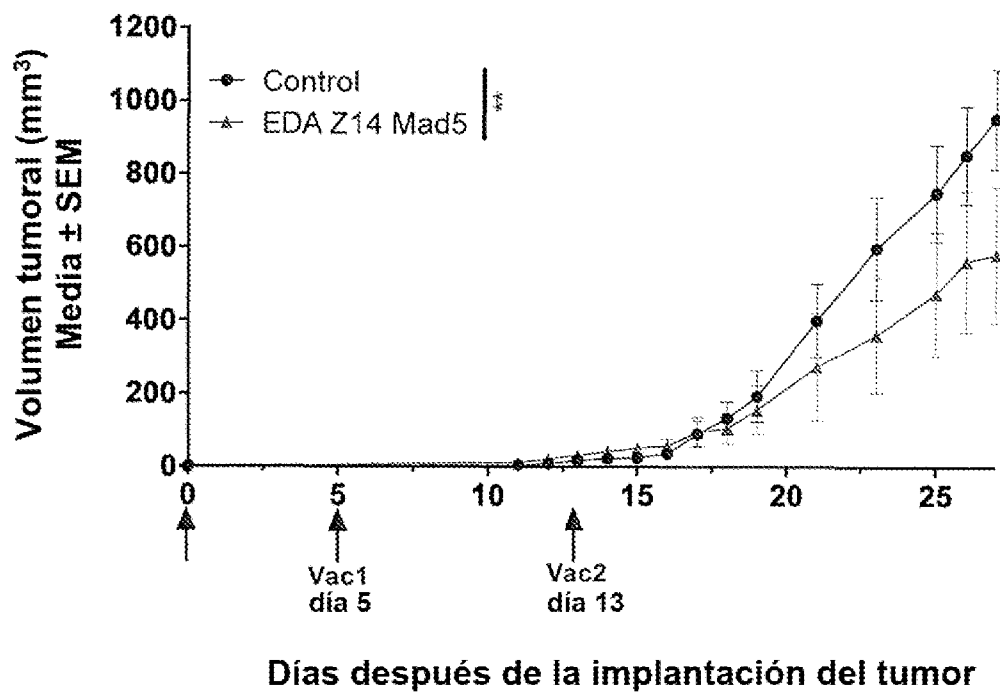


Fig. 45

A



B

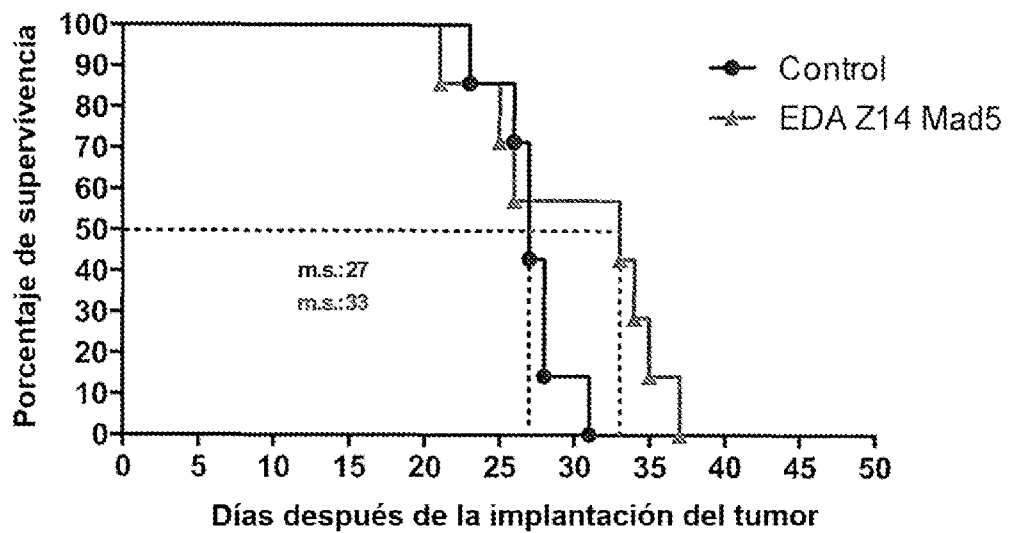


Fig. 46

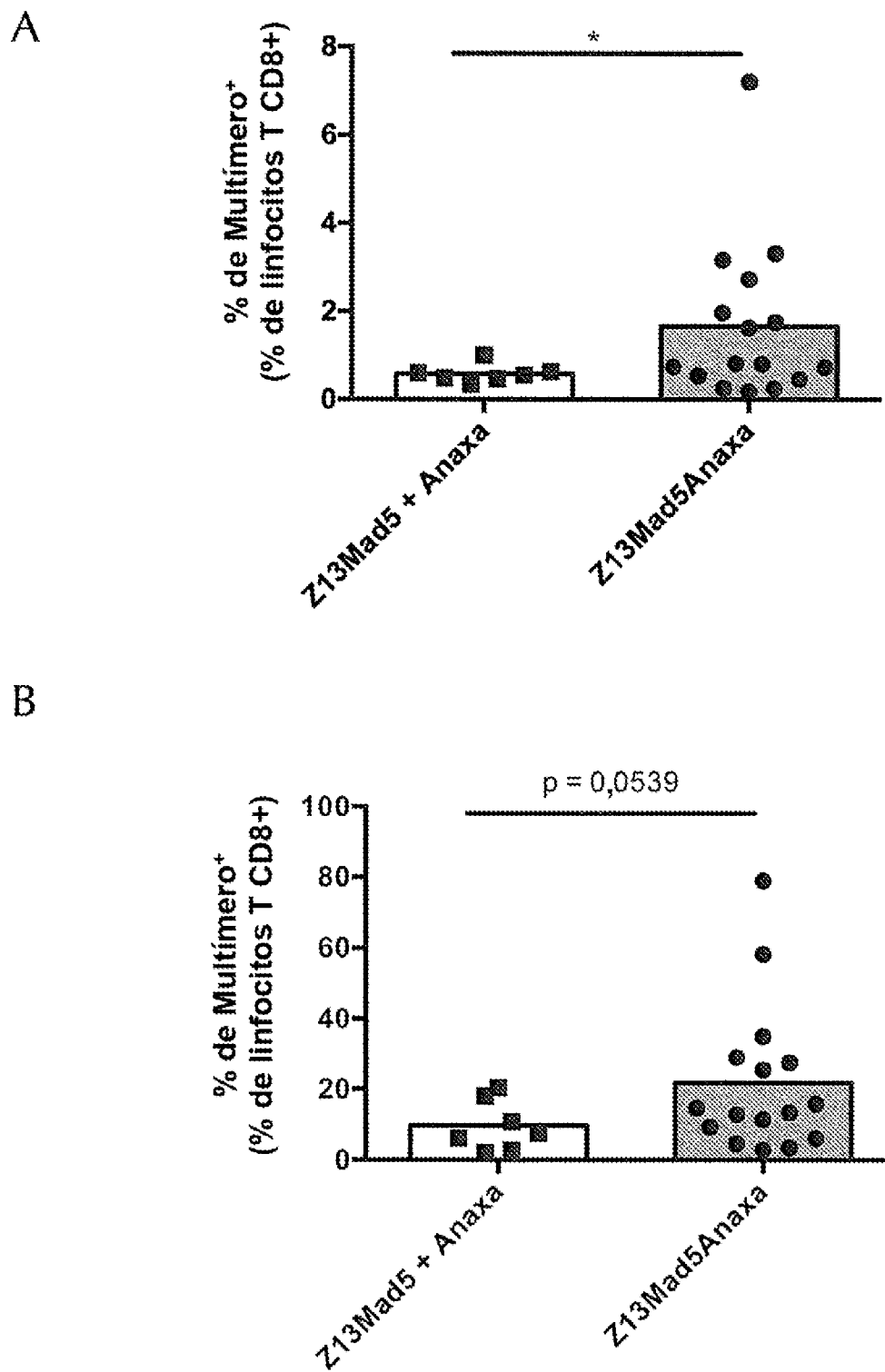


Fig. 47

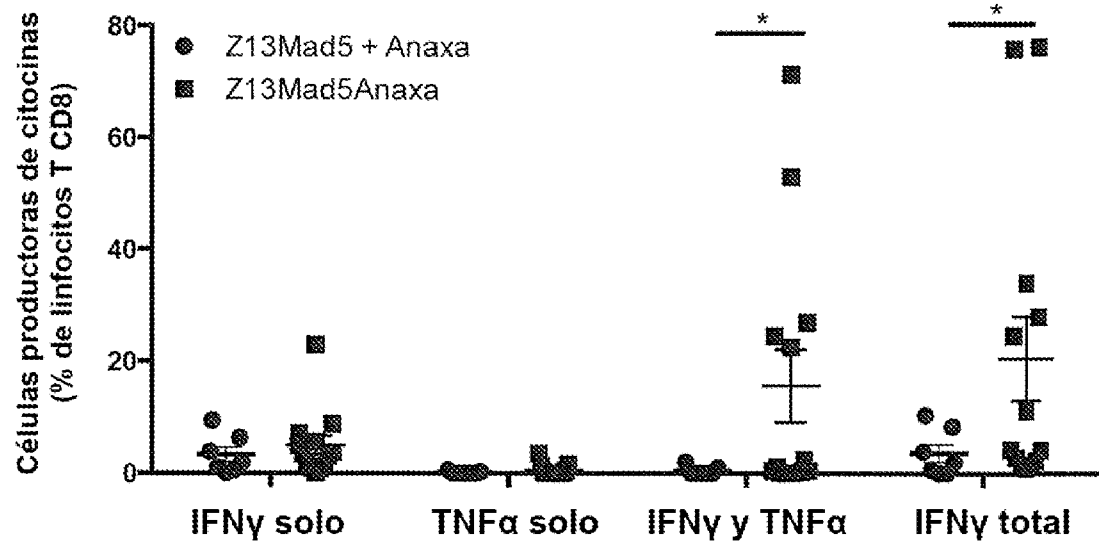
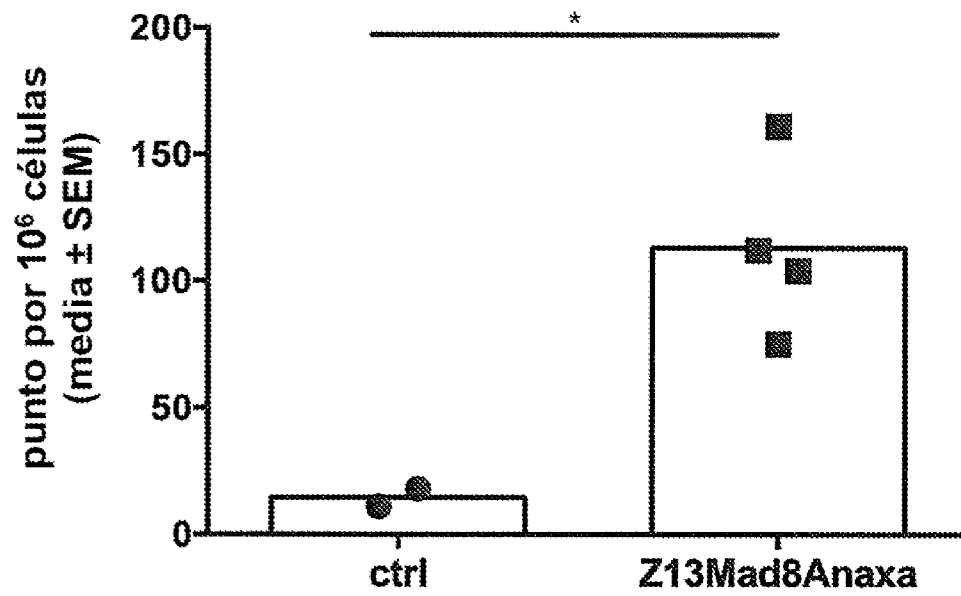


Fig. 48

A



B

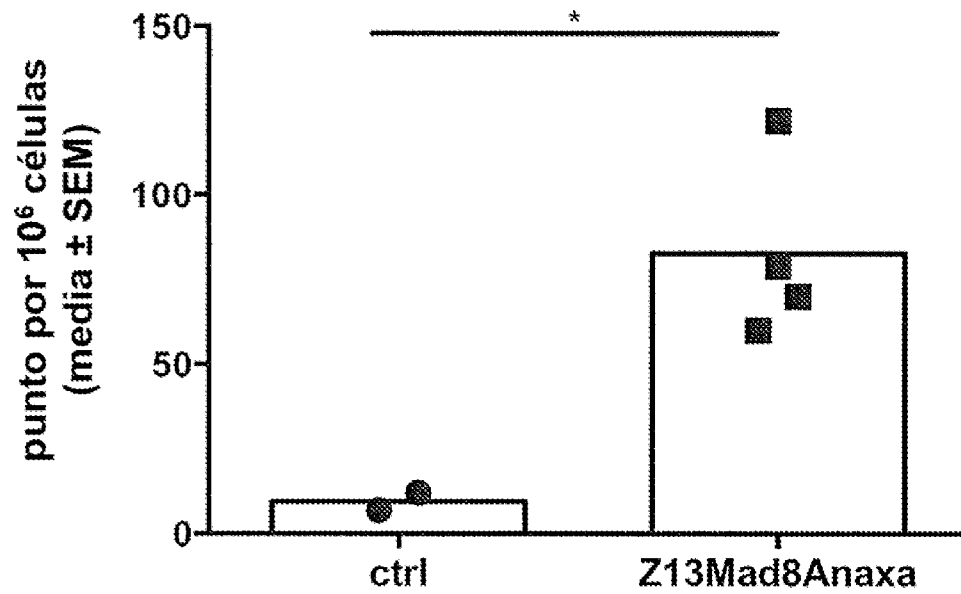
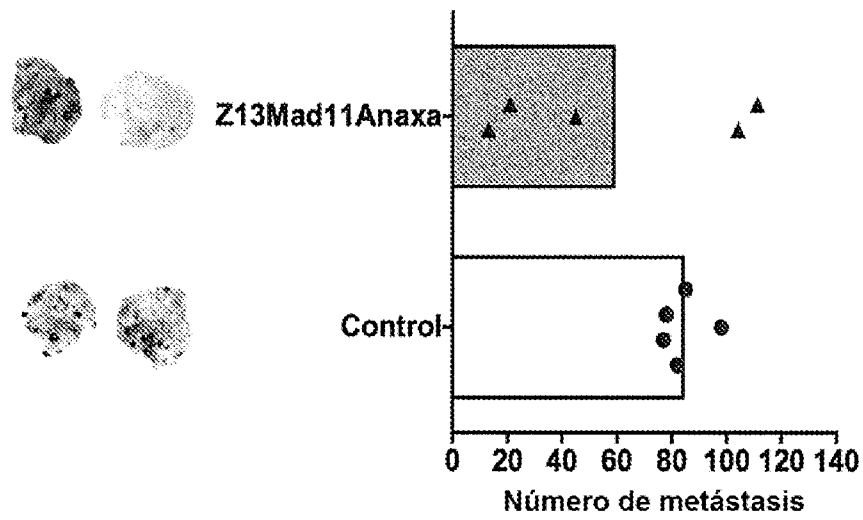


Fig. 49

A



B

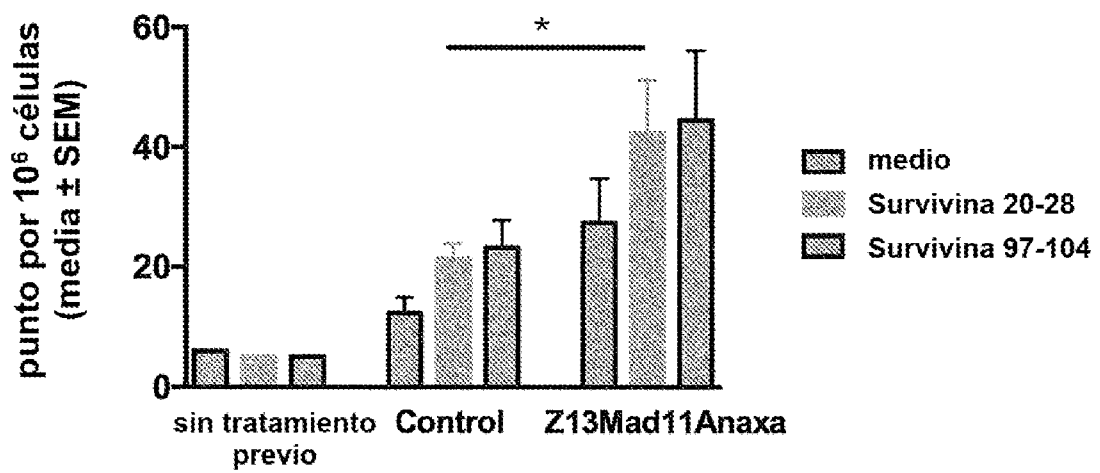


Fig. 50

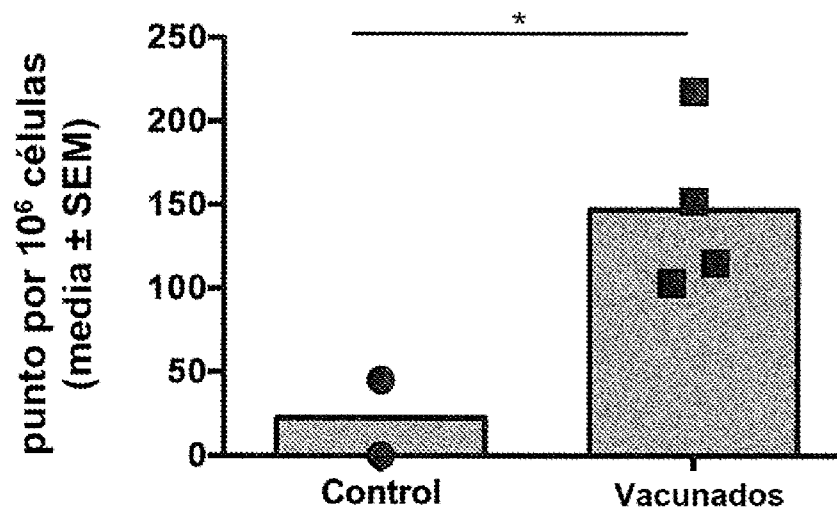


Fig. 51

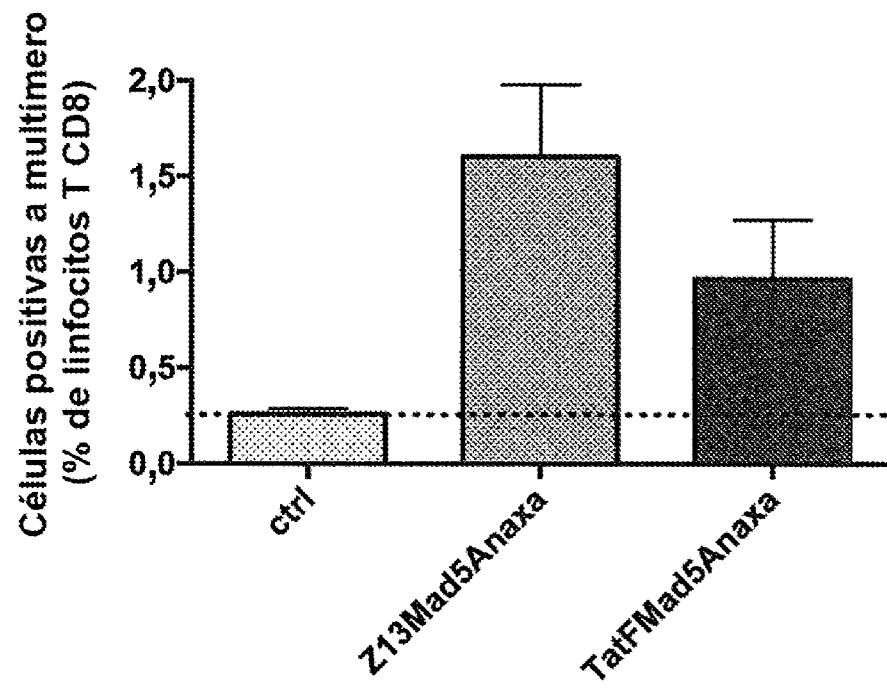


Fig. 52

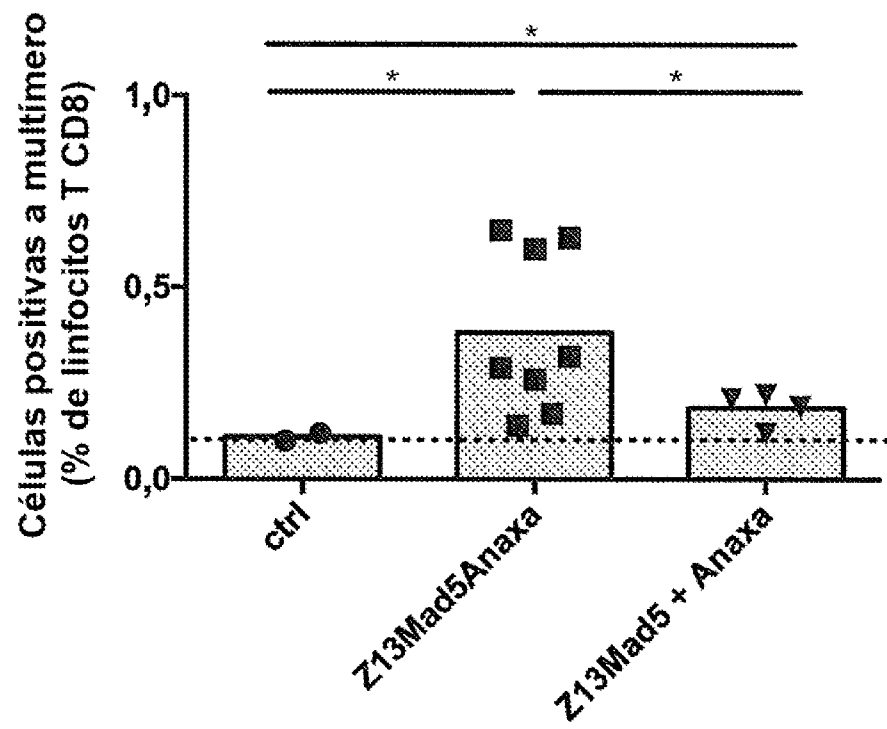


Fig. 53

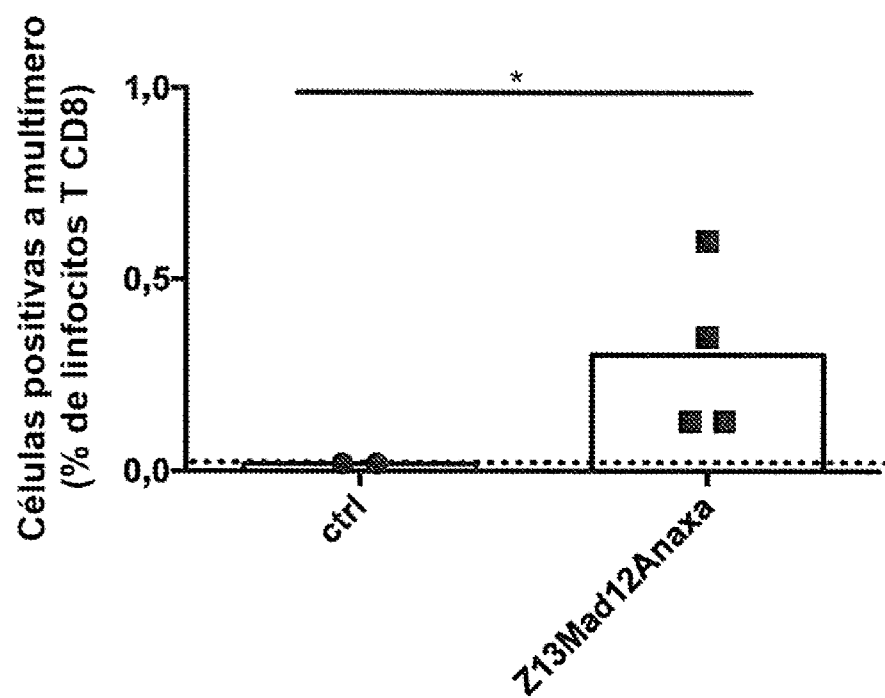


Fig. 54

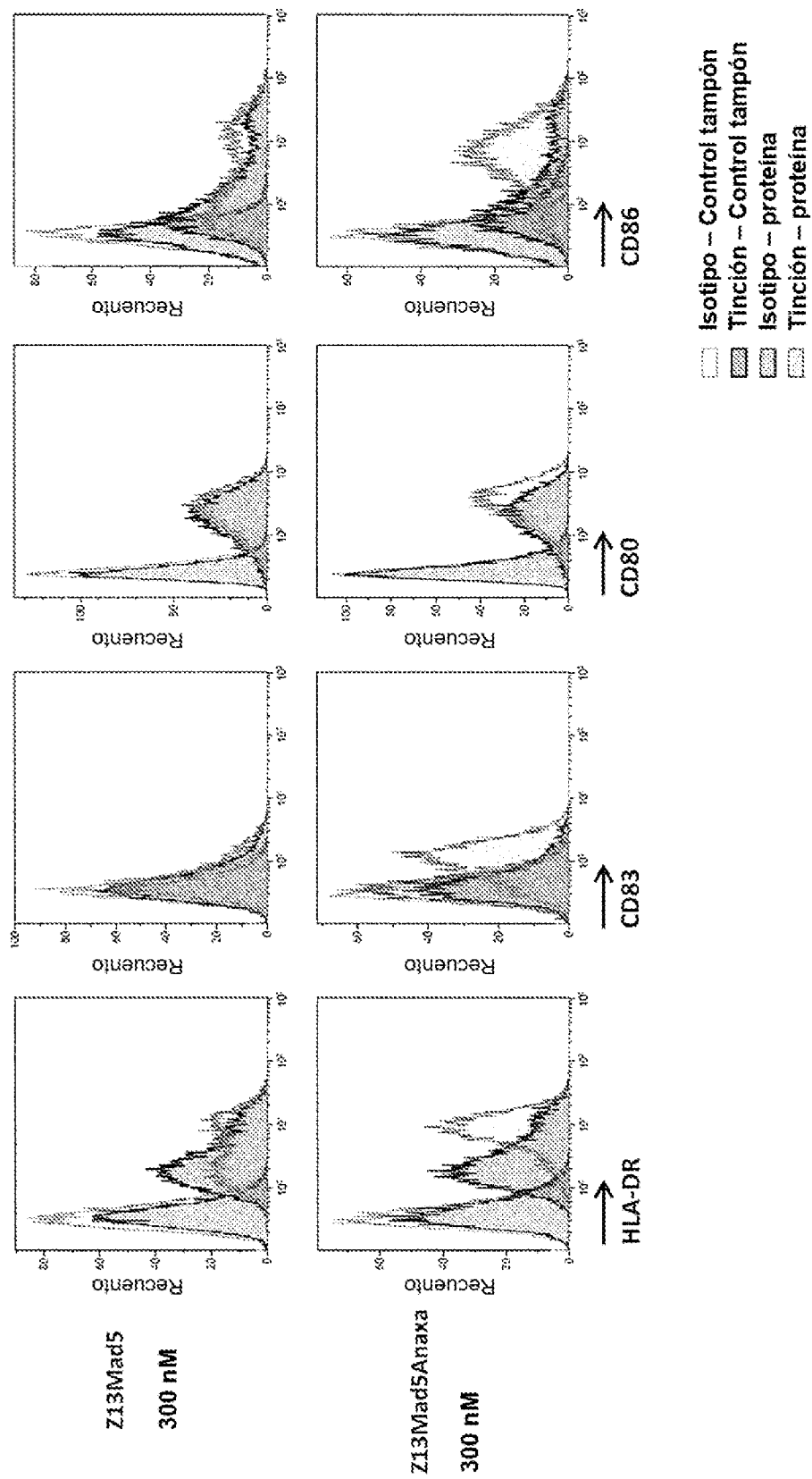


Fig. 55

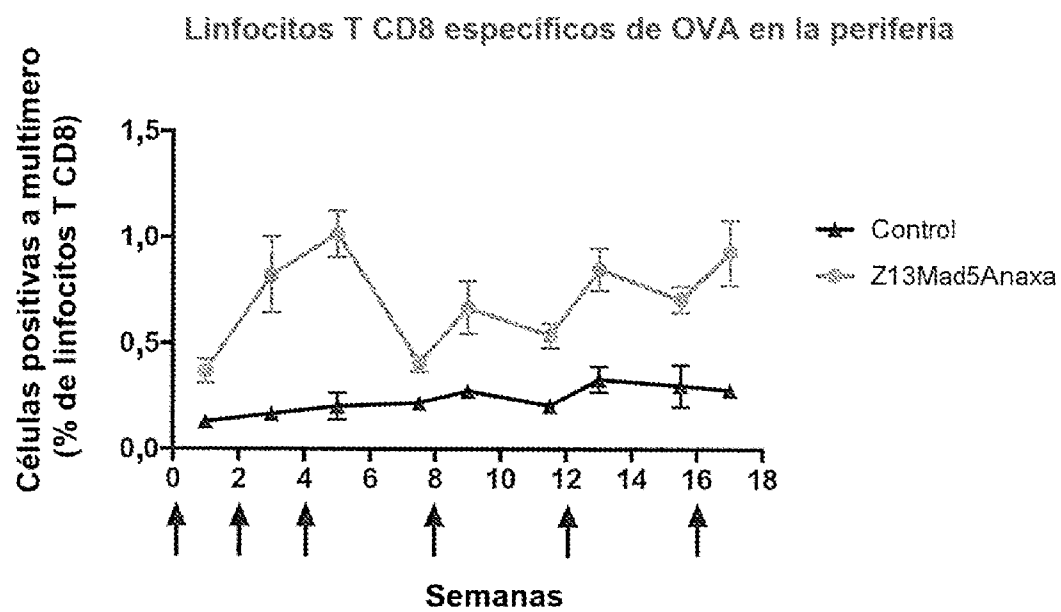
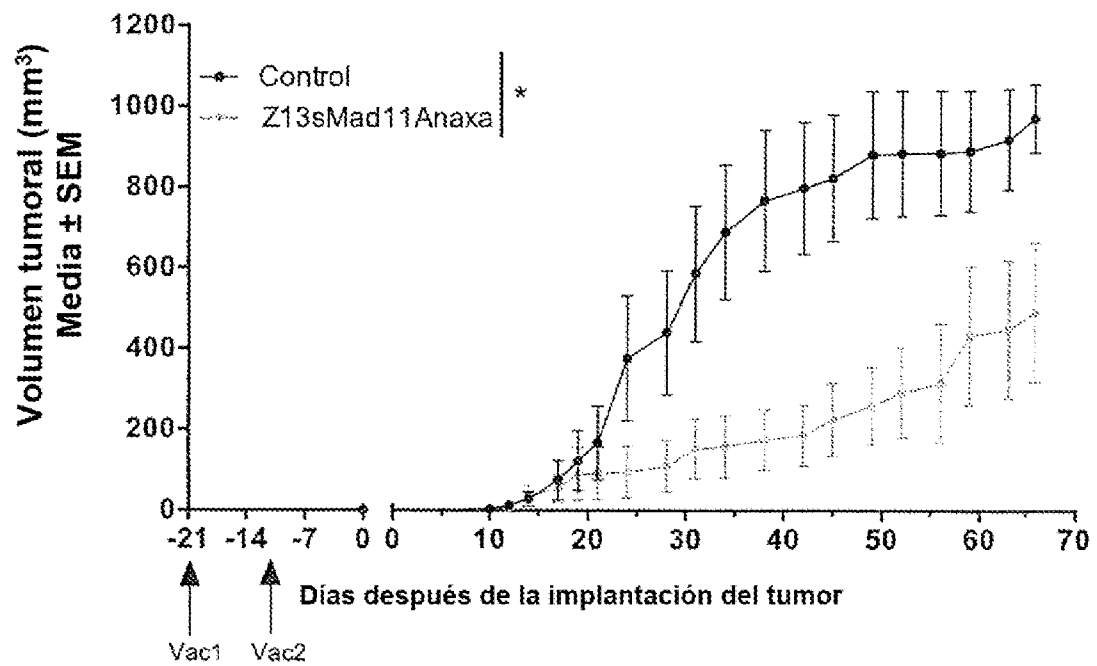


Fig. 56

A



B

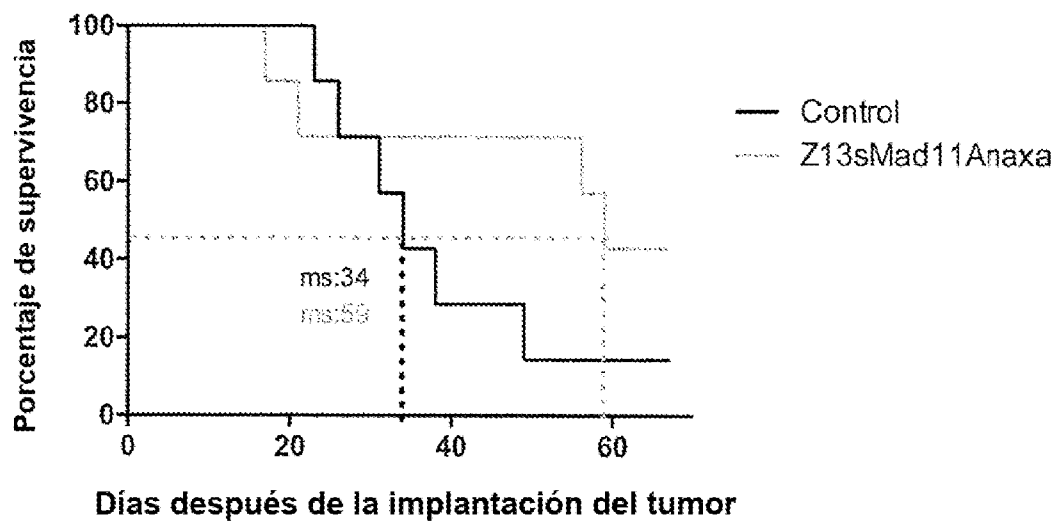


Fig. 57

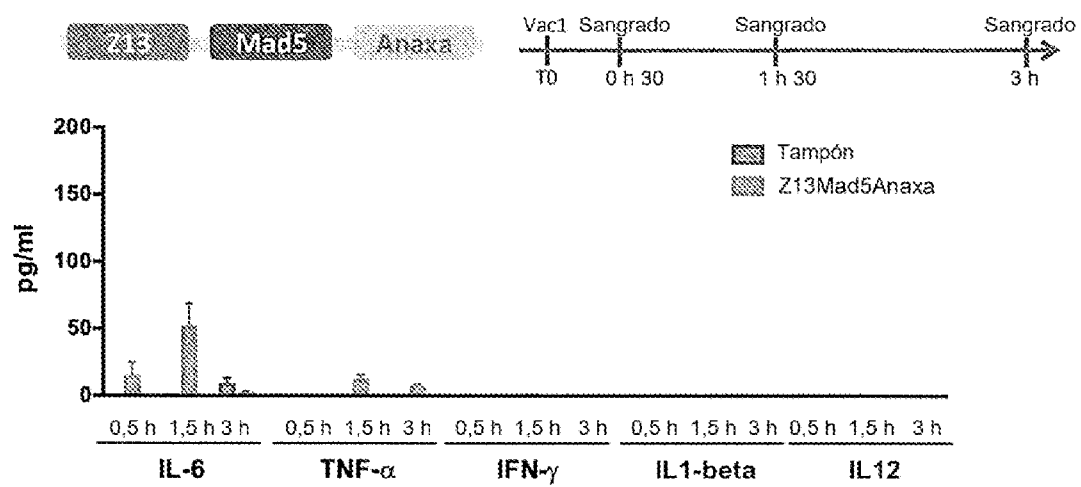


Fig. 58

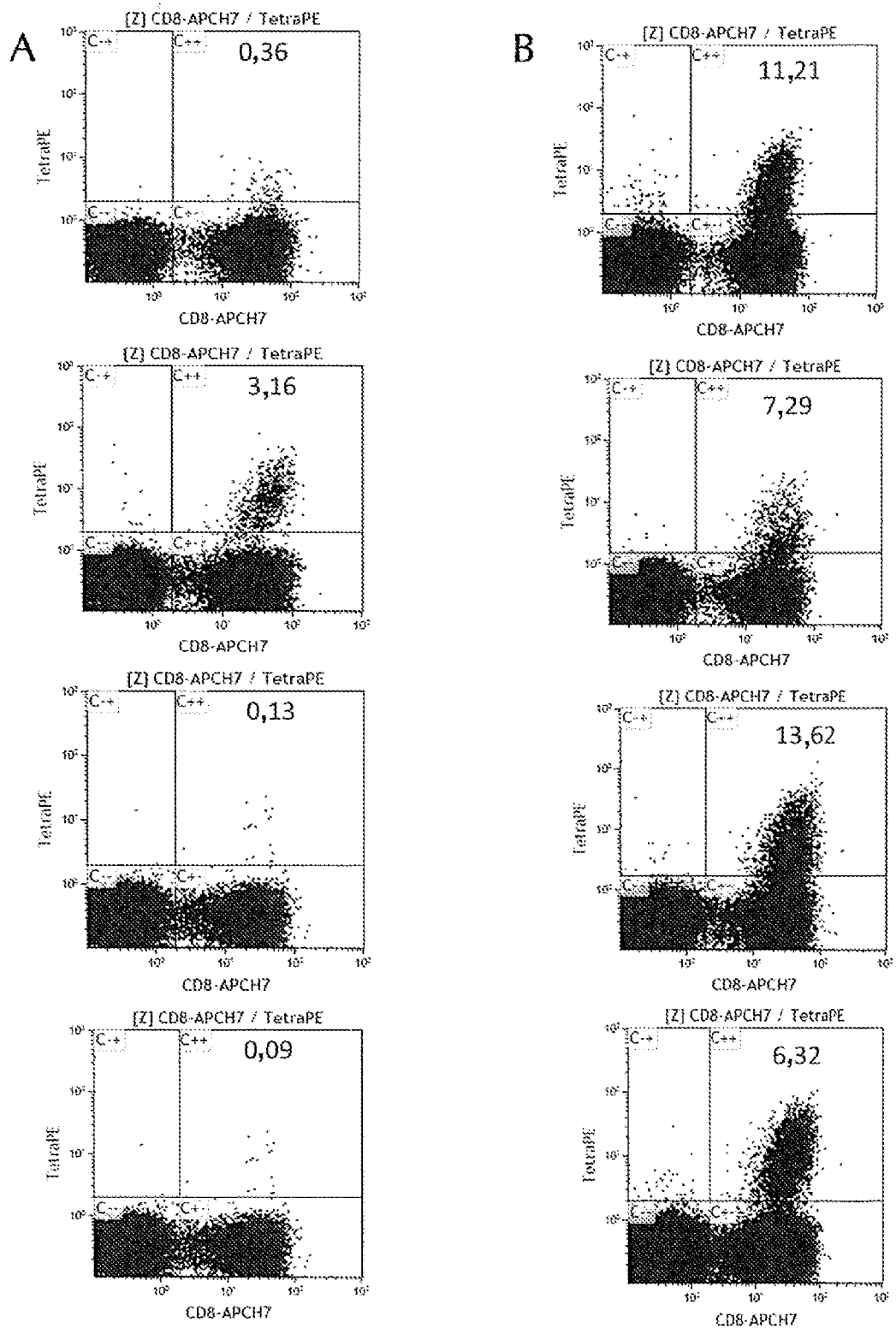


Fig. 59

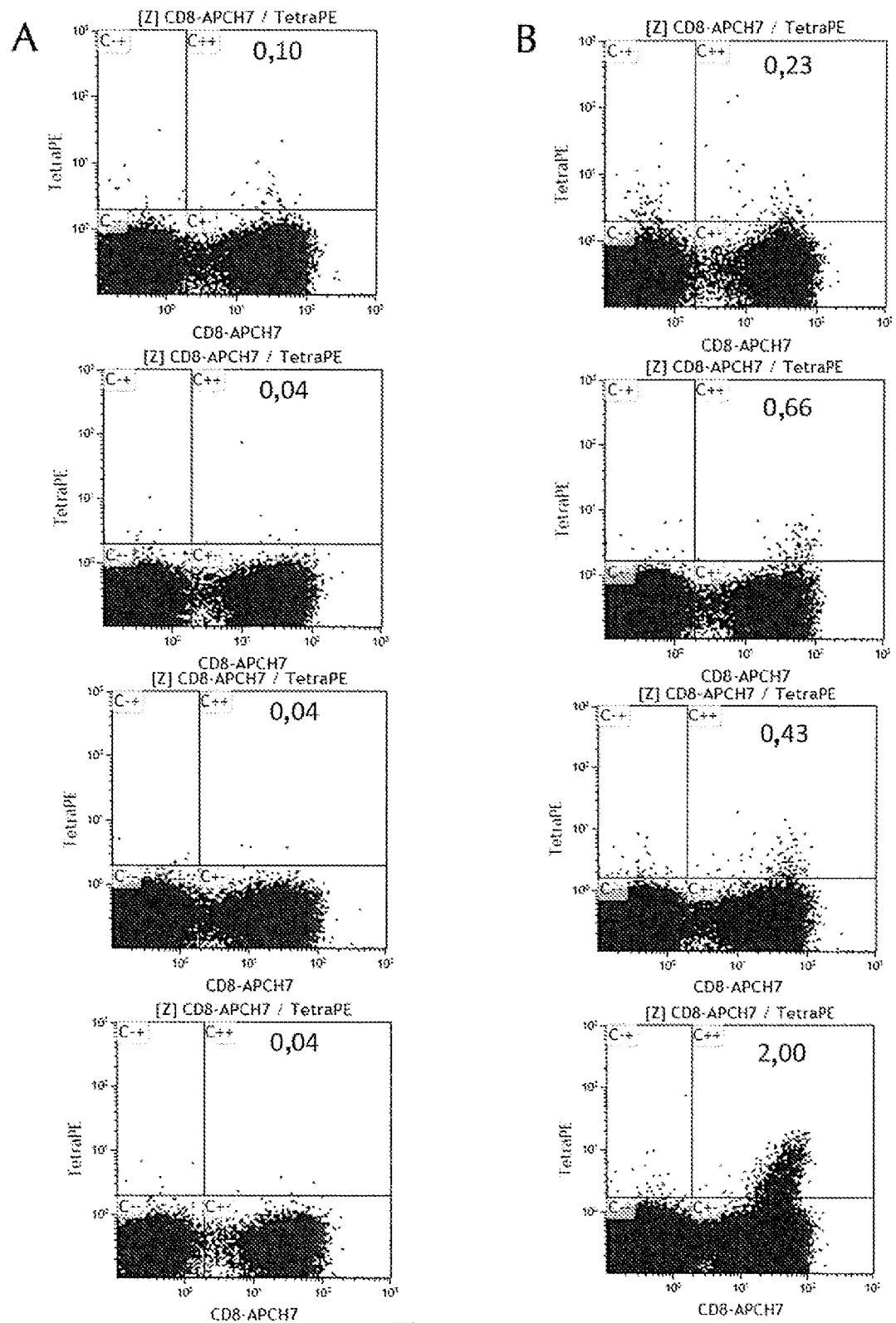
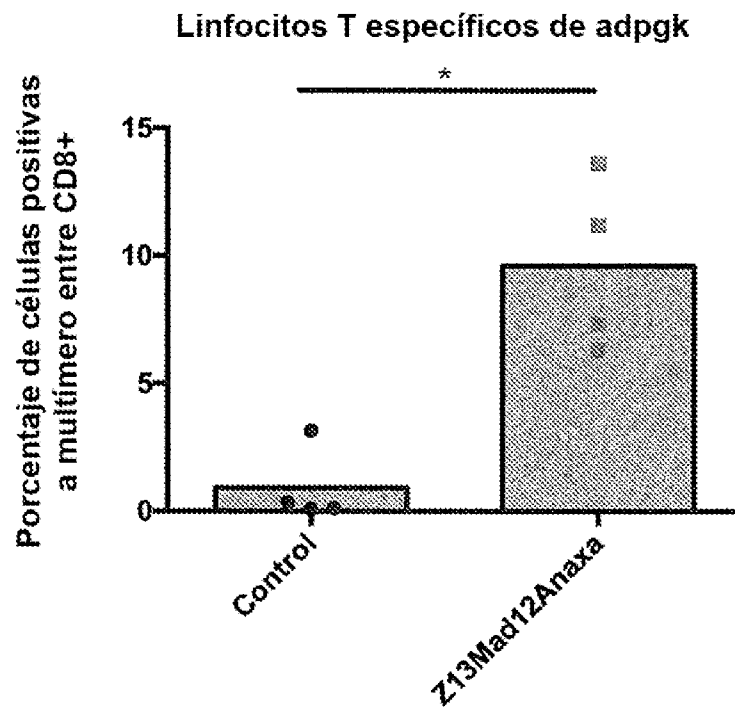


Fig. 60

A



B

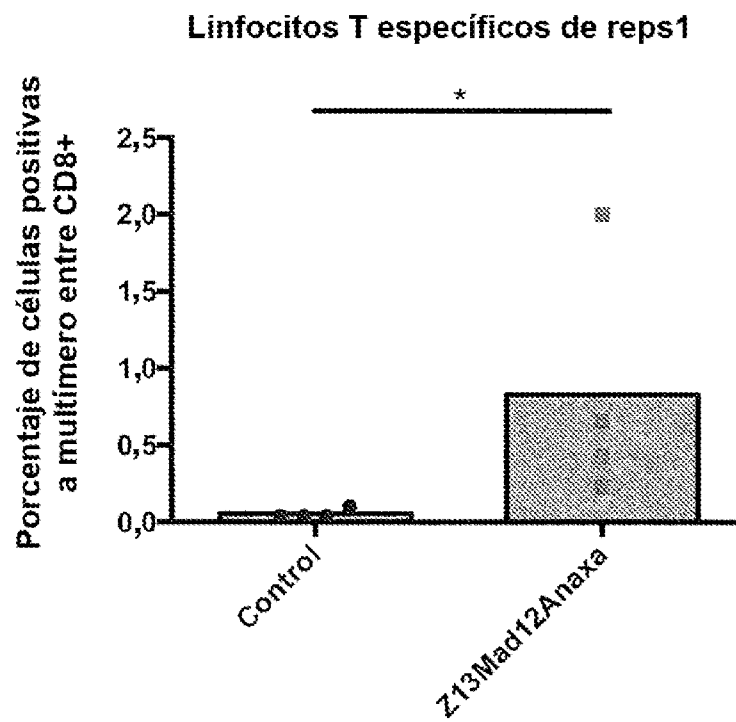


Fig. 61

ATP110

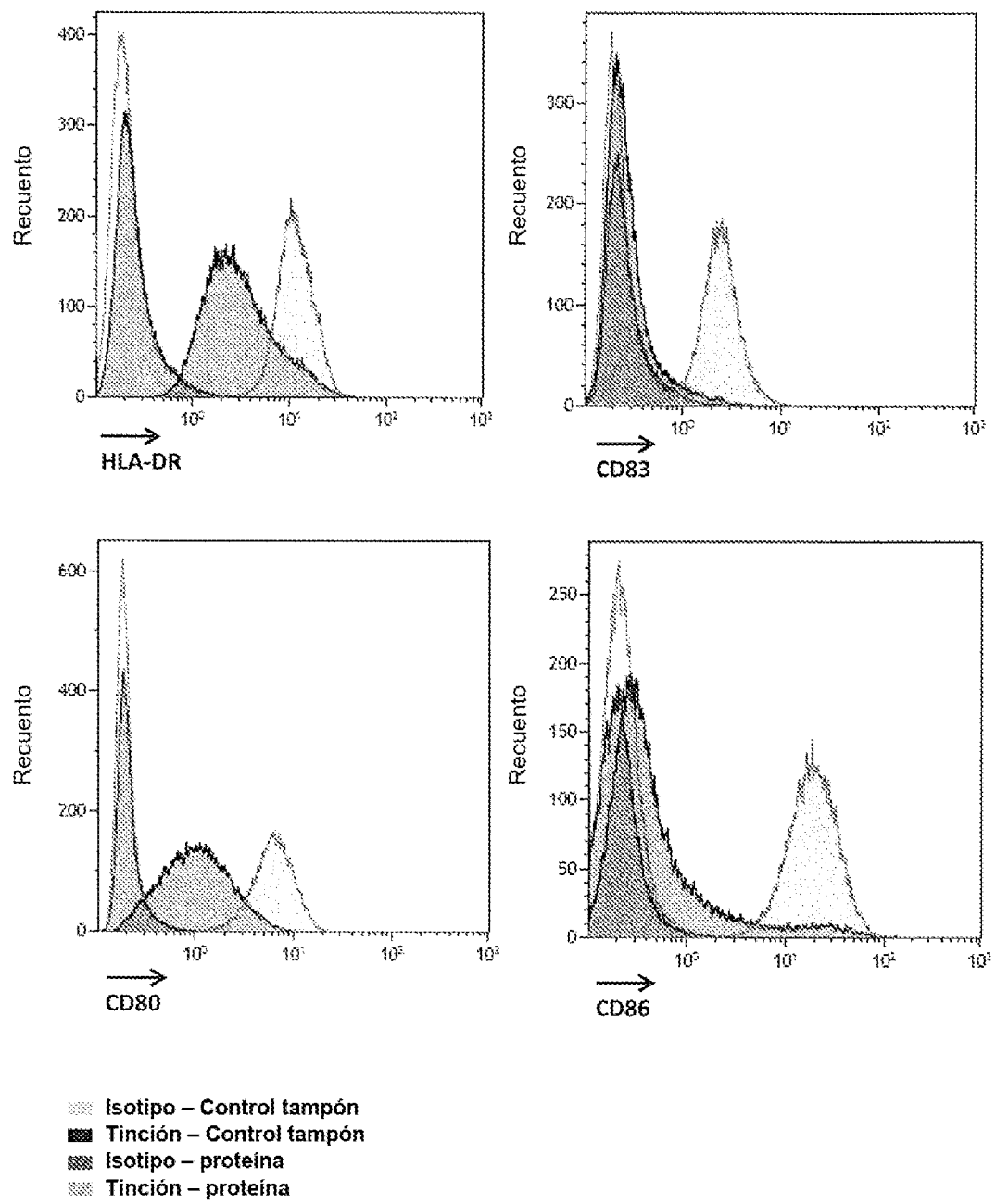


Fig. 62

ATP112

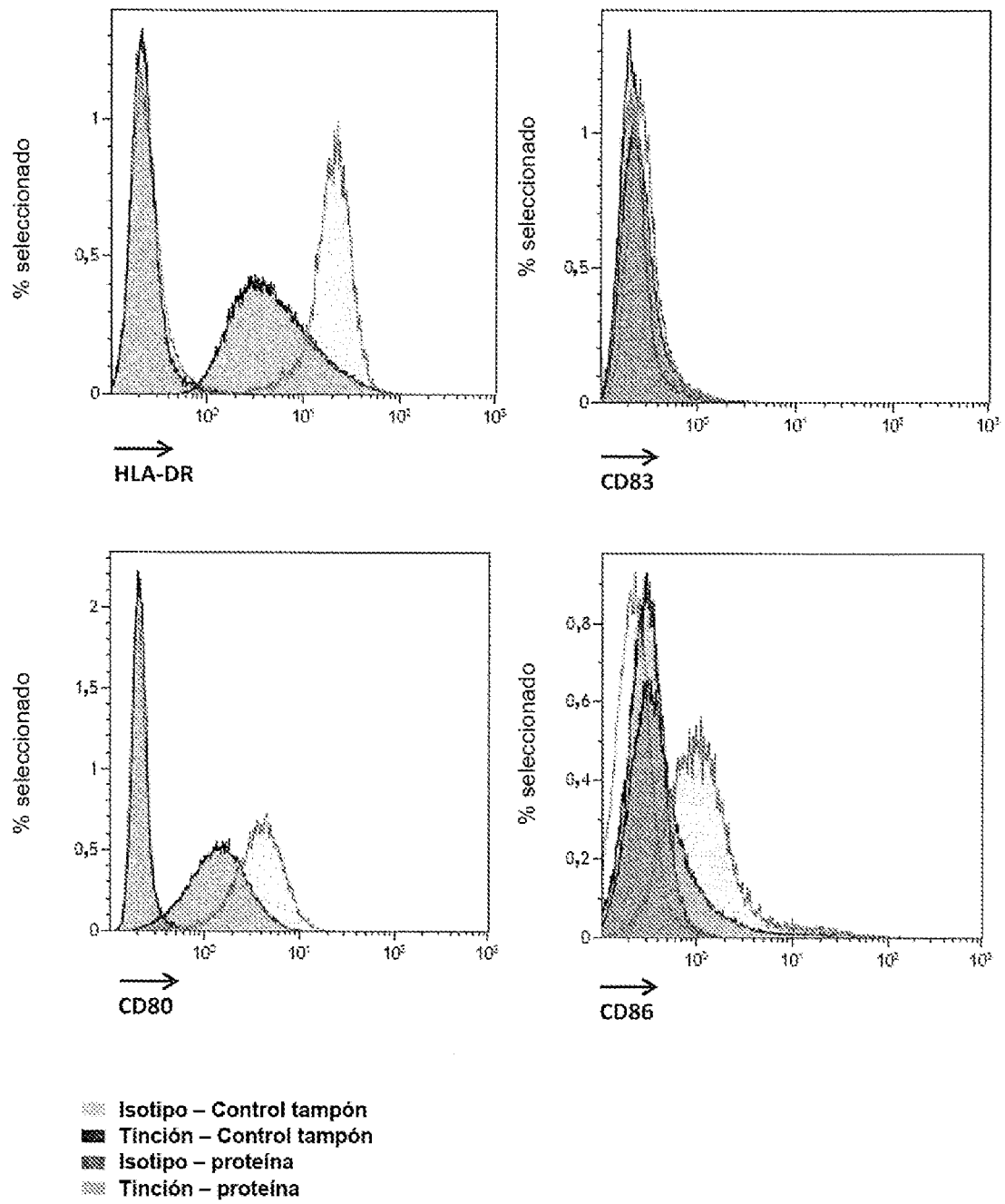


Fig. 63

ATP115

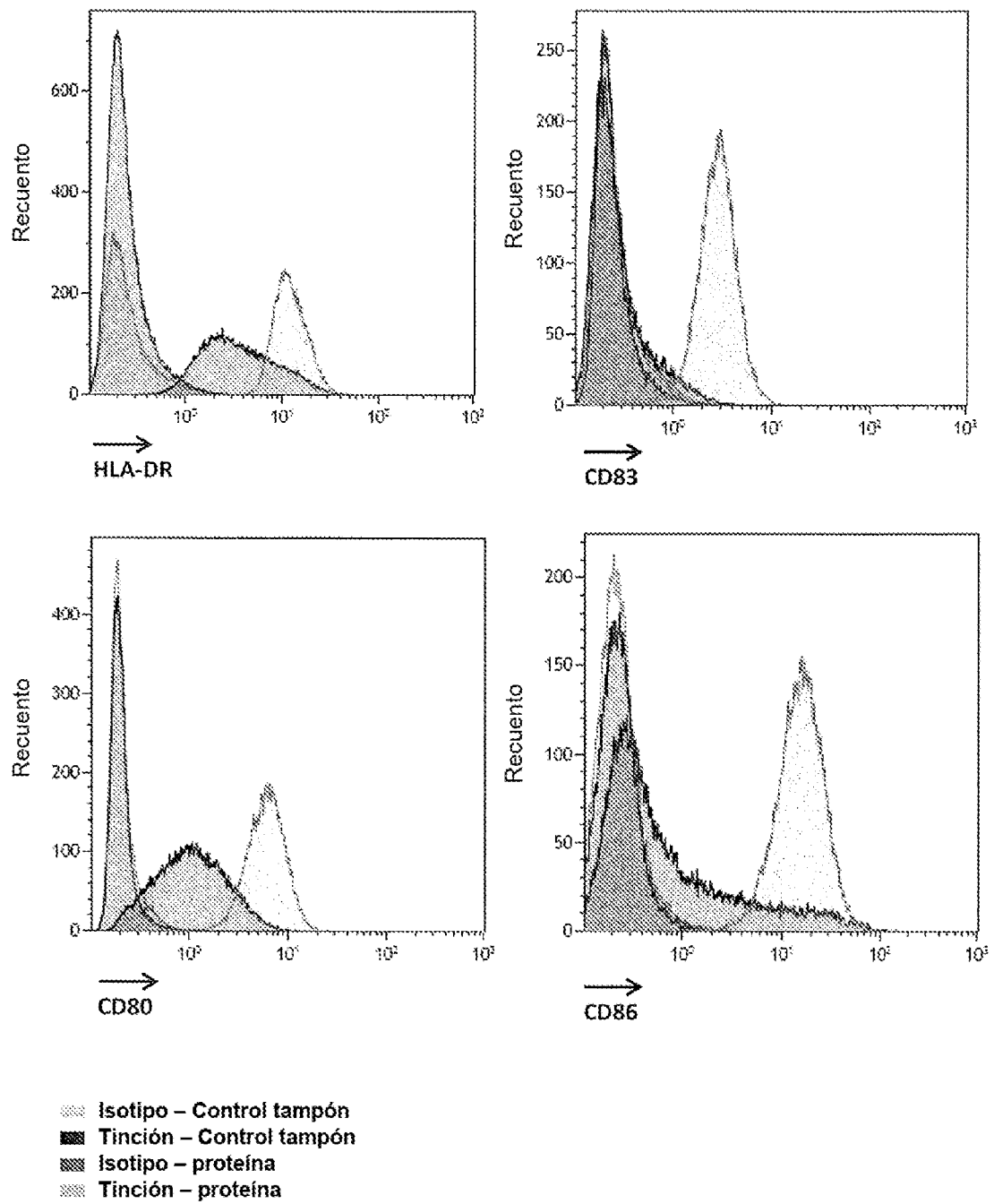


Fig. 64

ATP117

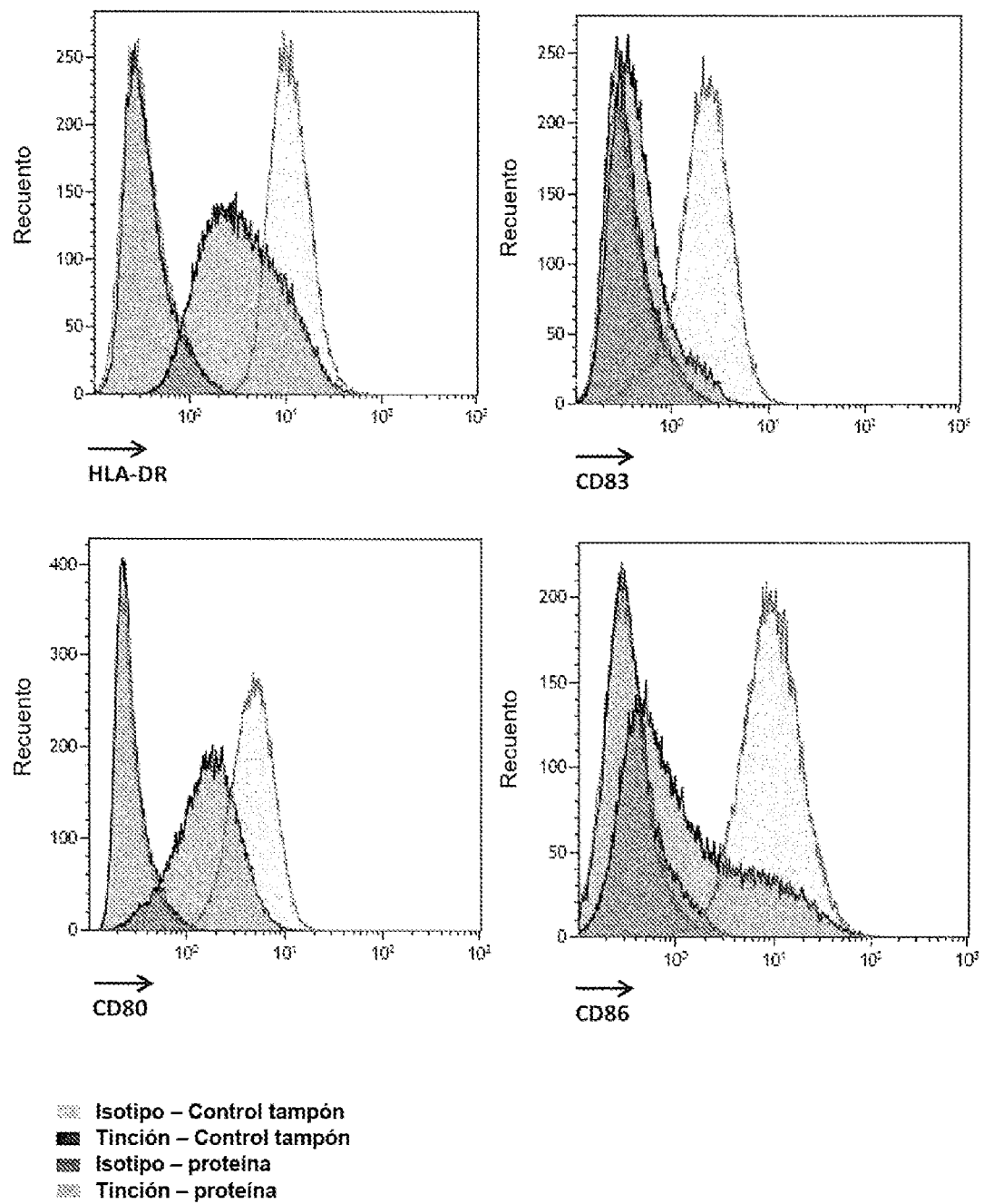


Fig. 65

ATP118

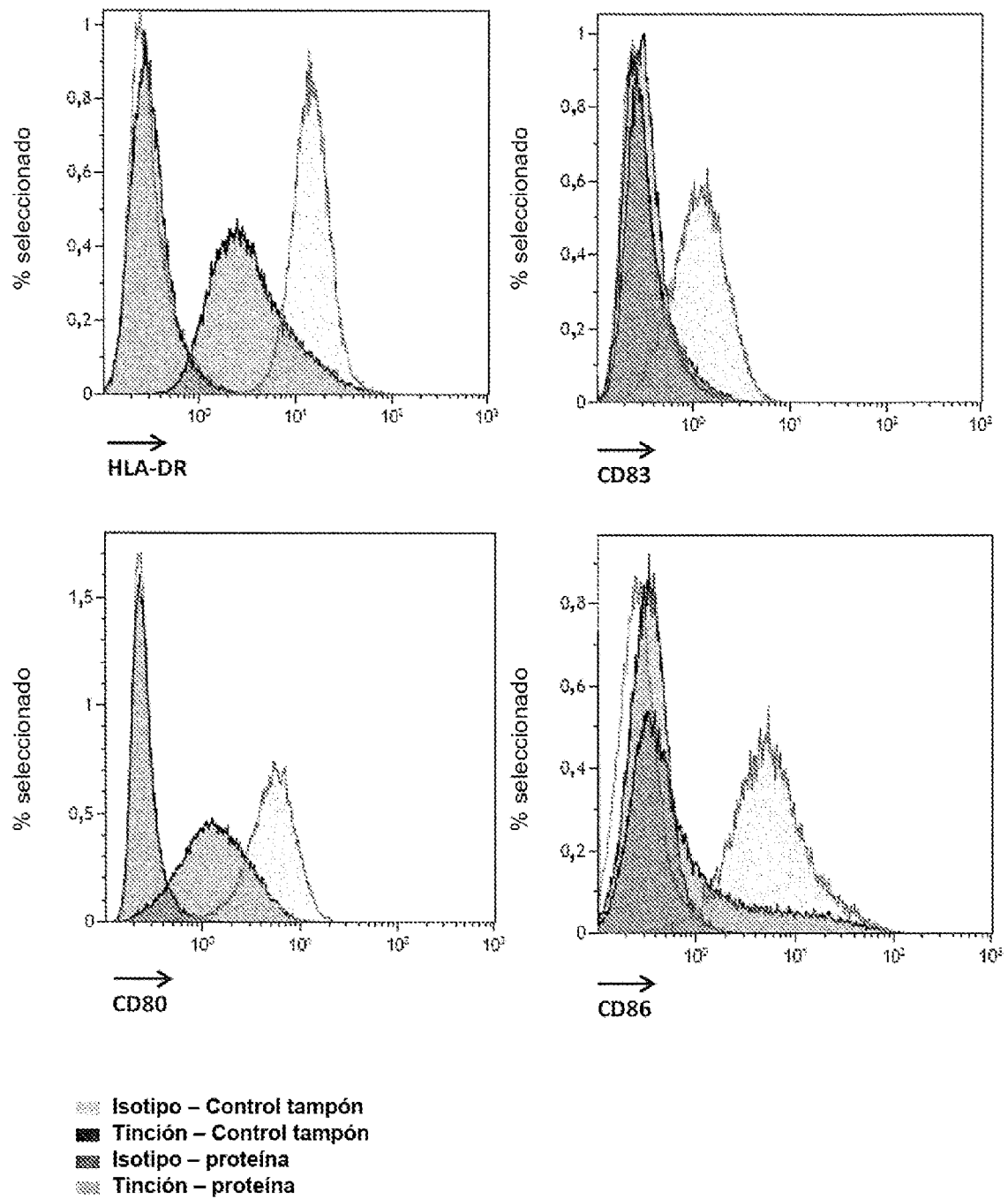


Fig. 66

ATP119

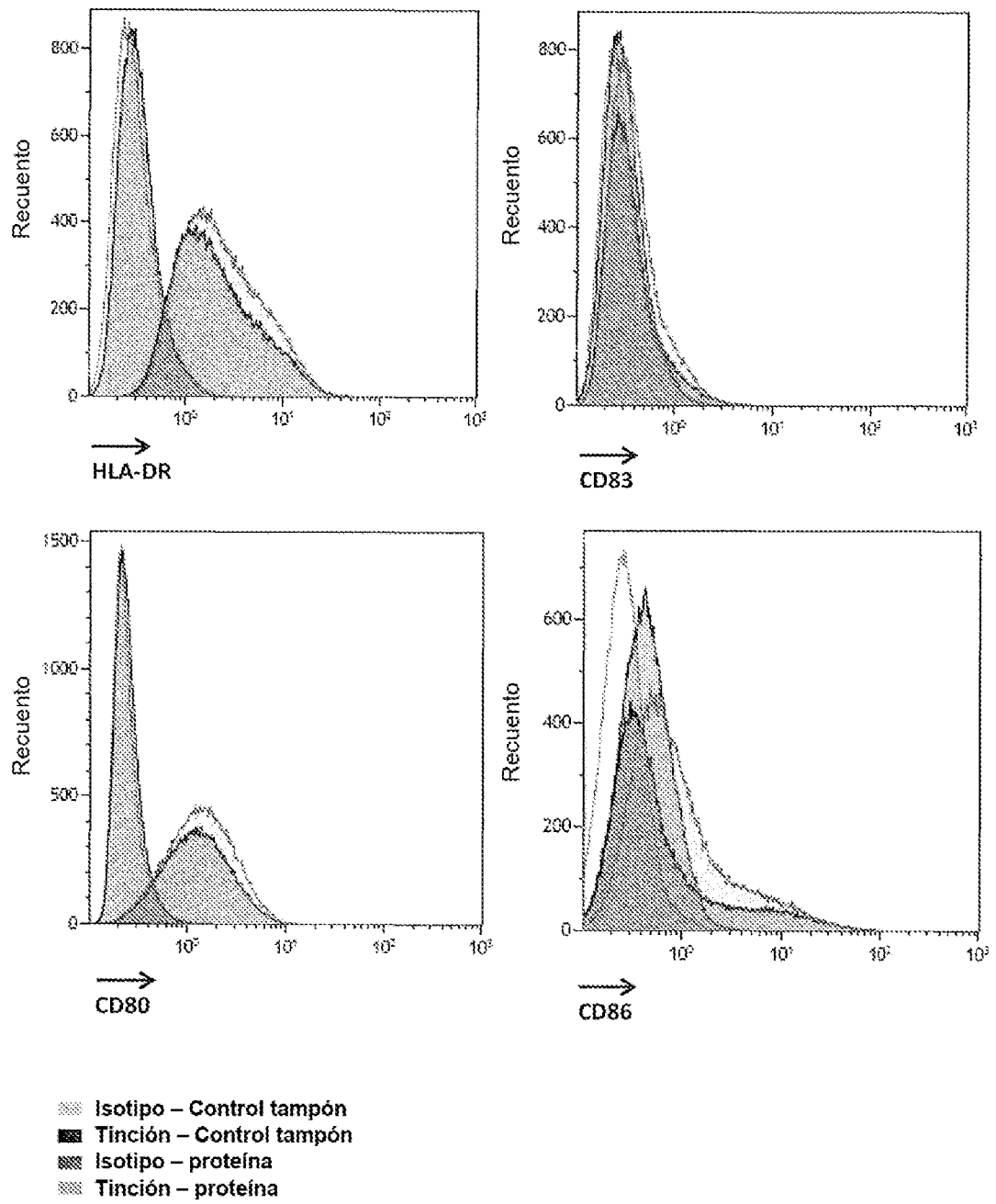


Fig. 67

ATP120

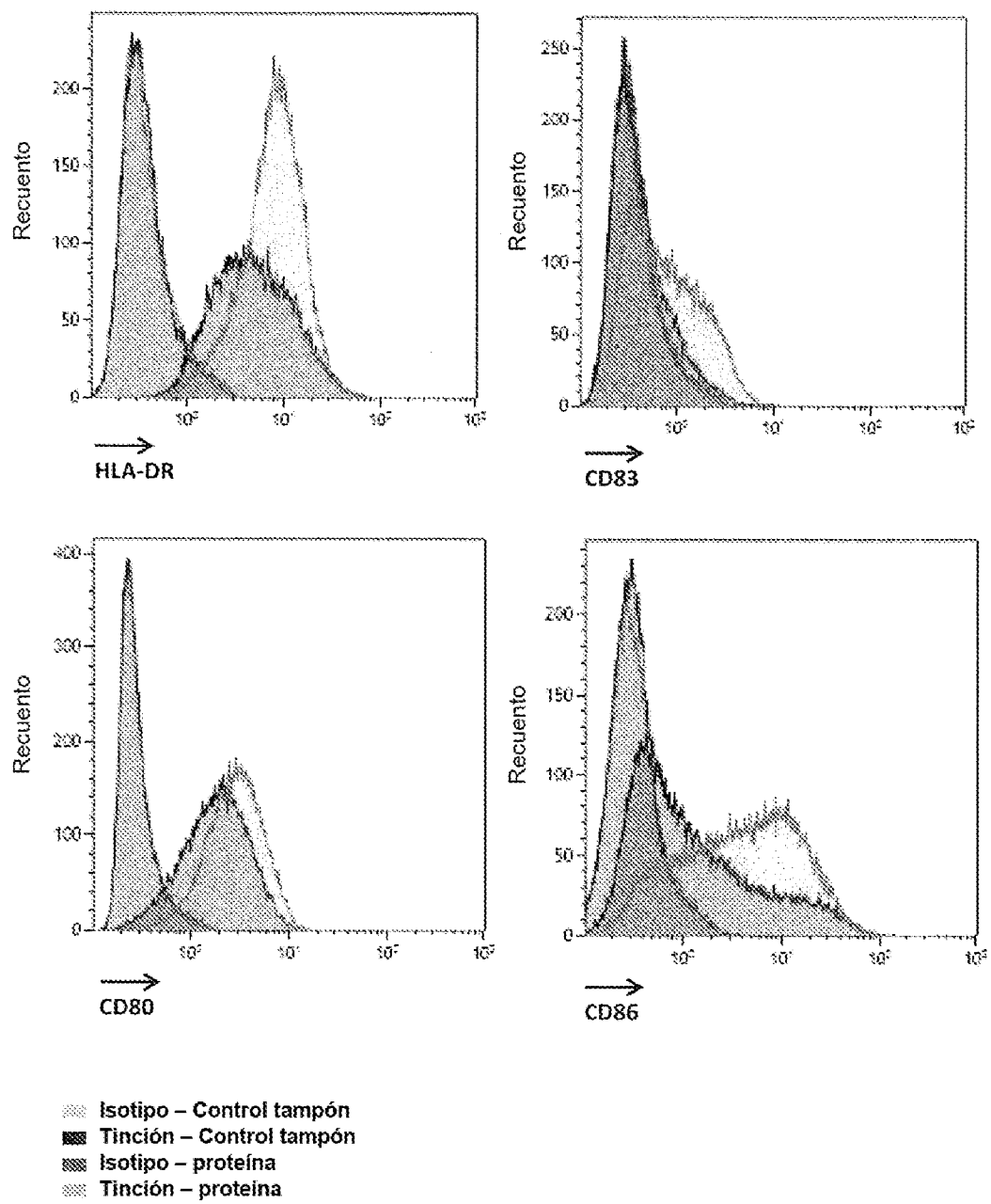


Fig. 68

ATP122

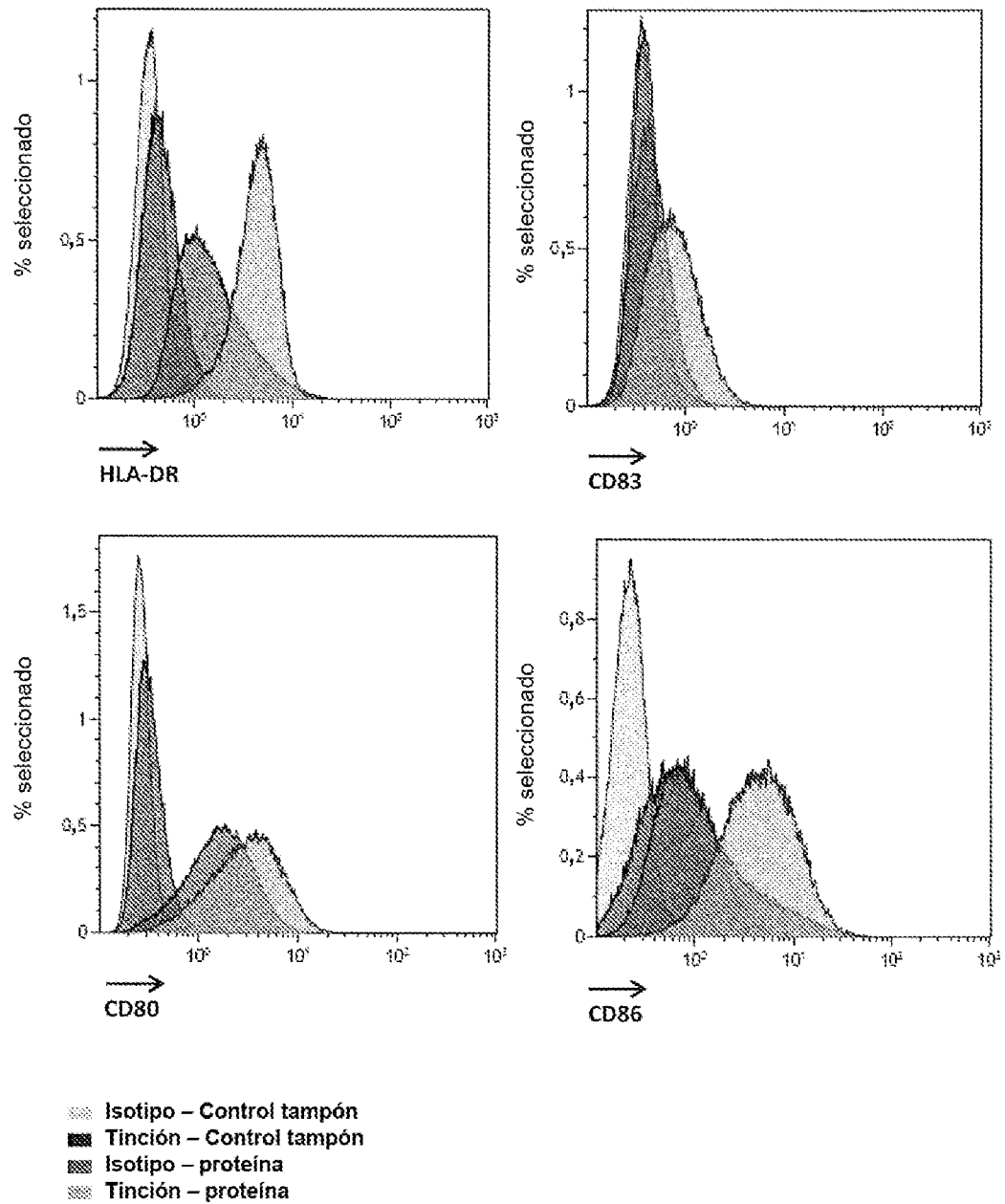


Fig. 69

ATP123

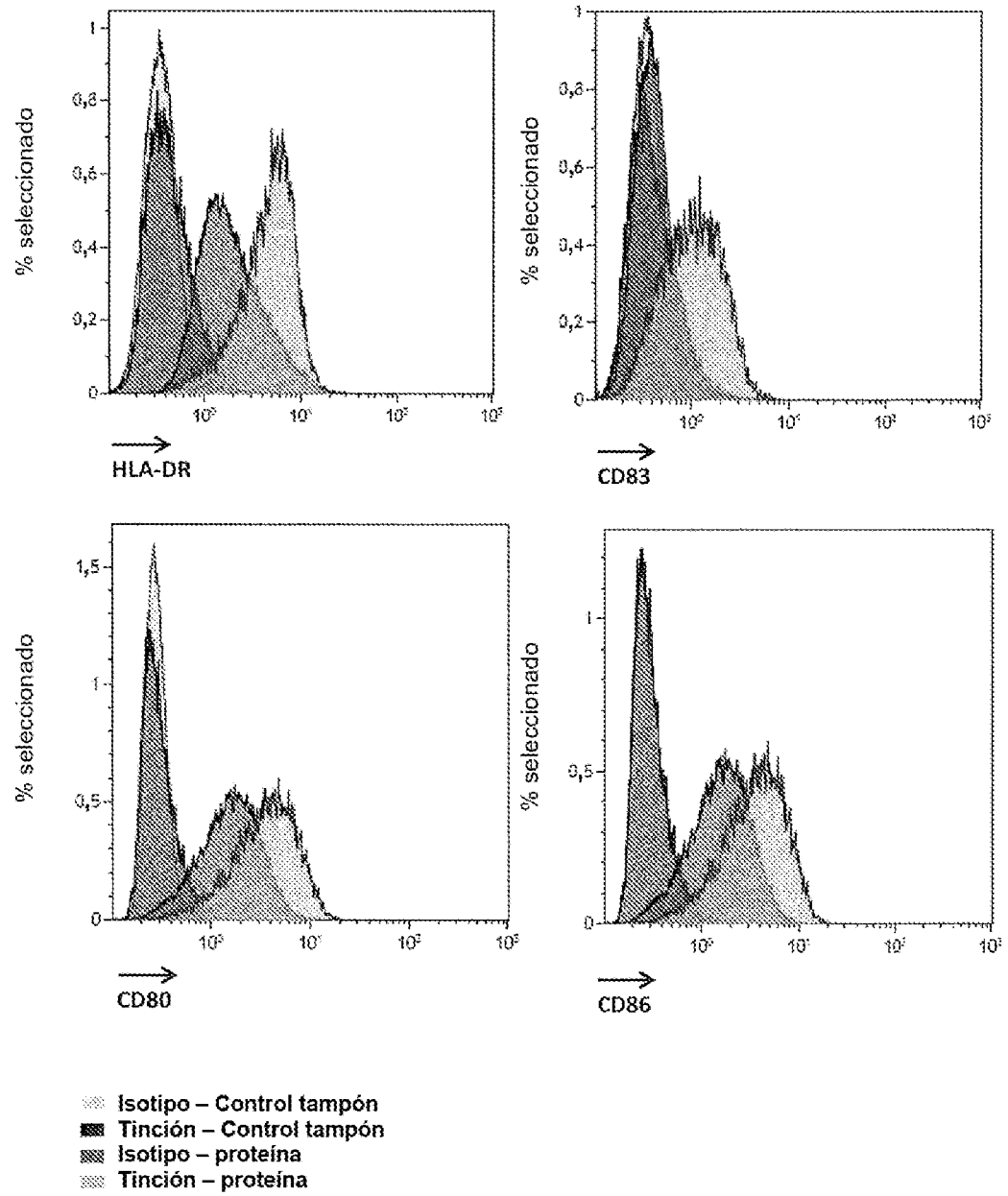


Fig. 70

ATP125

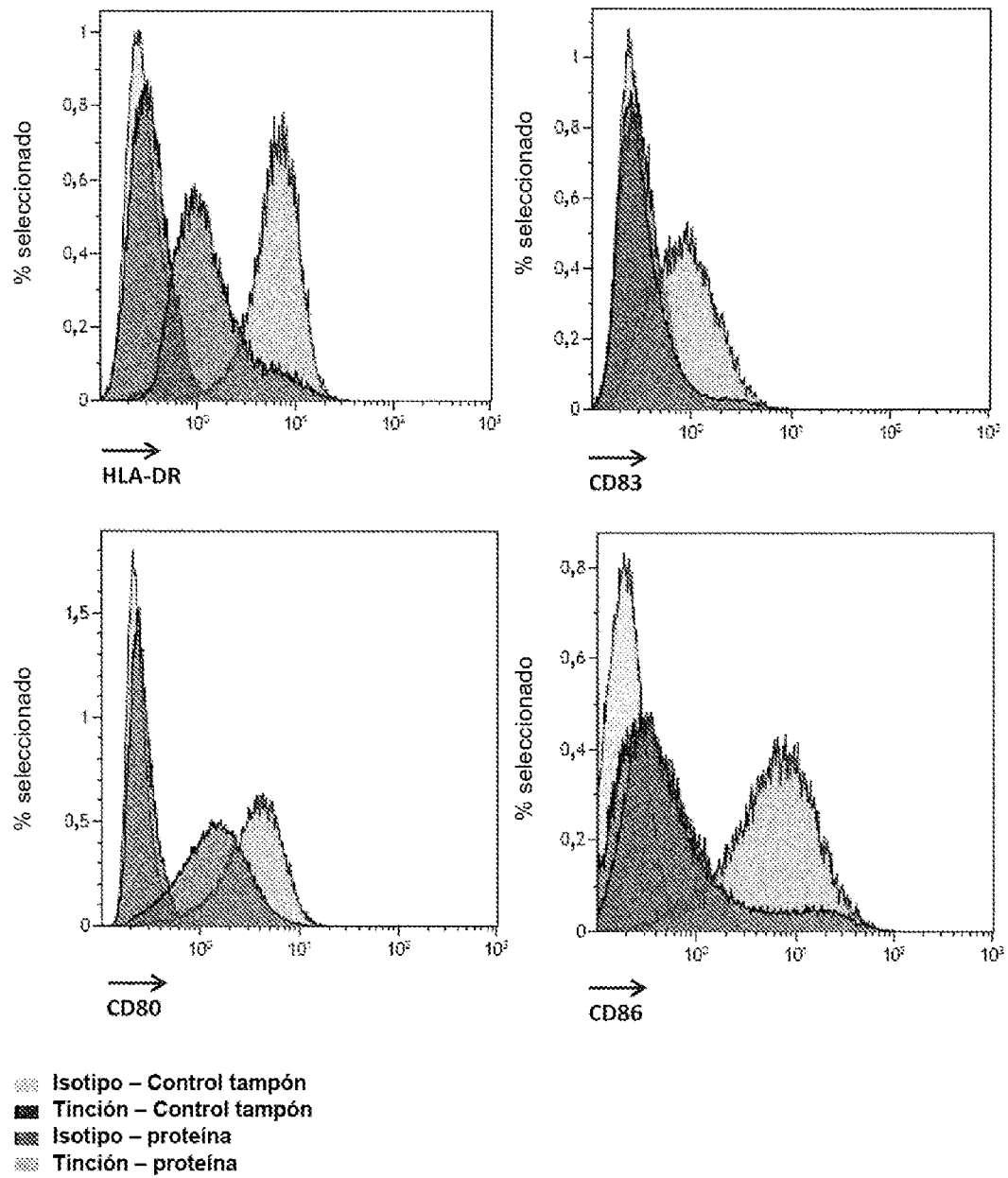
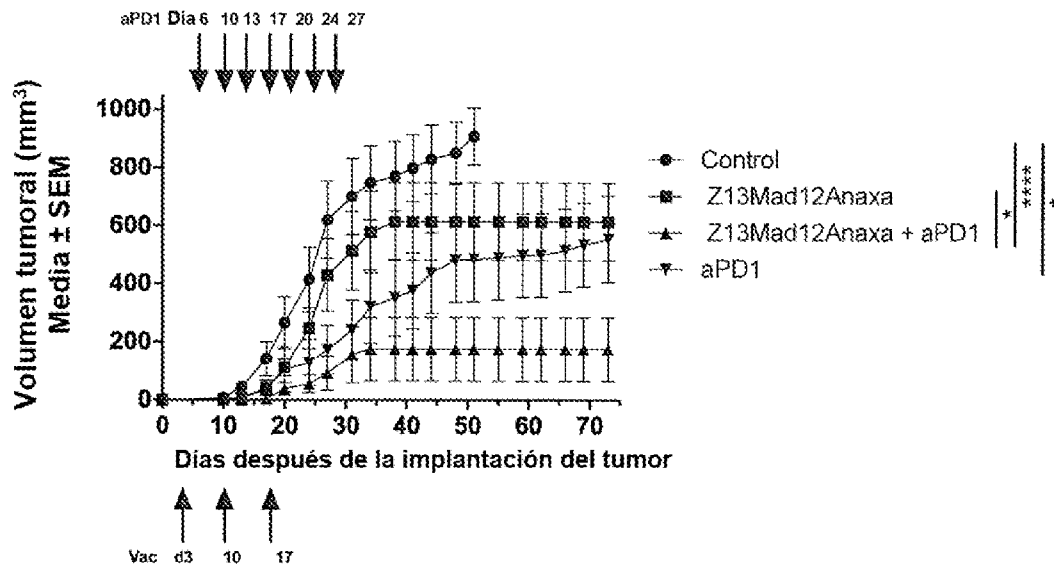


Fig. 71

A



B

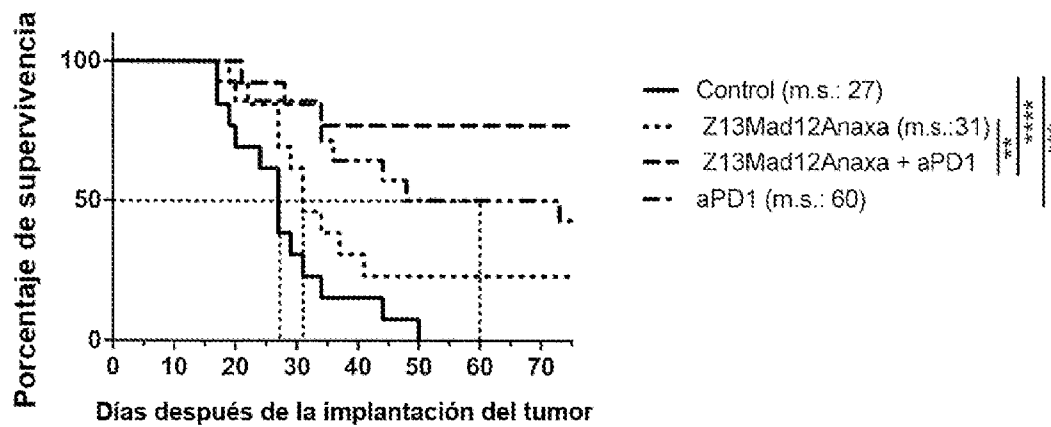


Fig. 72

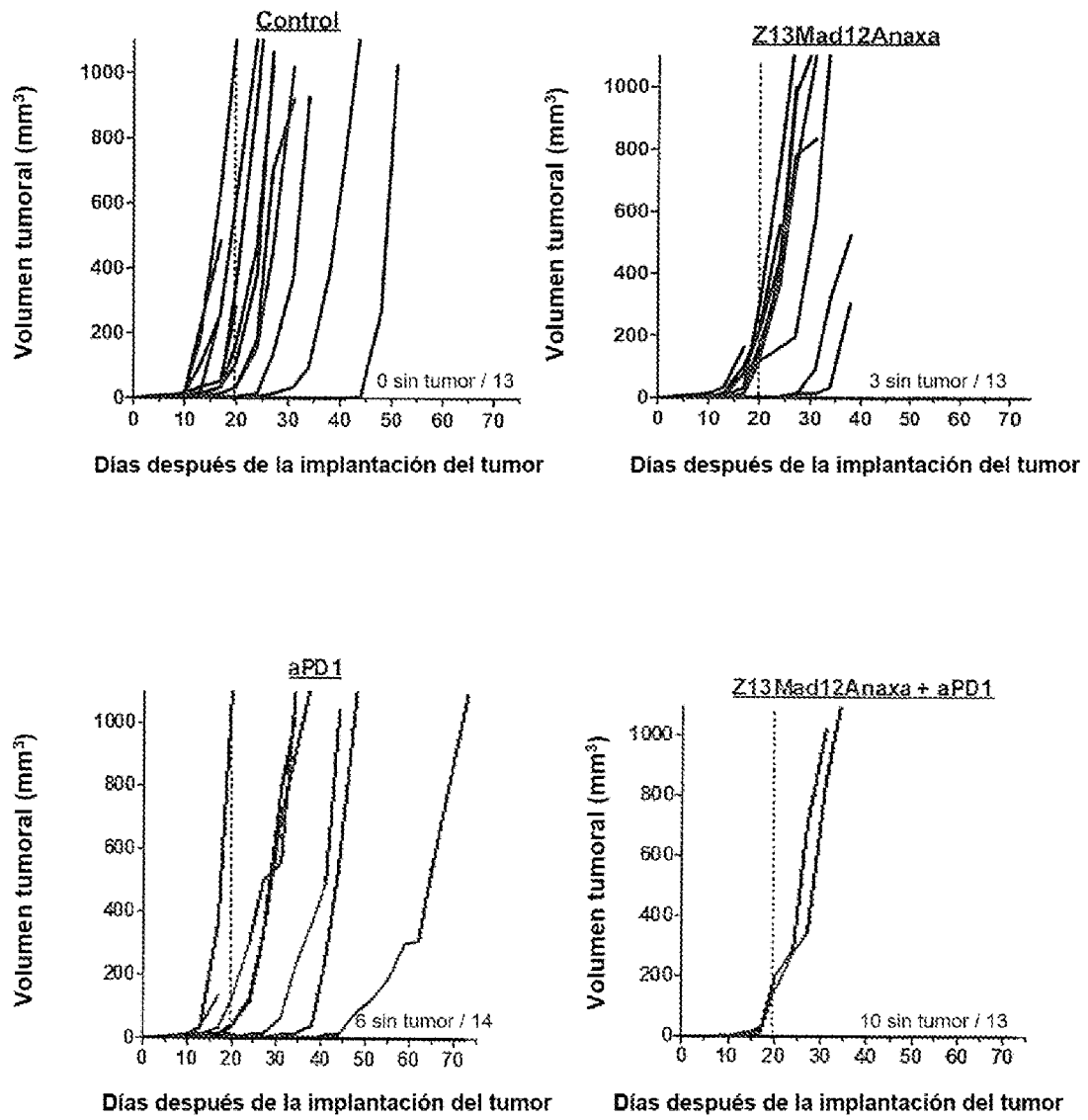


Fig. 73

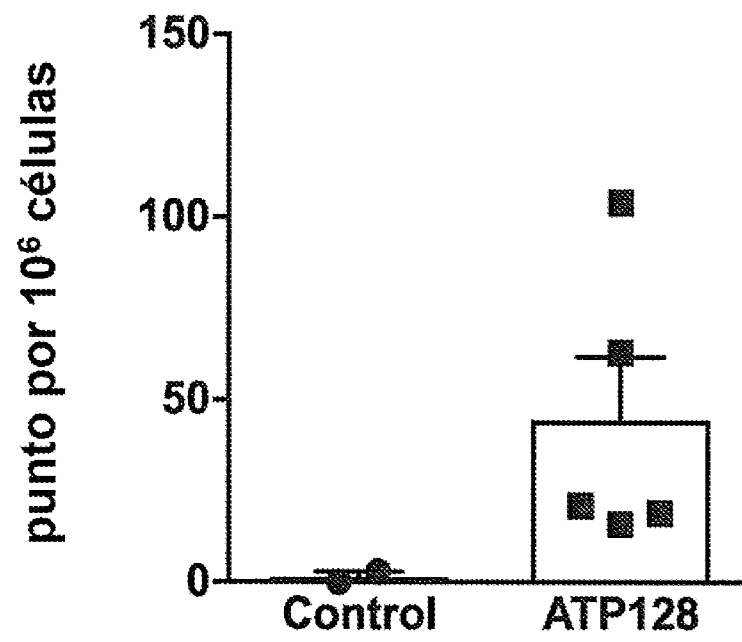


Fig. 74

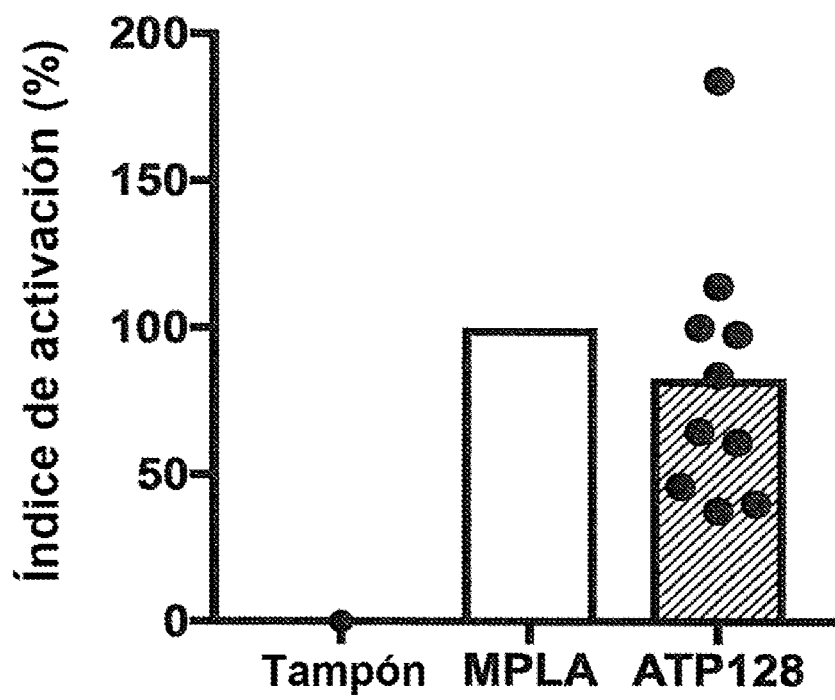
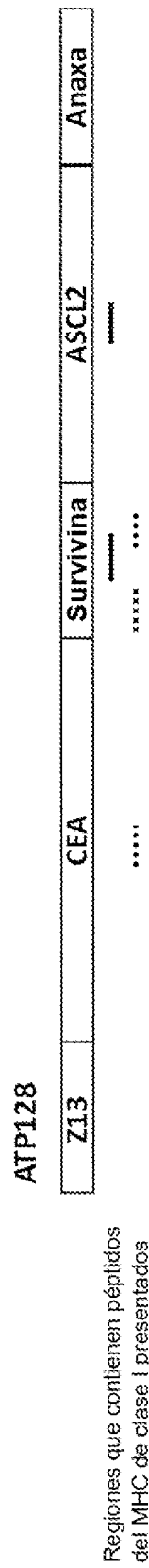


Fig. 75

A



B

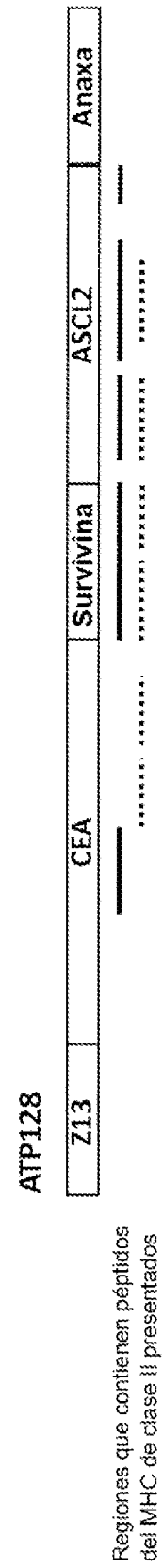


Fig. 76

C

| Donante | Haplotipo del HLA de clase I | CEA | Survivina | ASCL2 |
|---------|--------------------------------------|----------|-----------|-------|
| 9 | A*02:01, A*29:02 B*07:02, B*55:01 | 0 | 1 | 2 |
| 10 | A*02:01, A*31:01 B*35, B*40:05 | <u>1</u> | <u>1</u> | 0 |

| Donante | Haplotipo del HLA de clase II | CEA | Survivina | ASCL2 |
|---------|--|-----|-----------|-------|
| 9 | DRB1*14, DRB1*15 DQB1*05:03, DQB1*06:03 | 6 | 40 | 66 |
| 10 | DRB1*08:02, DRB1*14:02 DQB1*03:01, DQB1*03:01 | 2 | 8 | 27 |

Fig. 76 continuación