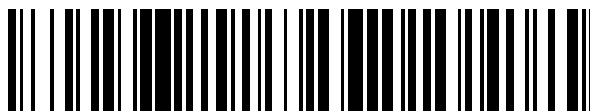


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 429**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2004 E 09154734 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2087904**

54 Título: **Uso terapéutico de péptidos derivados de la proteína Bcl-XL en pacientes con cáncer**

30 Prioridad:

19.11.2003 DK 200301716
19.11.2003 US 523119 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.01.2014

73 Titular/es:

SURVAC APS (100.0%)
ESTHERSVEJ 27, ST. TV.
2900 HELLERUP, DK

72 Inventor/es:

STRATEN, EIVIND PER THOR y
ANDERSEN, MADS HALD

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 436 429 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

Uso terapéutico de péptidos derivados de la proteína Bcl-XL en pacientes con cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al campo del tratamiento y la profilaxis contra el cáncer. En particular, se proporcionan proteínas reguladoras de la apoptosis aisladas o fragmentos peptídicos de las mismas que pueden provocar respuestas inmunitarias contra el cáncer. Específicamente, se proporciona el uso de tales proteínas que pertenecen a la familia de proteínas Bcl-2 y fragmentos peptídicos inmunogénicos de las mismas en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento contra el cáncer.

Antecedentes técnicos y técnica anterior

10 El desarrollo de resistencia de las células cancerosas a una amplia variedad de agentes quimioterápicos representa un obstáculo principal en el tratamiento satisfactorio del cáncer. Se observa resistencia a fármacos en una amplia gama de tipos de células cancerosas. Muchos mecanismos contribuyen a la resistencia a fármacos, incluyendo inactivación del fármaco, extrusión del fármaco por bombas de la membrana celular, mutaciones de dianas farmacológicas y fallo para iniciar la apoptosis. La prevención de la apoptosis puede resultar de una variedad de estados, incluyendo la retención del potencial de membrana mitocondrial y la estimulación de citocinas.

15 La búsqueda de proteínas responsables de los fenotipos resistentes a fármacos ha implicado a la molécula antiapoptótica Bcl-2. La sobreexpresión de Bcl-2 desempeña un papel en el desarrollo de la resistencia a fármacos en la leucemia y otros tumores propensos a la apoptosis y, por consiguiente, un mal pronóstico en diversos cánceres en seres humanos. Bcl-2 pertenece a una familia de proteínas, la familia Bcl-2, cuyos miembros regulan la apoptosis. La familia incluye miembros tanto proapoptóticos como antiapoptóticos. Aunque sigue siendo difícil de alcanzar un entendimiento preciso de cómo Bcl-2 ejerce sus efectos antiapoptóticos, se ha descubierto que se sobreexpresa en muchos cánceres incluyendo cánceres de pulmón, colorrectal, de próstata y de mama así como en leucemias y linfomas.

20 Por tanto, Bcl-2 es un factor celular crítico, ya que el aumento de los niveles de expresión de esa proteína confiere resistencia a estímulos apoptóticos, contribuyendo de ese modo a la patogenia y progresión del cáncer.

25 El proceso mediante el cual el sistema inmunitario de los mamíferos reconoce y reacciona frente a materiales extraños o ajenos es complejo. Una faceta importante del sistema es la respuesta de células T. Esta respuesta requiere que las células T reconozcan e interaccionen con complejos de moléculas de la superficie celular denominadas antígenos leucocitarios humanos (HLA) que constituyen el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) humano, y péptidos. Los péptidos se derivan de moléculas más grandes, que se procesan por las células, que a su vez presentan la molécula de HLA/CMH. La interacción de las células T y los complejos de HLA/péptido está restringida, requiriendo una célula T que es específica para una combinación particular de una molécula de HLA y un péptido. Si no está presente una célula T específica, no existe ninguna respuesta de células T incluso si está presente su complejo asociado. De manera similar, no existe ninguna respuesta si el complejo específico está ausente, pero la célula T está presente.

30 El mecanismo por el que las células T reconocen anomalías celulares se ha implicado también en el cáncer. Por ejemplo, en el documento WO92/20356, se da a conocer una familia de genes que se procesan para dar péptidos que, a su vez, se expresan sobre superficies celulares, y pueden conducir a la lisis de las células tumorales mediante CTL específicos. Estos genes se denominan la familia MAGE y se dice que codifican para "precursores de antígenos de rechazo de tumores" o moléculas "TRAP", y los péptidos derivados de los mismos se denominan "antígenos de rechazo de tumores" o "TRA".

35 En el documento WO 94/05304, se dan a conocer nonapéptidos que se unen a la molécula HLA-A1. Esta referencia da a conocer que, dada la especificidad conocida de péptidos particulares por moléculas de HLA particulares, debería esperarse que un péptido particular se una a una molécula de HLA, pero no a otras. Esto es significativo, ya que individuos diferentes presentan fenotipos de HLA diferentes. Como resultado, mientras que la identificación de un péptido particular como una pareja para una molécula de HLA específica tiene repercusiones diagnósticas y terapéuticas, éstas son sólo relevantes para individuos con ese fenotipo de HLA particular.

40 En el documento WO 98/58541, se dan a conocer péptidos de 5-17 aminoácidos de longitud que inhiben la unión del citocromo C a un miembro antiapoptótico de la familia relacionada con Bcl-2 inhibiendo de ese modo la apoptosis.

45 Por tanto, está bien establecido que los epítomos peptídicos derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) pueden ser reconocidos como antígenos por los linfocitos T citotóxicos (CTL) en el contexto de moléculas de CMH. Sin embargo, aunque generalmente se acepta que la mayoría si no todos los tumores son antigénicos, sólo algunos son de hecho inmunogénicos en el sentido de que la progresión tumoral se controla fácilmente por el sistema inmunitario.

50 Para vencer esta limitación, se han iniciado varios estudios inmunoterapéuticos, por ejemplo vacunaciones con

péptidos derivados de TAA. Para el melanoma, el tumor para el que se ha caracterizado el mayor número de TAA definidos por CTL, se han inducido respuestas de CTL potentes frente a antígenos mediante vacunación, y algunos pacientes experimentaron una remisión completa de su enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los epítomos peptídicos usados en estos ensayos de vacunación son específicos de melanocitos, y estos péptidos no pueden aplicarse para tumores de origen no melanocítico. Además, la expresión de estos TAA es heterogénea entre tumores de pacientes diferentes y puede incluso variar entre metástasis obtenidas de un paciente. Sin embargo, durante los últimos dos años se han identificado varios antígenos peptídicos específicos de tumores, que se expresan en varios cánceres diferentes, es decir, HER-2, Muc-1 y telomerasa.

La apoptosis es un programa genético de suicidio celular, y se ha sugerido que la inhibición de la apoptosis es un mecanismo importante implicado en la formación del cáncer prolongando la vida de las células que favorecen la acumulación de mutaciones transformantes. La survivina es un miembro de la familia de proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAP) recientemente identificado. En un análisis de expresión génica global de aproximadamente 4 millones de transcritos, se identificó la survivina como uno de los principales genes regulados por incremento invariablemente en muchos tipos de cáncer pero no en tejido normal. Los tumores malignos sólidos que sobreexpresan survivina incluyen cáncer de pulmón, de colon, de mama, de páncreas y de próstata así como tumores malignos hematopoyéticos. Adicionalmente, se ha informado de que series de cánceres de piel de melanoma y no melanoma son invariablemente positivos para survivina. La sobreexpresión de survivina en la mayoría de los cánceres en seres humanos sugiere un papel general de la inhibición de la apoptosis en la progresión tumoral, un concepto corroborado por la observación de que en el caso de cáncer colorrectal y de vejiga, así como neuroblastoma, la expresión de survivina estaba asociada a un pronóstico desfavorable. Por el contrario, la survivina no puede detectarse en tejidos adultos normales. Estas características cualifican a la survivina como un TAA adecuado para fines tanto diagnósticos como terapéuticos.

Por tanto, durante la última década se ha identificado un gran número de TAA que se reconocen por los CTL de una manera restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Ya que la survivina se sobreexpresa en la mayoría de los cánceres en seres humanos y la inhibición de su función da como resultado un aumento de la apoptosis, esta proteína puede servir como diana para respuestas de CTL terapéuticas. La proteína survivina y el uso diagnóstico y terapéutico potencial de la misma se dan a conocer en (1) y en el documento US 6.245.523. La survivina es una proteína citoplasmática de 16,5 kDa que contiene un único BIR y una región de superhélice carboxilo terminal altamente cargada de un dedo RING, que inhibe la apoptosis inducida por la retirada del factor de crecimiento (IL-3) cuando se transfiere en precursores de células B. El gen que codifica para survivina es casi idéntico a la secuencia del receptor de proteasa de células efectoras 1 (EPR-1), pero orientado en la dirección opuesta, lo que sugiere por tanto la existencia de dos genes separados duplicados en una configuración cabeza-a-cabeza. En consecuencia, la survivina puede describirse como un producto de EPR-1 antisentido. Funcionalmente, la inhibición de la expresión de survivina regulando por incremento su transcrito de EPR-1 antisentido natural da como resultado una apoptosis masiva y un crecimiento celular disminuido.

El documento US 6.245.523 da a conocer el aislamiento de survivina purificada y proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican para la proteína survivina, y anticuerpos y otras moléculas que se unen a la survivina. El documento US 6.245.523 también da a conocer fragmentos activos de manera anti-apoptótica de la proteína survivina y variantes de la misma en las que se ha insertado un residuo de aminoácido de manera N- o C-terminal en, o dentro de, la secuencia de survivina dada a conocer. Se da a conocer específicamente que tales péptidos deben contener residuos funcionales clave requeridos para la apoptosis, es decir Trp en la posición 67, Pro en la posición 73 y Cys en la posición 84. Schmidt *et al* (Blood. 15 de julio de 2003, vol. 102. nº 2) describían además que la survivina y los péptidos de survivina son reconocidos por células T citotóxicas específicas.

Durante la última década, numerosos ensayos clínicos han demostrado la viabilidad de la vacunación específica de péptido para inducir respuestas de células T anti-tumorales en pacientes con cáncer. Sin embargo, la evolución clínica de los pacientes no se mejoró en la mayoría de los casos. Esta discrepancia se ha explicado en numerosos casos mediante mecanismos de escape inmunitario de las células tumorales. Para estrategias terapéuticas que seleccionan como diana antígenos que desempeñan un papel insignificante en el crecimiento del cáncer, la selección de células cancerosas deficientes en antígenos es una limitación bien reconocida.

Sin embargo, en el caso de pacientes con cáncer de mama, se ha observado un papel paradójico de la proteína Bcl-2. En tumores de mama primarios se ha asociado la negatividad para Bcl-2 con un peor resultado clínico. Adicionalmente, se ha informado de que la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 está correlacionada con tumores positivos para receptores de estrógenos mediados por elementos de respuesta a receptores de estrógenos en la región promotora del gen de Bcl-2. El pronóstico de tumores positivos para estrógenos es más favorable que el de tumores negativos para estrógenos. Se han sugerido varias explicaciones posibles para estos resultados aparentemente paradójicos, por ejemplo efectos inhibidores de Bcl-2 sobre la proliferación celular, la regulación de la expresión de Bcl-2 mediante estrógenos y/o la presencia de antagonistas de Bcl-2 que inhiben su función citoprotectora.

Todavía, los estudios anteriores han demostrado que la sobreexpresión de Bcl-2 en el cáncer de mama está correlacionada con la resistencia a fármacos, y que la regulación por disminución de Bcl-2 mediante oligonucleótidos antisentido modula la sensibilidad a fármacos en asociación con la apoptosis. Además, la transfección génica de Bcl-

2 en líneas celulares de cáncer de mama ha dado como resultado de manera uniforme una resistencia potenciada a la apoptosis. Además, se ha descrito que la presencia de otro inhibidor de la apoptosis, la proteína survivina en carcinoma de mama estaba fuertemente asociada a la expresión de Bcl-2 y a un índice apoptótico reducido (AI) y a una escasa supervivencia global. Se ha descrito una asociación similar entre la survivina y Bcl-2 en neuroblastoma, 5 cáncer gástrico, cáncer colorrectal, y linfoma no Hodgkin de alto grado. Por tanto, en el carcinoma de mama al igual que en la mayoría de los demás cánceres en seres humanos, la inhibición de la apoptosis es una característica general, y la expresión de genes anti-apoptóticos, por ejemplo genes de survivina y/o Bcl-2, puede producir efectos antiapoptóticos más pronunciados, tal como se refleja en un índice apoptótico reducido. Recientemente, se ha demostrado que la survivina es una diana para la reactividad espontánea de células T en pacientes con diversos 10 cánceres. Estos hallazgos iniciales se han confirmado y afianzado más tarde (por los presentes inventores y por otros).

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que péptidos restringidos a CMH de clase I pueden derivarse de una clase de proteínas reguladoras de la apoptosis diferente de la survivina, es decir la familia de proteínas Bcl-2, 15 que pueden unirse a moléculas de HLA de CMH de clase I y que provocan de ese modo respuestas inmunitarias de CTL en pacientes que padecen enfermedades de cáncer. Estos hallazgos demuestran que las proteínas que pertenecen a la familia de proteínas Bcl-2 actúan como moléculas TRAP, que se procesan *in vivo* por las células para dar péptidos que tienen funcionalidad de TRA. Estos hallazgos abren el camino a enfoques terapéuticos y diagnósticos novedosos que pueden aplicarse en general en el control de enfermedades de cáncer.

La presente invención da a conocer que Bcl-2 es una diana adecuada para la inmunoterapia frente a una gama de enfermedades de cáncer. Bcl-2 es un factor celular crítico y su expresión es de importancia para la supervivencia de células tumorales. Por tanto, Bcl-2 es una diana atractiva para la vacunación debido a que el escape inmunitario mediante regulación por disminución o pérdida de expresión de esta proteína perjudicaría el crecimiento tumoral sostenido. Además, en los estudios que condujeron a la presente invención, los inventores buscaron y detectaron 20 reactividad espontánea de células T en PBL frente a péptidos derivados de Bcl-2 en pacientes con cáncer de mama usando un ensayo ELISPOT.

En consecuencia, la presente invención se refiere en un primer aspecto a un péptido inmunogénicamente activo aislado que comprende como máximo 15 aminoácidos, derivado de la proteína Bcl-X_L, que comprende una 30 secuencias seleccionada del grupo que consiste en: YLNDHLEPWI (SEQ ID NO: 42), RIAAWMATYL (SEQ ID NO: 45), VLVSRIAAM (SEQ ID NO: 48) y VAFFSFGGAL (SEQ ID NO: 49) para su uso como medicamento en la prevención o el tratamiento de un cáncer.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende los péptidos anteriores de la invención.

También es un aspecto de la invención proporcionar una composición de vacuna que comprende un péptido 35 inmunogénicamente activo aislado que comprende como máximo 15 aminoácidos, derivado de la proteína Bcl-X_L, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: YLNDHLEPWI (SEQ ID NO: 42), RIAAWMATYL (SEQ ID NO: 45), VLVSRIAAM (SEQ ID NO: 48) y VAFFSFGGAL (SEQ ID NO: 49) para su uso como medicamento en la prevención o el tratamiento de un cáncer.

Todavía en aspectos adicionales la invención se refiere a un kit de diagnóstico para el diagnóstico *ex vivo* o *in situ* 40 de la presencia en un paciente con cáncer de células T en PBL o en tejido tumoral que son reactivas con Bcl-X_L, comprendiendo el kit el fragmento peptídico de la invención tal como se definió anteriormente; un complejo de un fragmento peptídico de la invención y una molécula de HLA de clase I o un fragmento de tal molécula.

También es un objetivo de la invención proporcionar un método de detección en un paciente con cáncer de la presencia de células T reactivas con Bcl-X_L, comprendiendo el método poner en contacto un tejido tumoral o una 45 muestra de sangre con un complejo de la invención tal como se definió anteriormente y detectar la unión del complejo al tejido o a las células sanguíneas.

Aún en otro aspecto la invención proporciona el uso de la proteína o el fragmento peptídico tal como se define en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de cáncer.

Descripción detallada de la invención

Un objetivo principal de la presente invención es proporcionar proteínas aisladas derivadas Bcl-X_L o un fragmento 50 peptídico inmunológicamente activo de las mismas para su uso como medicamento en la prevención o el tratamiento de un cáncer.

Los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 ejercen sus efectos oncogénicos inhibiendo la apoptosis en células que normalmente están destinadas a morir, promoviendo de ese modo la acumulación de células *in vivo*.

55 Todos los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 contienen al menos uno de los cuatro motivos conservados

conocidos como dominios de homología (BH) de Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 y BH4). Además de la presencia de dominios BH, las moléculas antiapoptóticas preferidas presentan un dominio de anclaje a la membrana carboxilo terminal (TM). Miembros antiapoptóticos tales como Bcl-2 y Bcl-X_L contienen los cuatro dominios BH, junto con el dominio transmembrana. Proteínas proapoptóticas de múltiples dominios tales como Bax y Bak contienen todos los dominios excepto el BH4. Un segundo subgrupo de proteínas proapoptóticas, conocidas como proteínas de "sólo dominio BH3" (por ejemplo, Bad y Bid), consiste en moléculas que contienen sólo el dominio BH3 y carecen de otros dominios BH. Proteínas proapoptóticas tales como Bcl-X_S y Mcl-1S, que representan formas cortadas y empalmadas de manera alternativa de los genes bcl-x y mcl-1, respectivamente, carecen de dominios BH1 y BH2. Adicionalmente, Mcl-1S carece de un dominio transmembrana. Proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2 se describen por ejemplo en la referencia 6.

En una realización preferida de la invención, la proteína que pertenece a la familia de proteínas Bcl-2 es Bcl-X_L, preferiblemente Bcl-X_L humana, más preferiblemente Bcl-X_L de la secuencia con el número de registro primario Q07817 en la base de datos SwissProt.

Puesto que varios cánceres en seres humanos expresan niveles altos de Bcl-2 y otros miembros de la familia Bcl-2, estrategias inmunoterapéuticas dirigidas a estos antígenos pueden tener amplias aplicaciones clínicas. La principal preocupación de un enfoque de este tipo sería la inducción de respuestas inmunitarias autorreactivas. Por tanto, el futuro de la vacunación basada en miembros de esta familia de proteínas dependerá tanto de la eficacia terapéutica como del tipo de efectos secundarios que pudieran seguir a la inmunización. Cuando se usaron por primera vez péptidos derivados de antígenos de diferenciación melanocítica para tratar pacientes con melanoma en estadio IV se previó que esto podría conducir a una destrucción pronunciada de melanocitos, lo que a su vez se manifestaría en sí clínicamente, por ejemplo como, vitiligo o retinitis. Sin embargo, la experiencia clínica demostró que la incidencia de vitiligo en pacientes que recibieron vacunaciones no era significativamente superior a la incidencia de hipopigmentación asociada a melanoma en pacientes que recibieron otras formas de tratamiento. Adicionalmente, no se ha notificado ningún efecto secundario grave en diversos ensayos de vacunación frente a autoantígenos.

En una realización útil, se proporcionan fragmentos peptídicos restringidos a CMH de clase I novedosos (en el presente documento también denominados "péptidos") que se caracterizan por tener al menos una de varias características, de las que una es la capacidad para unirse a la molécula de HLA de clase I a la que está restringido a una afinidad tal como se mide mediante la cantidad del péptido que puede realizar la mitad de la recuperación máxima de la molécula de HLA de clase I (valor C₅₀) que es como máximo de 50 μM tal como se determina mediante el ensayo de unión-ensamblaje tal como se describe en el presente documento. Este ensayo de ensamblaje se lleva a cabo tal como se describió anteriormente (2), y se basa en la estabilización de la molécula de HLA tras cargar el péptido en la línea celular T2 deficiente en transportador de péptido. Posteriormente, se inmunoprecipitan cadenas pesadas de HLA estables plegadas correctamente usando anticuerpos dependientes de la conformación y se cuantifica la unión al péptido.

Este ensayo proporciona un medio sencillo de examinar péptidos candidatos para determinar su capacidad para unirse a una molécula de alelo de HLA dada a la afinidad anterior. En realizaciones preferidas, el fragmento peptídico de la invención es uno que tiene un valor C₅₀, que es como máximo de 30 μM, tal como un valor C₅₀, que es como máximo de 20 μM incluyendo valores C₅₀ de como máximo 10 μM, como máximo 5 μM y como máximo 2 μM.

Sin embargo, péptidos más preferidos según la presente invención son péptidos que pueden generar una respuesta de células T específica tal como se determina mediante un ensayo ELISPOT, por ejemplo el ensayo ELISPOT descrito más adelante en el presente documento en el ejemplo 1, sección 4. Algunos péptidos, aunque no se unen al CMH con alta afinidad, pueden dar lugar todavía a una respuesta de células T tal como se determina mediante ELISPOT. Otros péptidos que pueden unirse al CMH con alta afinidad dan lugar también a una respuesta de células T tal como se determina mediante ELISPOT. Ambas clases de péptidos son péptidos preferidos según la invención.

Por tanto, péptidos preferidos según la presente invención son péptidos que pueden generar una respuesta de células T específica tal como se mide mediante un ensayo ELISPOT, en el que se miden más de 50 puntos específicos de péptido por 10⁸ células, más preferiblemente por 10⁷, incluso más preferiblemente por 10⁶, aún más preferiblemente por 10⁵ células, tal como por 10⁴ células.

Tal como se mencionó anteriormente, el sistema de HLA representa el sistema mayor de histocompatibilidad (CMH) humano. Generalmente, los sistemas CMH controlan una gama de características: antígenos de trasplante, respuestas inmunitarias dependientes del timo, ciertos factores del complemento y predisposición a ciertas enfermedades. Más específicamente, el CMH codifica para tres tipos diferentes de moléculas, es decir moléculas de clase I, II y III, que determinan las características más generales del CMH. De estas moléculas, las moléculas de clase I son las denominadas moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C que se presentan sobre la superficie de la mayoría de células nucleadas y trombocitos.

Los péptidos de la presente invención se caracterizan por su capacidad para unirse a (estando restringidos a) una molécula de HLA del CMH de clase I particular. Por tanto, en una realización el péptido es uno que está restringido a una molécula HLA-A del CMH de clase I incluyendo HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A9, HLA-A10, HLA-A11, HLA-

5 Aw19, HLA-A23(9), HLA-A24(9), HLA-A25(10), HLA-A26(10), HLA-A28, HLA-A29(w19), HLA-A30(w19), HLA-A31(w19), HLA-A32(w19), HLA-Aw33(w19), HLA-Aw34(10), HLA-Aw36, HLA-Aw43, HLA-Aw66(10), HLA-Aw68(28), HLA-A69(28). A lo largo de la bibliografía se usan también denominaciones más sencillas, usándose solamente la denominación numérica primaria, por ejemplo HLA-A19 o HLA-A24 en lugar de HLA-Aw19 y HLA-A24(49), respectivamente. En realizaciones específicas, el péptido de la invención está restringido a una especie de HLA del CMH de clase I seleccionada del grupo que consiste en HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 y HLA-A24.

10 Los péptidos de la invención pueden derivarse por ejemplo de secuencias conocidas de un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 (3). En una realización preferida de la invención, el péptido comprende (o más preferiblemente consiste en) como máximo 15, tal como máximo 10, por ejemplo en el intervalo de 9 a 10 aminoácidos contiguos de Bcl-X_L con el número de registro primario Q07817 en la base de datos SwissProt.

15 La selección de péptidos que tienen potencialmente la capacidad para unirse a una molécula de HLA particular puede realizarse mediante la alineación de secuencias conocidas que se unen a una molécula de HLA particular dada para revelar de ese modo el predominio de algunos aminoácidos relacionados en posiciones particulares en los péptidos. Tales residuos de aminoácido predominantes se denominan también en el presente documento "residuos de anclaje" o "motivos de residuos de anclaje". Siguiendo un procedimiento relativamente sencillo de este tipo basado en datos de secuencia conocidos que pueden encontrarse en bases de datos accesibles, los péptidos pueden derivarse de moléculas de la familia de proteínas Bcl-2, que es probable que se unan a la molécula de HLA particular. Ejemplos representativos de tales análisis para determinar una gama de moléculas de HLA se facilitan en la tabla a continuación.

Alelo de HLA	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 5	Posición 6	Posición 7	C-terminal
HLA-A1		T,S	D,E			L	Y
HLA-A2		L,M			V		L,V
HLA-A3		L,V,M	F,Y				K,Y,F
HLA-A11		V,I,F,Y	M,L,F,Y, I				K,R
HLA-A23		I,Y					W,I
HLA-A24		Y		I,V	F		I,L,F
HLA-A25		M,A,T	I				W
HLA-A26	E,D	V,T,I,L,F			I,L,V		Y,F
HLA-A28	E,D	V,A,L					A,R
HLA-A29		E					Y,L
HLA-A30		Y,L,F,V					Y
HLA-A31			L,M,F,Y				R
HLA-A32		I,L					W
HLA-A33		Y,I,L,V					R
HLA-A34		V,L					R
HLA-A66	E,D	T,V					R,K
HLA-A68	E,D	T,V					R,K
HLA-A69		V,T,A					V,L
HLA-A74		T					V,L
HLA-B5	*	A,P	F,Y				I,L
HLA-B7		P					L,F
HLA-B8			K	K,R			L
HLA-B14		R,K					L,V
HLA-B15		Q,L,K,P, H,V,I,M,					F,Y,W

(B62)	S,T				L,V
HLA-B17	R				Y,K,F,L
HLA-B27	P				I,L,M,Y
HLA-B35	D,E				I,L,M
HLA-B37	H	D,E			F,L
HLA-B38	R,H				L,F
HLA-B39	E	F,I,V			L,V,A,W, M,T,R
HLA-B40					
(B60,61)	L,P				Y,L
HLA-B42	E				F,Y,W
HLA-B44	M,I,L,V				Y,F
HLA-B46	Q,K				L
HLA-B48	A,P,G				F,Y,I,V
HLA-B51	Q	F,Y			I,V
HLA-B52	P				W,F,L
HLA-B53	P				
HLA-B54	P				A,V
HLA-B55	P				A,V
HLA-B56	A,T,S				F,W,Y
HLA-B57	A,T,S				F,W,Y
HLA-B58	P				L
HLA-B67	R				P
HLA-B73	A,L				L
HLA-Cw1	A,L				F,Y
HLA-Cw2	A,L				L,M
HLA-Cw3	Y,P,F				L,M,F,Y
HLA-Cw4					L,I,V,Y
HLA-Cw6	Y				L,Y,F
HLA-Cw6	Y				L,I,
HLA-Cw8	A,L				L,V
HLA-Cw16					

* En una realización no hay ningún residuo de anclaje específico para esta posición, sin embargo, en una realización preferida, el residuo de anclaje es R o A.

Por tanto, como ejemplo, nonapéptidos que tienen potencialmente la capacidad para unirse a HLA-A1 tendrían una de las siguientes secuencias: Xaa-T-D-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y, Xaa-T-E-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y; Xaa-S-D-Xaa-Xaa-

Xaa-L-Xaa-Y o Xaa-S-E-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y (indicando Xaa cualquier residuo de aminoácido). De una manera similar, pueden diseñarse secuencias que tengan potencialmente la capacidad para unirse a cualquier otra molécula de HLA.

5 Se apreciará que el experto en la técnica podrá identificar “motivos de residuos de anclaje” adicionales para una molécula de HLA dada.

Por tanto, en realizaciones útiles, los péptidos de la invención incluyen péptidos, cuyas secuencias comprenden, para cada uno de los alelos de HLA específicos enumerados en la tabla, cualquiera de los residuos de aminoácido tal como se indica en la tabla.

10 Por tanto, los péptidos de la invención pueden ser cualquiera de los péptidos mencionados anteriormente que comprenden secuencias contiguas de miembros de la familia de proteínas Bcl-2, habiéndose intercambiado en el intervalo de 1 a 10, preferiblemente en el intervalo de 1 a 5, más preferiblemente en el intervalo de 1 a 3, incluso más preferiblemente en el intervalo de 1 a 2, aún más preferiblemente 1 aminoácido por otro aminoácido, preferiblemente de una manera tal que el péptido comprende uno o más, preferiblemente todos los residuos de anclaje de un péptido específico de HLA-A dado tal como se indicó en la tabla anterior.

15 Un ejemplo no limitativo de cómo preparar péptidos de miembros de la familia de proteínas Bcl-2 que comprenden residuos de anclaje de un péptido específico de HLA-A dado se describe en el ejemplo 3 en la sección “Respuesta frente a péptidos modificados”.

20 Por tanto, un enfoque sencillo para identificar péptidos de la invención incluye las siguientes etapas: seleccionar una molécula de HLA particular, por ejemplo una que se produce a una alta tasa en una población dada, llevar a cabo un análisis de alineación tal como se describió anteriormente para identificar los “motivos de residuos de anclaje” en la proteína de la familia de proteínas Bcl-2, aislar o construir péptidos de un tamaño adecuado que comprendan uno o más de los residuos de anclaje identificados y someter a prueba los péptidos resultantes para determinar (i) la capacidad para unirse a la molécula de HLA particular usando el ensayo de ensamblaje tal como se describe en el presente documento, (ii) la capacidad de los péptidos para provocar células productoras de INF- γ en una población de PBL de un paciente con cáncer a una frecuencia de al menos 1 por 10⁴ PBL tal como se determina mediante un ensayo ELISPOT tal como se describe en el presente documento y/o (iii) la capacidad de los péptidos para detectar *in situ* en un tejido tumoral CTL que son reactivos con los péptidos de epítipo que están sometidos a prueba.

25 En una realización preferida el péptido puede ser cualquier péptido que consiste en como máximo 15, incluso más preferiblemente como máximo 10 aminoácidos y que comprende (o más preferiblemente que consiste en) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en YLNDHLEPWI (SEQ ID NO: 42), RIAAWMATYL (SEQ ID NO: 45), VLVSRIAAMW (SEQ ID NO: 48) y VAFFSFGGAL (SEQ ID NO: 49), más preferiblemente del grupo que consiste en YLNDHLEPWI (SEQ ID NO: 42), RIAAWMATYL (SEQ ID NO: 45), VLVSRIAAMW (SEQ ID NO: 48) y VAFFSFGGAL (SEQ ID NO: 49), incluso más preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en VAFFSFGGAL (SEQ ID NO: 49), VLVSRIAAMW (SEQ ID NO: 48) y RIAAWMATYL (SEQ ID NO: 45) o seleccionada del grupo que consiste en YLNDHLEPWI (SEQ ID NO: 42).

30 En realizaciones útiles adicionales, el péptido de la invención es un péptido, que está restringido a una molécula HLA-B del CMH de clase I incluyendo cualquiera de las siguientes: HLA-B5, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B12, HLA-B13, HLA-B14, HLA-B15, HLA-B16, HLA-B17, HLA-B18, HLA-B21, HLA-Bw22, HLA-B27, HLA-B35, HLA-B37, HLA-B38, HLA-B39, HLA-B40, HLA-Bw41, HLA-Bw42, HLA-B44, HLA-B45, HLA-Bw46 y HLA-Bw47. En realizaciones específicas, la especie de HLA-B del CMH de clase I a la que puede unirse el péptido de la invención se selecciona de HLA-B7, HLA-B35, HLA-B44, HLA-B8, HLA-B15, HLA-B27 y HLA-B51.

En realizaciones útiles adicionales, el péptido de la invención es un péptido, que está restringido a una molécula HLA-C del CMH de clase I incluyendo cualquiera de las siguientes: HLA-Cw1, HLA-Cw2, HLA-Cw3, HLA-Cw4, HLA-Cw5, HLA-Cw6, HLACw7 y HLA-Cw1.

45 Preferiblemente, el fragmento peptídico de la invención comprende menos de 50 residuos de aminoácido, y más preferiblemente comprende como máximo 20 residuos de aminoácido, tal como máximo 10 residuos de aminoácido. En realizaciones específicas, el péptido es un heptapéptido, un octapéptido, un nonapéptido, un decapéptido o un undecapéptido.

50 El péptido de la invención se deriva, tal como se mencionó anteriormente, de Bcl-X_L o un fragmento de la misma. La proteína de la que puede derivarse el péptido puede ser cualquier Bcl-X_L de cualquier especie animal en la que se expresa la proteína. En realizaciones preferidas, la proteína de partida es de una especie de mamífero incluyendo una especie de roedor, conejo y una especie de primate tal como seres humanos. Basándose en la secuencia de la proteína seleccionada, el péptido de la invención se deriva mediante cualquier tratamiento químico o enzimático apropiado del material de partida proteico que da como resultado un péptido de un tamaño adecuado tal como se indicó anteriormente, o puede sintetizarse mediante cualquier procedimiento de síntesis de péptidos convencional con el que está familiarizado el experto.

El péptido de la invención puede tener una secuencia que es una secuencia nativa de Bcl-X_L del que se deriva. Sin

embargo, péptidos que tienen una mayor afinidad hacia cualquier molécula de HLA dada pueden derivarse de una secuencia nativa de este tipo modificando la secuencia mediante sustitución, delección o adición de al menos un residuo de aminoácido, por ejemplo basándose en el procedimiento descrito anteriormente mediante el cual se identifican motivos de residuos de anclaje con respecto a la molécula de HLA dada.

5 Una característica significativa del péptido de la invención es su capacidad para reconocer o provocar células T de respuesta productoras de INF- γ , es decir células T citotóxicas (CTL) que reconocen específicamente el péptido particular en una población de PBL o células tumorales de un paciente con cáncer (células diana). Esta actividad se determina fácilmente sometiendo PBL o células tumorales de un paciente a un ensayo ELISPOT tal como se describe en la referencia (4) y en el ejemplo siguiente. Antes del ensayo, puede ser ventajoso estimular la población de PBL o las células tumorales que van a someterse a ensayo poniendo en contacto las células con el péptido que va a someterse a prueba. Preferiblemente, el péptido puede provocar o reconocer células T productoras de INF- γ a una frecuencia de al menos 1 por 10^4 PBL tal como se determina mediante un ensayo ELISPOT tal como se usa en el presente documento. Más preferiblemente la frecuencia es de al menos 5 por 10^4 PBL, lo más preferiblemente al menos 10 por 10^4 PBL, tal como al menos 50 ó 100 por 10^4 PBL.

15 El ensayo ELISPOT representa una herramienta potente para monitorizar respuestas de células T específicas de péptidos derivados de la familia Bcl-2. Sin embargo, aunque se ha demostrado que la reactividad de ELISPOT en la mayoría casos está correlacionada con la capacidad de los CTL para lisar células diana, la evidencia concluyente para este concepto puede darse sólo directamente. Por tanto, una implicación principal de los hallazgos del presente documento es que los péptidos de la invención pueden expresarse y complejarse con moléculas de HLA en células cancerosas. Esto hace a estas células cancerosas sensibles a la destrucción por CTL y resalta la utilidad potencial de la inmunización con proteínas de la familia Bcl-2 para controlar el crecimiento de neoplasmas. La presencia de respuestas de CTL espontáneas en PBL de pacientes con cáncer de mama frente a epítopos peptídicos derivados de Bcl-2 restringidos a HLA corrobora el potencial inmunoterapéutico de estos antígenos tumorales no sólo en pacientes con cáncer de mama, sino también, ya que los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 se sobreexpresan en muchos cánceres incluyendo cánceres de pulmón, colorrectal, de próstata y en leucemia y linfomas, en una amplia gama de enfermedades de cáncer.

En consecuencia, en otra realización preferida el péptido de la invención puede provocar células productoras de INF- γ en una población de PBL de un paciente que tiene una enfermedad de cáncer en la que se expresa Bcl-X_L incluyendo un tumor maligno hematopoyético, por ejemplo, leucemia linfática crónica y leucemia mieloide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer de cérvix, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata.

Además de su capacidad para provocar respuestas inmunitarias en poblaciones de PBL, también se contempla que los péptidos de la invención pueden provocar respuestas inmunitarias citolíticas *in situ*, es decir en tejidos tumorales sólidos. Esto puede demostrarse proporcionando complejos de HLA-péptido, por ejemplo multimerizándose y dotándose de un marcador detectable, y usando tales complejos para tinciones de inmunohistoquímica para detectar en un tejido tumoral CTL que son reactivos con el péptido de epítipo de la invención. También se contempla que los péptidos de la invención, además de su capacidad para unirse a moléculas de HLA dando como resultado la presentación de complejos de HLA y péptidos en superficies celulares, complejos que a su vez actúan como epítopos o dianas para células T citolíticas, pueden provocar otros tipos de respuestas inmunitarias, tales como respuestas de células B dando como resultado la producción de anticuerpos frente a los complejos y/o una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). El último tipo de respuesta inmunitaria se define como rojez e induración palpable en el sitio de inyección del péptido de la invención.

La composición de vacuna según la presente invención puede comprender un ácido nucleico que codifica para una proteína de Bcl-X_L o un fragmento peptídico de la misma. Dicho ácido nucleico puede codificar por tanto para cualquiera de las proteínas y fragmentos peptídicos mencionados anteriormente. El ácido nucleico puede ser por ejemplo ADN, ARN, LNA, HNA, PNA, preferiblemente el ácido nucleico es ADN o ARN.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden estar comprendidos dentro de cualquier vector adecuado, tal como un vector de expresión. Se encuentran disponibles numerosos vectores y el experto podrá seleccionar un vector útil para el fin específico. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o cromosoma artificial. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos, por ejemplo, puede insertarse ADN en un(os) sitio(s) de endonucleasa de restricción apropiado(s) usando técnicas bien conocidas en la técnica. Aparte de la secuencia de ácido nucleico según la invención, el vector puede comprender además una o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. El vector puede comprender también secuencias adicionales. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamiento convencionales que conoce el experto en la técnica. El vector es preferiblemente un vector de expresión que comprende el ácido nucleico operativamente unido a una secuencia de ácido nucleico reguladora que dirige la expresión del mismo en una célula adecuada. Dentro del alcance de la presente invención, dicha secuencia de ácido nucleico reguladora debe poder dirigir en general la expresión en una célula de mamífero, preferiblemente una célula humana, más preferiblemente en una célula presentadora de antígeno.

En una realización preferida el vector es un vector viral. Dicho vector viral puede comprender, además del ácido nucleico que codifica para Bcl-X_L o fragmento peptídico de la misma, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido estimulador de células T. El polipéptido estimulador de células T se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en B7.1, ICAM-1 y LFA-3.

5 El vector puede ser también un vector bacteriano, tal como un vector bacteriano atenuado. Pueden usarse vectores bacterianos atenuados con el fin de inducir respuestas inmunitarias duraderas de la mucosa en los sitios de infección y persistencia. Pueden usarse como vectores bacterias recombinantes diferentes, por ejemplo, el vector bacteriano puede seleccionarse del grupo que consiste en *Salmonella*, *Lactococcus* y *Listeria*. En general, pudo demostrarse la inducción de inmunidad frente al antígeno heterólogo VPH16 L1 o E7, con una fuerte inducción de CTL y remisión tumoral en ratones.

La invención se refiere también a un kit de partes que comprende

- i) cualquiera de las de las composiciones de vacuna descritas en el presente documento y/o
- ii) proteínas Bcl-X_L descritas en el presente documento y/o
- 15 iii) cualquiera de los fragmentos peptídicos de las proteínas de ii) descritas en el presente documento y/o
- iv) cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican para las proteínas de ii) o los péptidos de iii)

y un agente anticancerígeno adicional.

Los componentes del kit de partes están comprendidos preferiblemente en composiciones individuales, sin embargo, está comprendido dentro del alcance de la presente invención que todos los componentes del kit de partes están comprendidos dentro de la misma composición. Por tanto, los componentes del kit de partes pueden administrarse de manera simultánea o secuencial en cualquier orden.

El agente anticancerígeno puede ser un agente usado en quimioterapia o terapia génica, sustancias inmunoestimulantes o anticuerpos. Las sustancias inmunoestimulantes pueden ser por ejemplo citocinas, tales como citocinas seleccionadas del grupo que consiste en GM-CSF, IFN de tipo I, interleucina 12 e interleucina 15. El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo inmunoestimulante tal como los anticuerpos anti-CD40 o anti-CTLA-4. La sustancia inmunoestimuladora puede ser también una sustancia que puede agotar factores o células de inhibición inmunitaria (por ejemplo células T reguladoras), dicha sustancia puede ser por ejemplo ubiquitina-ligasas E3. Las ubiquitina-ligasas E3 (las proteínas HECT, RING y U-box) han surgido como reguladores moleculares clave de la función celular inmunitaria, y cada una puede estar implicada en la regulación de respuestas inmunitarias durante la infección por moléculas inhibidoras específicas de selección como diana para la destrucción proteolítica. Varias proteínas HECT y RING E3 se han relacionado ahora también con la inducción y el mantenimiento de la autotolerancia inmunitaria: c-Cbl, Cbl-b, GRAIL, Itch y Nedd4 regula cada una negativamente la proliferación y producción del factor de crecimiento de células T.

Es evidente que los hallazgos de la presente invención proporcionan la base para aplicaciones terapéuticas así como diagnósticas de la proteína o el fragmento peptídico de la invención.

En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína o el fragmento peptídico de la invención, en particular una composición farmacéutica que, cuando se administra a un paciente con cáncer, puede provocar una respuesta inmunitaria frente a la enfermedad de cáncer incluyendo provocar la producción en el paciente vacunado de células T efectoras que tienen un efecto citotóxico frente a las células cancerosas.

Tal como se sabe bien, que las moléculas de HLA diferentes son de prevalencia diferente en las principales poblaciones de seres humanos, existe un requisito de identificar epítopos peptídicos restringidos a varias moléculas de HLA de clase I para extender la cohorte de pacientes que puede tratarse según los métodos de la presente invención. La caracterización de múltiples epítopos de Bcl-X_L con elementos de restricción de HLA diferentes amplía el potencial clínico de este antígeno diana de dos modos importantes: (i) aumenta el número de pacientes elegibles para la inmunoterapia basada en péptidos derivados de Bcl-X_L. El antígeno HLA-A2 se expresa en aproximadamente el 50% de las poblaciones caucásica y asiática, los dos antígenos HLA-A1 y HLA-A3 se expresan en aproximadamente el 25% de los caucásicos y el 5% de los asiáticos, mientras que el antígeno HLA-A11 se expresa en aproximadamente el 15% de los caucásicos y el 30% de los asiáticos. Aunque estas cifras no pueden cuadrar debido a la coexpresión, una combinación de péptidos restringidos a una multiplicidad de éstos englobaría ciertamente a la mayoría de los pacientes con cáncer, (ii) Es probable que la selección como diana colectiva de varios elementos de restricción de cada paciente disminuya el riesgo de escape inmunitario por la pérdida de alelos de HLA. La pérdida de un único alelo de HLA es un componente significativo de las alteraciones del CMH descritas para células cancerosas, mientras que la pérdida total de la expresión de clase I es un acontecimiento bastante poco frecuente. Por tanto, con la identificación de epítopos de Bcl-X_L restringidos a diferentes alelos de HLA, sería posible seleccionar como diana más de una molécula de HLA simultáneamente en pacientes con solapamiento de alelos.

Por tanto, sería posible desarrollar vacunas de múltiples epítomos altamente inmunogénicas. Preferiblemente, tales vacunas deben diseñarse para facilitar un suministro simultáneo de los péptidos derivados de Bcl-X_L más adecuados opcionalmente en combinación con otros péptidos y/o adyuvantes adecuados tal como se describe a continuación en el presente documento. La presente invención engloba tales vacunas de múltiples epítomos que comprenden

5 péptidos derivados de Bcl-X_L opcionalmente en combinación con otras proteínas o fragmentos peptídicos que no pertenecen a o derivados de la familia de proteínas Bcl-X_L y/o adyuvantes tal como se describe a continuación en el presente documento y/o epítomos restringidos a CMH de clase II tal como se describe a continuación.

Ha habido un aumento de atención en la provocación de inmunidad de célula T auxiliar específica de tumores, es decir, vacunación con epítomos restringidos a CMH de clase II a pesar del hecho de que los tumores generalmente no expresan CMH de clase II. Esto se basa en el hallazgo reciente de que la inducción y la eficacia de la respuesta antitumoral inducida por vacuna requieren en muchos casos la cooperación de células T_h CD4 positivas específicas de tumores. Por tanto, un factor importante que dirige el desarrollo de vacunas que tienen una composición más compleja es el deseo de seleccionar como diana múltiples antígenos tumorales por ejemplo diseñando vacunas que comprenden o que codifican para un conjunto de epítomos de células T_h y CTL seleccionados cuidadosamente.

10 Obviamente, la vacunas de múltiples epítomos constituyen un modo eficaz para generar inmunidad frente a epítomos derivados de varios antígenos diferentes sin la necesidad de introducir (genes que codifican para) proteínas potencialmente peligrosas tales como oncoproteínas. Tales vacunas permiten también una inducción selectiva de inmunidad frente a epítomos de células T subdominantes y crípticos, que puede ser especialmente importante en el caso de autoantígenos asociados a tumores para los que puede existir tolerancia por los epítomos que se presentan de manera prominente en tejidos normales. Además, las células presentadoras de antígeno pueden no presentar ciertos epítomos que se expresan en las células tumorales debido a diferencias funcionales entre los inmunoproteasomas de células presentadoras de antígeno y los proteasomas "constitutivos" presentes en la mayoría de células tumorales. En el caso de vacunas a base de péptidos, tales epítomos pueden administrarse de una forma de "lista para CMH", que permite la presentación a través de carga exógena independientemente de la captación y el procesamiento de antígenos por las células presentadoras de antígeno huésped.

15 Ya que los péptidos de la invención son moléculas relativamente pequeñas, puede requerirse en tales composiciones combinar los péptidos con diversos materiales tales como adyuvantes, para producir vacunas, composiciones inmunogénicas, etc. Los adyuvantes, ampliamente definidos, son sustancias que promueven respuestas inmunitarias. Frecuentemente, el adyuvante de elección es adyuvante completo o incompleto de Freund, u organismos de *B. pertussis* inactivados, usados por ejemplo en combinación con antígenos precipitados con alumbre. Una discusión general de adyuvantes se proporciona en Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles & Practice* (2ª edición, 1986) en las páginas 61-63. Goding indica, sin embargo, que cuando el antígeno de interés es de bajo peso molecular, o es poco inmunogénico, se recomienda el acoplamiento a un portador inmunogénico. Los ejemplos de tales moléculas portadoras incluyen hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero bovino, ovoalbúmina e inmunoglobulina de ave. También se ha sugerido que diversos extractos de saponina son útiles como adyuvantes en composiciones inmunogénicas. Recientemente, se ha propuesto usar el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), una citocina muy conocida, como adyuvante (documento WO 97/28816).

20 Las composiciones de vacuna según la invención comprenden preferiblemente un adyuvante y/o un portador. Ejemplos de adyuvantes y portadores útiles se facilitan a continuación en el presente documento. Por tanto, la Bcl-X_L o el fragmento peptídico de la misma presente en la composición puede asociarse a un portador tal como por ejemplo una proteína o una célula presentadora de antígeno tal como por ejemplo una célula dendrítica (DC) que puede presentarse a la Bcl-X_L o al fragmento peptídico de la misma a una célula T.

25 Los adyuvantes son cualquier sustancia cuya mezcla en la composición de vacuna aumenta o modifica de otro modo la respuesta inmunitaria frente a Bcl-X_L o fragmento peptídico de la misma. Los portadores son estructuras de armazón, por ejemplo un polipéptido o un polisacárido, al que puede estar asociada la Bcl-X_L o el fragmento peptídico de la misma.

30 Los adyuvantes podrían seleccionarse por ejemplo del grupo que consiste en: AlK(SO₄)₂, AlNa(SO₄)₂, AlNH₄(SO₄), sílice, alumbre, Al(OH)₃, Ca₃(PO₄)₂, caolín, carbono, hidróxido de aluminio, dipéptidos de muramilo, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-DMP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11687, también denominada nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, también denominada MTP-PE), RIBI (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2%/Tween-80.RTM., lipopolisacáridos y sus diversos derivados, incluyendo lípido A, adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvante incompleto de Freund, adyuvante 65 de Merck, polinucleótidos (por ejemplo, ácidos poli IC y poli AU), cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, sustancias halladas en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis* y miembros del género *Brucella*, liposomas u otras emulsiones de lípidos, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN (véase los documentos US 58767 y 5.554.372), derivados del lípido A, derivados de toxina del cólera, derivados de HSP, derivados de LPS, matrices peptídicas sintéticas o GMDP, interleucina 1, interleucina 2, Montanide ISA-51 y QS-21. Los adyuvantes preferidos para usarse con la invención incluyen adyuvantes a base de aceite/tensioactivo tales como adyuvantes de Montanide (disponibles de Seppic, Bélgica), preferiblemente Montanide ISA-51. Otros adyuvantes preferidos son adyuvantes a base de ADN bacteriano, tales como adyuvantes que incluyen secuencias

35 40 45 50 55 60

de olinucleótidos CpG. Aún otros adyuvantes preferidos son adyuvantes a base de ARN bicatenario viral, tal como poli I:C. Imidazoquinilinas son aún otro ejemplo de adyuvantes preferidos. Además, un adyuvante preferido son liposomas. Los adyuvantes más preferidos son adyuvantes adecuados para su uso en seres humanos.

5 Los adyuvantes de Montanide (todos disponibles de Seppic, Bélgica), pueden seleccionarse del grupo que consiste en Montanide ISA-51, Montanide ISA-50, Montanide ISA-70, Montanide ISA-206, Montanide ISA-25, Montanide ISA-720, Montanide ISA-708, Montanide ISA-763A, Montanide ISA-207, Montanide ISA-264, Montanide ISA-27, Montanide ISA-35, Montanide ISA 51 F, Montanide ISA 016D y Montanide IMS, preferiblemente del grupo que
10 consiste en Montanide ISA- 51, Montanide IMS y Montanide ISA-720, más preferiblemente del grupo que consiste en Montanide ISA-51. Montanida ISA-51 (Seppic, Inc.) son adyuvantes a base de aceite/tensioactivo en los que se combinan tensioactivos diferentes o bien con un aceite mineral que no puede metabolizarse, un aceite que puede
15 metabolizarse, o bien con una mezcla de los dos. Se preparan para su uso como emulsión con una disolución acuosa que comprende la proteína que pertenece a la familia de proteínas Bcl-2 o fragmento peptídico de la misma. El tensioactivo es oleato de manida. QS-21 (Antigenics; Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA) es una saponina soluble en agua altamente purificada que se trata como una disolución acuosa. Los adyuvantes QS-21 y Montanide ISA-51 pueden proporcionarse en viales estériles de un solo uso.

Una discusión general de adyuvantes se proporciona en Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (2ª edición, 1986) en las páginas 61-63. Goding indica, sin embargo, que cuando el antígeno de interés es de bajo peso molecular, o es poco inmunogénico, se recomienda el acoplamiento a un portador inmunogénico. Ejemplos de tales
20 moléculas portadoras incluyen hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero bovino, ovoalbúmina e inmunoglobulina de ave. También se ha sugerido que diversos extractos de saponina son útiles como adyuvantes en composiciones inmunogénicas. Recientemente, se ha propuesto usar el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), una citocina muy conocida, como adyuvante (documento WO 97/28816).

Las funcionalidades deseables de adyuvantes que pueden usarse según la presente invención se enumeran en la tabla a continuación.

25 Tabla 1. Modos de acción de adyuvante

Acción	Tipo de adyuvante	Beneficio
1. Inmunomodulación	Generalmente proteínas o moléculas pequeñas que modifican la red de citocinas	Regulación por incremento de la respuesta inmunitaria. Selección de Th1 o Th2
2. Presentación	Generalmente complejos o moléculas anfipáticos que interactúan con el inmunógeno en su conformación nativa	Respuesta de anticuerpo de neutralización aumentada. Mayor duración de la respuesta
3. Inducción de CTL	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas que pueden unirse o encerrar al inmunógeno y que pueden fusionarse con o perturbar las membranas celulares • emulsiones w/o para la unión directa del péptido al CMH-1 de la superficie celular 	<ul style="list-style-type: none"> Procesamiento en el citosol de proteína que produce péptidos restringidos a la clase I correctos Proceso sencillo si está(n) presente(s) péptido(s) promiscuo(s) conocido(s)
4. Selección como diana	<ul style="list-style-type: none"> • Adyuvantes particulados que se unen al inmunógeno. Adyuvantes que saturan las células de Kupffer • Adyuvantes de hidratos de carbono que seleccionan como diana receptores de lectina en macrófagos y DC 	<ul style="list-style-type: none"> Uso eficaz del adyuvante e inmunógeno
5. Generación de depósito	<ul style="list-style-type: none"> • Emulsión w/o para corto plazo Microesferas o nanoesferas para largo plazo 	<ul style="list-style-type: none"> Tal como anteriormente. Puede determinar también el tipo de respuesta si la selección como diana es selectiva Eficacia Potencial para vacuna de una sola dosis

Fuente: Cox, J.C., y Coulter, A.R. (1997). Vaccine 15, 248-56.

Una composición de vacuna según la presente invención puede comprender más de un adyuvante diferente. Además, la invención engloba una composición terapéutica que comprende además cualquier sustancia adyuvante incluyendo cualquiera de los anteriores o combinaciones de los mismos. También se contempla que la proteína que pertenece a la familia de proteínas Bcl-2 o fragmentos peptídicos de la misma y el adyuvante pueden administrarse
30 por separado en cualquier secuencia apropiada.

Un portador puede estar presente independientemente de un adyuvante. La función de un portador puede ser por ejemplo aumentar el peso molecular de, en particular fragmentos peptídicos con el fin de aumentar su actividad o inmunogenicidad, para conferir estabilidad, para aumentar la actividad biológica o para aumentar la semivida en suero. Además, un portador puede ayudar a presentar la proteína Bcl-X_L o fragmentos peptídicos de la misma a
35 células T. El portador puede ser cualquier portador adecuado conocido por el experto en la técnica, por ejemplo una proteína o una célula presentadora de antígeno. Una proteína portadora podría ser, pero no se limita a, hemocianina de lapa californiana, proteínas séricas tales como transferrina, albúmina de suero bovino, albúmina de suero

humano, tiroglobulina u ovoalbúmina, inmunoglobulinas u hormonas, tales como insulina o ácido palmítico. Para la inmunización de seres humanos, el portador debe ser un portador aceptable fisiológicamente aceptable para seres humanos y seguro. Sin embargo, el toxoide tetánico y/o toxoide de la difteria son portadores adecuados en una realización de la invención. Alternativamente, el portador puede ser dextranos por ejemplo Sepharose.

- 5 En consecuencia, la invención engloba una composición terapéutica que comprende además una sustancia adyuvante incluyendo cualquiera de los anteriores o combinaciones de los mismos. También se contempla que el antígeno, es decir el péptido de la invención y el adyuvante pueden administrarse simultáneamente o por separado en cualquier secuencia apropiada.

10 La elección del antígeno en la composición farmacéutica de la invención dependerá de parámetros que pueden determinarse por el experto en la técnica. Tal como se ha mencionado, cada uno de los péptidos diferentes de la invención se presenta sobre las superficies celulares por una molécula de HLA particular. Como tal, si un sujeto que va a tratarse se tipifica con respecto al fenotipo de HLA, se selecciona un péptido/péptidos que se sabe que se une(n) a esa molécula de HLA particular.

15 Alternativamente, el antígeno de interés se selecciona basándose en la prevalencia de diversos fenotipos de HLA en una población dada. Como un ejemplo, HLA-A2 es el fenotipo más prevalente en la población caucásica, y por tanto, una composición que contiene un péptido derivado de survivina que se une a HLA-A2 será activa en una gran proporción de esa población. Sin embargo, la composición de la invención puede contener también una combinación de dos o más péptidos derivados de survivina, interaccionando cada uno específicamente con una molécula de HLA diferente para cubrir una mayor proporción de la población diana. Por tanto, como ejemplos, la composición farmacéutica puede contener una combinación de un péptido restringido a una molécula HLA-A y un péptido restringido a una molécula HLA-B, por ejemplo incluyendo aquellas moléculas HLA-A y HLA-B que corresponden a la prevalencia de fenotipos de HLA en la población diana, tal como por ejemplo HLA-A2 y HLA-B35. Adicionalmente, la composición puede comprender un péptido restringido a una molécula HLA-C.

20 Se contempla que composiciones inmunogénicas útiles de la invención, además de un péptido derivado de Bcl-X_L tal como se definen en el presente documento pueden comprender una cantidad inmunológicamente eficaz de la Bcl-X_L como tal, tal como se define en el presente documento o un fragmento inmunogénico del mismo.

25 La cantidad del péptido inmunogénico de la invención en la composición farmacéutica puede variar, dependiendo de la aplicación particular. Sin embargo, una única dosis del inmunógeno es preferiblemente cualquiera desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 5000 µg, más preferiblemente desde aproximadamente 50 µg hasta aproximadamente 2500 µg, tal como de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1000 µg. Los modos de administración incluyen administración intradérmica, subcutánea e intravenosa, implantación en forma de una formulación de liberación en el tiempo, etc. Cualquiera y todas las formas de administración conocidas en la técnica están englobadas en el presente documento. También están englobadas cualquiera y todas las formas farmacéuticas convencionales que en la técnica se conoce que son apropiadas para la formulación de una composición de péptido inmunogénico inyectable, tal como disoluciones y formas liofilizadas, suspensiones o formas en emulsión que contienen, si se requiere, portadores, diluyentes, conservantes, adyuvantes, componentes de tampón farmacéuticamente aceptables, etc.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse y administrarse usando cualquier protocolo convencional conocido por un experto en la técnica. En el ejemplo 5 se facilita un ejemplo de preparación no limitativo de una composición de vacuna según la invención, así como un ejemplo de administración no limitativo de la misma como vacuna. Un experto en la técnica apreciará que el protocolo puede adaptarse fácilmente a cualquiera de las composiciones de vacuna descritas en el presente documento.

35 En una realización adicional de la invención, la composición farmacéutica de la invención es útil para tratar a un paciente con cáncer, en la que, durante la evolución del cáncer en ese paciente, las células cancerosas han desarrollado una susceptibilidad reducida a un fármaco contra el cáncer quimioterápicamente activo y/o la radioterapia.

40 El efecto inmunoprotector de la composición de la invención puede determinarse usando varios enfoques, por ejemplo tal como se describe en el documento WO 97/28816, citado anteriormente. Una respuesta inmunitaria satisfactoria puede determinarse también mediante la aparición de reacciones DTH tras la inmunización y/o la detección de anticuerpos que reconocen específicamente el/los péptido(s) de la composición de vacuna.

45 En realizaciones preferidas, la composición farmacéutica de la invención es una composición de vacuna. Por tanto, la composición farmacéutica puede una vacuna o composición inmunogénica que puede provocar una respuesta inmunitaria frente a una enfermedad de cáncer. Tal como se usa en el presente documento; la expresión "vacuna o composición inmunogénica" se refiere a una composición que provoca al menos un tipo de respuesta inmunitaria dirigida frente a células cancerosas. Por tanto, una respuesta inmunitaria de este tipo puede ser cualquiera de los tipos mencionados anteriormente: una respuesta de CTL generándose CTL que pueden reconocer el complejo de HLA/péptido presentado sobre las superficies celulares dando como resultado la lisis celular, es decir la vacuna provoca la producción en el sujeto vacunado de células T efectoras que tienen un efecto citotóxico frente a las

células cancerosas; una respuesta de célula B dando lugar a la producción de anticuerpos contra el cáncer; y/o un tipo de DTH de respuesta inmunitaria.

5 En realizaciones útiles, se provoca una respuesta inmunogénica dirigida frente a una enfermedad de cáncer administrando el péptido de la invención o bien cargando moléculas de CMH de clase I en células presentadoras de antígeno (APC) del paciente, aislando PBL del paciente e incubando las células con el péptido antes de inyectar las células de nuevo en el paciente, o bien aislando APC precursoras del paciente y diferenciando las células en APC profesionales usando citocinas y el antígeno antes de inyectar las células de nuevo en el paciente.

10 Por tanto, es un aspecto de la invención proporcionar composiciones de vacuna que comprenden células presentadoras de antígeno que comprenden una proteína Bcl-X_L o un fragmento peptídico de la misma o un ácido nucleico que codifica para dicha proteína o dicho fragmento peptídico. La célula presentadora de antígeno puede ser cualquier célula que pueda presentar un antígeno a una célula T. Células presentadoras de antígeno preferidas son células dendríticas. Las células dendríticas (DC) pueden prepararse y usarse en un procedimiento terapéutico según cualquier protocolo adecuado, por ejemplo tal como se describe a continuación en el presente documento. El experto en la técnica apreciará que el protocolo puede adaptarse para usarse en pacientes con tipo de HLA diferente y enfermedades diferentes.

15 Se someten las células dendríticas (DC) a pulsos con péptido restringido a HLA 50 µg/ml (sintetizado según la calidad de GMP) durante 1 h a 37°C péptido y 5 x 10⁶ células se administran por vía subcutánea en el día 1 y 14, posteriormente cada 4 semanas, leucoforesis adicional tras 5 vacunaciones. La generación de DC para su uso clínico y el control de calidad pueden realizarse esencialmente tal como se describe en la referencia 5.

20 Por tanto, en una realización de la presente invención, un péptido tal como se reivindica para su uso en un método para tratar a pacientes con cáncer es uno en el que el péptido se administra presentando el péptido a las células presentadoras de antígeno (APC) del paciente *ex vivo* seguido por administrar las APC tratadas de este modo al paciente. Existen al menos dos modos alternativos de realizarlo. Una alternativa es aislar APC del paciente con cáncer e incubar (cargar) las moléculas de CMH de clase I con el péptido. Cargar las moléculas de CMH de clase I significa incubar las APC con el péptido de modo que las APC con las moléculas de CMH de clase I específicas para el péptido se unirán al péptido y por tanto podrán presentarlo a las células T. Posteriormente, las APC se administran al paciente. Otro modo alternativo se basa en descubrimientos recientes realizados en el campo de la biología de las células dendríticas. En este caso, se aíslan monocitos (que son precursores de células dendríticas) del paciente y se diferencia *in vitro* en APC profesionales (o células dendríticas) mediante el uso de citocinas y el antígeno. Posteriormente, se someten a pulsos las DC generadas *in vitro* con el péptido y se administran al paciente.

30 Debido al hecho de que Bcl-X_L parece expresarse en una gama de formas de cáncer, es muy probable que las vacunas de la invención puedan proporcionarse para controlar cualquier tipo de enfermedad de cáncer en la que se expresen tales proteínas. Por tanto, como ejemplos, la composición de vacuna de la invención es inmunológicamente activa frente a un tumor maligno hematopoyético incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mieloide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer de cérvix, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata.

35 A partir de la descripción anterior, el experto comprenderá fácilmente que las proteínas y/o los péptidos de la invención son útiles como herramientas de diagnóstico del cáncer. Por tanto, los péptidos de la invención proporcionan la base para desarrollar procedimientos de diagnóstico y pronóstico ampliamente aplicables con respecto a las enfermedades de cáncer. Por tanto, en otras realizaciones útiles, la composición de la invención es una composición para el diagnóstico *ex vivo* de la presencia en un paciente con cáncer, por ejemplo basado en la detección de células T reactivas con Bcl-X_L entre PBL o en tejido tumoral.

40 En consecuencia, se proporciona, todavía en aspectos adicionales, un kit de diagnóstico para el diagnóstico *ex vivo* de la presencia en un paciente con cáncer de células T reactivas con Bcl-X_L entre PBL o en tejido tumoral que comprende uno o más péptidos de la invención, y un método de detección en un paciente con cáncer de la presencia de tales células T reactivas, comprendiendo el método poner en contacto un tejido tumoral o una muestra de sangre con un complejo de un péptido de la invención y una molécula de HLA de clase I o un fragmento de tal molécula y detectar la unión del complejo al tejido o las células sanguíneas.

45 Otro enfoque de diagnóstico o pronóstico útil se basa en la generación de anticuerpos en una especie animal heteróloga, por ejemplo anticuerpos murinos dirigidos frente a un péptido derivado de Bcl-X_L humano de la invención, que puede usarse luego, por ejemplo para diagnosticar la presencia de células cancerosas que presentan el péptido. Para tales fines de inmunización, la cantidad de péptido puede ser inferior a la usada en el transcurso del tratamiento *in vivo*, tal como el mencionado anteriormente. En general, una dosis preferida puede oscilar desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 750 µg de péptido. También es posible producir anticuerpos monoclonales basándose en la inmunización con un péptido de la invención. En consecuencia, la presente invención se refiere también a una molécula, en particular un anticuerpo monoclonal o policlonal incluyendo un fragmento del mismo, que puede unirse específicamente a un péptido de la invención y a una molécula que puede bloquear una unión de este tipo, por ejemplo un anticuerpo generado frente al anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido frente a un péptido de la invención. La invención se refiere además a receptores de célula T aislados que pueden unirse

específicamente a un péptido o una proteína de la invención así como a ácidos nucleicos aislados que codifican para los mismos. Tales receptores de célula T pueden clonarse por ejemplo a partir de células T específicas de proteína o péptido usando técnicas convencionales bien conocidas por el experto.

5 En un aspecto, la invención se refiere también a células T aisladas que comprenden receptores de célula T que pueden unirse específicamente a Bcl-X_L y/o fragmentos peptídicos de la misma descritos en el presente documento. Las células T aisladas son preferiblemente células T que se han expandido *in vitro*. Métodos para expandir células T *in vitro* son muy conocidos por el experto. Tales células T pueden ser útiles en particular en el tratamiento del cáncer mediante transferencia adaptativa o transferencia de células autólogas. Por tanto, la invención se refiere también al uso de células T que comprenden receptores de célula T que pueden unirse específicamente a Bcl-X_L o fragmentos peptídicos de la misma para su uso en el tratamiento de cáncer. La invención se refiere además al uso de células T que comprenden receptores de célula T que pueden unirse específicamente a Bcl-X_L o fragmentos peptídicos de la misma para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La transferencia de células autólogas puede realizarse esencialmente tal como se describe en la referencia 7.

15 En un aspecto, la invención proporciona un complejo de un péptido de la invención y una molécula de HLA de clase I o un fragmento de tal molécula, que es útil como reactivo de diagnóstico tal como se describió anteriormente. Un complejo de este tipo puede ser monomérico o multimérico.

20 La presente invención proporciona los medios para aliviar o curar una enfermedad de cáncer. En consecuencia, un aspecto adicional de la invención es proporcionar un péptido tal como se reivindica para su uso en un método para tratar una enfermedad de cáncer asociada a la expresión de Bcl-X_L, incluyendo como ejemplos: un tumor maligno hematopoyético incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mieloide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer de cérvix, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata, comprendiendo el método administrar a un paciente que padece la enfermedad una cantidad eficaz de la composición farmacéutica según la invención, una molécula que puede unirse específicamente a un péptido de la invención y/o una molécula que puede bloquear la unión de una molécula de este tipo.

25 En algunos casos será apropiado combinar el péptido tal como se reivindica para su uso en el método de tratamiento de la invención con un tratamiento convencional contra el cáncer tal como quimioterapia, radioterapia, tratamiento con sustancias inmunoestimulantes, terapia génica, tratamiento con anticuerpos y tratamiento usando células dendríticas. Puesto que la expresión elevada de miembros de la familia de proteínas Bcl-2 en células tumorales está correlacionada con la resistencia a fármacos, la combinación de una inmunoterapia a base de Bcl-X_L tal como se da a conocer mediante la presente invención con quimioterapia citotóxica podría ser un enfoque eficaz para tratar el cáncer.

30 En un aspecto, la solicitud da a conocer métodos para monitorizar la inmunización, comprendiendo dicho método las etapas de

- 35 i) proporcionar una muestra de sangre de un individuo
- ii) proporcionar una proteína Bcl-X_L o un fragmento peptídico de la misma, pudiendo ser dicha proteína o dicho péptido cualquiera de las proteínas o los péptidos descritos en el presente documento
- iii) determinar si dicha muestra de sangre comprende anticuerpos o células T que comprenden receptores de célula T que se unen específicamente a la proteína o el péptido
- 40 iv) determinar de ese modo si se ha generado una respuesta inmunitaria a dicha proteína o dicho péptido en dicho individuo.

El individuo es preferiblemente un ser humano, por ejemplo un ser humano que se ha inmunizado con una proteína Bcl-X_L o un fragmento peptídico de la misma o un ácido nucleico que codifica para dicha proteína o dicho péptido.

También se dan a conocer los siguientes puntos.

45 1. Una composición de vacuna que comprende una proteína aislada que pertenece a la familia de proteínas Bcl-2 o un fragmento peptídico inmunogénicamente activo de la misma o un ácido nucleico que codifica para dicha proteína o dicho fragmento peptídico para su uso como medicamento.

2. La composición del punto 1, pudiendo la composición de vacuna, cuando se administra a un paciente con cáncer, provocar una respuesta inmunitaria frente a la enfermedad de cáncer.

50 3. La composición del punto 1, pudiendo la composición de vacuna, cuando se administra a un paciente con cáncer en el que se expresa un miembro de la familia de proteínas Bcl-2, provocar una respuesta inmunitaria frente a la enfermedad de cáncer.

4. La composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 a 3, en la que la proteína se selecciona del grupo que consiste en miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2.

5. La composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 a 3, en la que la proteína se selecciona del grupo que consiste en Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1/A1, Bcl-b, Bcl2-L-10 y Bcl-X_L.
6. La composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 a 3, en la que la proteína se selecciona del grupo que consiste en Bax, Bok/Mtd, Bad, Bik/Nbk, Bid, Hrk/DP5, Bim, Noxa, Bmf y PUMA/bbc3.
- 5 7. La composición de vacuna del punto 5, en la que la proteína es Bcl-2.
8. La composición de vacuna del punto 5, en la que la proteína es Bcl-X_L.
9. La composición de vacuna según el punto 5, en la que la proteína es Mcl-1.
10. Un fragmento peptídico inmunogénicamente activo aislado derivado de una proteína que pertenece a la familia de proteínas Bcl-2 para su uso como medicamento en la prevención o el tratamiento de un cáncer.
- 10 11. El fragmento peptídico según el punto 10, en el que la proteína se selecciona del grupo que consiste en Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1/A1, Bcl-b, Bcl2-L-10 y Bcl-X_L.
12. El fragmento peptídico según el punto 10, en el que la proteína se selecciona del grupo que consiste en Bax, Bok/Mtd, Bad, Bik/Nbk, Bid, Hrk/DP5, Bim, Noxa, Bmf y PUMA/bbc3.
13. El fragmento peptídico según el punto 11, en el que la proteína es Bcl-2.
- 15 14. El fragmento peptídico según el punto 11, en el que la proteína es Bcl-X_L.
15. El fragmento peptídico según el punto 11, en el que la proteína es Mcl-1.
16. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 15, que puede provocar una respuesta inmunitaria celular en un paciente con cáncer.
17. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 16, que es un péptido restringido a CMH de clase I que tiene al menos una de las siguientes características:
- 20 (i) puede unirse a la molécula de HLA de clase I a la que está restringido a una afinidad tal como se mide mediante la cantidad del péptido que puede realizar la mitad de la recuperación máxima de la molécula de HLA de clase I (valor C₅₀) que es como máximo de 50 μM tal como se determina mediante el ensayo de unión-ensamblaje tal como se describe en el presente documento,
- 25 (ii) puede provocar células productoras de INF-γ en una población de PBL de un paciente con cáncer a una frecuencia de al menos 1 por 10⁴ PBL tal como se determina mediante un ensayo ELISPOT y/o
- (iii) puede detectar *in situ* en un tejido tumoral CTL que son reactivos con el péptido de epítipo.
18. El fragmento peptídico del punto 17 que tiene un valor C₅₀ que es como máximo de 30 μM
19. El fragmento peptídico del punto 17 que tiene un valor C₅₀ que es como máximo de 20 μM.
- 30 20. El fragmento peptídico del punto 17, que está restringido por una molécula de HLA-A del CMH de clase I.
21. El fragmento peptídico del punto 20, que está restringido por una especie de HLA del CMH de clase I seleccionada del grupo que consiste en HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 y HLA-A24.
22. El fragmento peptídico del punto 17, que está restringido por HLA-A2.
23. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 11 y 16 a 19, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en ALVGACITL (SEQ ID NO:1), ALSPVPPVV (SEQ ID NO:2), SLALVGACI (SEQ ID NO:3), KTLLSLALV (SEQ ID NO:4), LLSLALVGA (SEQ ID NO:5), WLSLKTLLSL (SEQ ID NO:6), AAAGPALSPV (SEQ ID NO: 7), PLDFSWLSL (SEQ ID NO:8), FTARGRFATV (SEQ ID NO:9), YLNRHLHTWI (SEQ ID NO:10), NIALWMTEYL (SEQ ID NO:11).
- 35 24. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 11 y 16 a 19, en el que el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en TAYQSFEQV (SEQ ID NO:43), YLNDHLEPWI (SEQ ID NO: 42), RIAAWMATYL (SEQ ID NO:45), WMATYLNDHL (SEQ ID NO:46), VLVSRIAAWM (SEQ ID NO: 48) y VAFFSFGGAL (SEQ ID NO: 49).
- 40 25. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 11 y 16 a 19, en el que el péptido comprende la secuencia RIAAWMATY (SEQ ID NO:50).
- 45 26. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 11 y 16 a 19, en el que el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en RLLFFAPTR (SEQ ID NO:55) y RTKRDWLVK (SEQ ID NO:56)

ES 2 436 429 T3

27. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 11 y 16 a 19, en el que el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en PAEEEEDDL Y (SEQ ID NO:58) y QSLEIISRY (SEQ ID NO:60).
28. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 11 y 16 a 19, en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en RLKRDWLVK (SEQ ID NO:62), QSDEIISRY (SEQ ID NO:63) y QSEEIISRY (SEQ ID NO:64).
- 5 29. El fragmento peptídico del punto 17, que está restringido por una molécula de HLA-B del CMH de clase I.
30. El fragmento peptídico del punto 29, que está restringido por una especie de HLA-B del CMH de clase I seleccionada del grupo que consiste en HLA-B7, HLA-B35, HLA-B44, HLA-B8, HLA-B15, HLA-B27 y HLA-B51.
31. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 30 que comprende como máximo 20 residuos de aminoácido.
- 10 32. El fragmento peptídico del punto 31 que comprende como máximo 15 residuos de aminoácido.
33. El fragmento peptídico del punto 32, que es un nonapéptido o un decapeptido.
34. La proteína o el fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 33, que es una secuencia nativa aislada o derivada de una especie de mamífero.
35. La proteína o el fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 34, siendo la proteína una proteína humana.
- 15 36. La proteína o el fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 33, que se deriva de una secuencia de un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 nativa sustituyendo, delecionando o añadiendo al menos un residuo de aminoácido.
37. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 36 que comprende, para cada alelo de HLA específico, cualquiera de los residuos de aminoácido indicados en la siguiente tabla:
- 20

Alelo de HLA	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 5	Posición 6	Posición 7	C-terminal
HLA-A1		T,S	D,E			L	Y
HLA-A2		L,M			V		L,V
HLA-A3		L,V,M	F,Y				K,Y,F
HLA-A11		V,I,F,Y	M,L,F,Y, I				K,R
HLA-A23		I,Y					W,I
HLA-A24		Y		I,V	F		I,L,F
HLA-A25		M,A,T	I				W
HLA-A26	E,D	V,T,I,L,F			I,L,V		Y,F
HLA-A28	E,D	V,A,L					A,R
HLA-A29		E					Y,L
HLA-A30		Y,L,F,V					Y
HLA-A31			L,M,F,Y				R
HLA-A32		I,L					W
HLA-A33		Y,I,L,V					R
HLA-A34		V,L					R
HLA-A66	E,D	T,V					R,K
HLA-A68	E,D	T,V					R,K
HLA-A69		V,T,A					V,L
HLA-A74		T					V,L

HLA-B5		A,P	F,Y			I,L
HLA-B7	*	P				L,F
HLA-B8			K	K,R		L
HLA-B14		R,K				L,V
HLA-B15 (B62)		Q,L,K,P, H,V,I,M, S,T				F,Y,W
HLA-B17						L,V
HLA-B27		R				Y,K,F,L
HLA-B35		P				I,L,M,Y
HLA-B37		D,E				I,L,M
HLA-B38		H	D,E			F,L
HLA-B39		R,H				L,F
HLA-B40 (B60,61)		E	F,I,V			L,V,A,W, M,T,R
HLA-B42		L,P				Y,L
HLA-B44		E				F,Y,W
HLA-B46		M,I,L,V				Y,F
HLA-B48		Q,K				L
HLA-B51		A,P,G				F,Y,I,V
HLA-B52		Q	F,Y			I,V
HLA-B53		P				W,F,L
HLA-B54		P				
HLA-B55		P				A,V
HLA-B56		P				A,V
HLA-B57		A,T,S				F,W,Y
HLA-B58		A,T,S				F,W,Y
HLA-B67		P				L
HLA-B73		R				P
HLA-Cw1		A,L				L
HLA-Cw2		A,L				F,Y
HLA-Cw3		A,L				L,M
HLA-Cw4		Y,P,F				L,M,F,Y
HLA-Cw6						L,I,V,Y
HLA-Cw6		Y				L,Y,F
HLA-Cw8		Y				L,I,

HLA-Cw16		A,L				L,V
----------	--	-----	--	--	--	-----

38. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 37 que puede provocar células productoras de INF- γ en una población de PBL de un paciente con cáncer a una frecuencia de al menos 10 por 10⁴ PBL.
39. El fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 38, que puede provocar células productoras de INF- γ en una población de PBL de un paciente que tiene una enfermedad de cáncer en la que se expresa una proteína que pertenece a la familia de proteínas Bcl-2.
40. El fragmento peptídico del punto 39 en el que la enfermedad de cáncer se selecciona del grupo que consiste en un tumor maligno hematopoyético incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mieloide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer de cérvix, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata.
41. La composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 a 9 que comprende el fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 40.
42. La composición de vacuna del punto 41 que comprende un fragmento peptídico según el punto 18 en combinación con un fragmento peptídico según el punto 29.
43. La composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 a 9 y 41 a 42 en la que la vacuna provoca la producción en un paciente vacunado de células T efectoras que tienen un efecto citotóxico frente a las células cancerosas.
44. La composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 a 9 y 41 a 43 que comprende además una proteína o fragmento peptídico inmunogénico seleccionado de una proteína o fragmento peptídico que no pertenece o se deriva de la familia de proteínas Bcl-2.
45. La composición de vacuna del punto 44 en la que la proteína o fragmento peptídico que no pertenece o se deriva de la familia de proteínas Bcl-2 es una proteína implicada en la regulación de la apoptosis de células o un fragmento peptídico derivado de la misma.
46. La composición de vacuna del punto 44 en la que la proteína o el fragmento peptídico inmunogénico seleccionado de una proteína o un fragmento peptídico que no pertenece o se deriva de la familia de proteínas Bcl-2 es survivina o un fragmento peptídico derivado de la misma.
47. La composición de vacuna del punto 44 en la que la proteína o el fragmento peptídico inmunogénico seleccionado de una proteína o un fragmento peptídico que no pertenece o se deriva de la familia de proteínas Bcl-2 es ML-IAP o un fragmento peptídico de la misma.
48. La composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 a 9 y 41 a 47, comprendiendo la composición un adyuvante.
49. La composición de vacuna según el punto 48, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en adyuvantes a base de ADN bacteriano, adyuvantes a base de aceite/tensioactivo, adyuvantes a base de ARN bicatenario viral e imidazoquinilinas.
50. La composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 a 9 y 41 a 49, comprendiendo la composición de vacuna células presentadoras de antígeno que comprenden la proteína o el fragmento peptídico o el ácido nucleico.
51. La composición de vacuna según el punto 50, en la que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.
52. La composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 a 9 y 41 a 51, comprendiendo la composición un liposoma.
53. La composición de vacuna según el punto 1, en la que el ácido nucleico codifica para el péptido según cualquiera de los puntos 10 a 40.
54. La composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 y 53, en la que el ácido nucleico está comprendido dentro de un vector.
55. La composición de vacuna según el punto 54, en la que el vector se selecciona del grupo que consiste en vectores virales y vectores bacterianos.
56. La composición de vacuna según cualquiera de los puntos 54 a 55, en la que el vector comprende además ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido estimulador de células T.

57. La composición de vacuna según el punto 56, en la que el polipéptido estimulador de células T se selecciona del grupo que consiste en B7.1, ICAM-1 y LFA-3.
58. Un kit de partes que comprende la composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 a 9 y 41 a 57, y un agente anticancerígeno adicional.
- 5 59. El kit de partes según el punto 58, en el que el agente anticancerígeno es un anticuerpo
60. El kit de partes según el punto 59, en el que el agente anticancerígeno es una citocina.
61. Una composición para el diagnóstico *ex vivo* o *in situ* de la presencia en un paciente con cáncer de células T en PBL o en tejido tumoral que son reactivas con un miembro de la familia de proteínas Bcl-2, comprendiendo la composición un fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 40.
- 10 62. Un kit de diagnóstico para el diagnóstico *ex vivo* o *in situ* de la presencia en un paciente con cáncer de células T en PBL o en tejido tumoral que son reactivas con un miembro de la familia de proteínas Bcl-2, comprendiendo el kit un fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 40.
63. Un complejo de un fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 40 y una molécula de HLA de clase I o un fragmento de una molécula de ese tipo.
- 15 64. El complejo del punto 63 que es monomérico.
65. El complejo del punto 63 que es multimérico.
66. Un método de detección en un paciente con cáncer de la presencia de células T reactivas con un miembro de la familia de proteínas Bcl-2, comprendiendo el método poner en contacto un tejido tumoral o una muestra de sangre con un complejo del punto 63 y detectar la unión del complejo con el tejido o las células sanguíneas.
- 20 67. Una molécula que puede unirse específicamente a un fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 40.
68. La molécula del punto 67 que es un anticuerpo o un fragmento del mismo.
69. La molécula según el punto 67, siendo la molécula un receptor de células T.
70. Una molécula que puede bloquear la unión de la molécula del punto 67 ó 69.
- 25 71. Un método de tratamiento de una enfermedad de cáncer, comprendiendo el método administrar a un paciente que padece la enfermedad una cantidad eficaz de la composición según cualquiera de los puntos 1 a 9 y 41 a 57, la molécula del punto 67 o la molécula del punto 70 o el kit de partes según cualquiera de los puntos 58 a 60.
72. El método del punto 71 en el que la enfermedad que va a tratarse es una enfermedad de cáncer en la que se expresa un miembro de la familia de proteínas Bcl-2.
- 30 73. El método del punto 71 en el que la enfermedad de cáncer se selecciona del grupo que consiste en tumor maligno hematopoyético incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mieloide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer de cérvix, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata.
74. El método del punto 71, que se combina con un tratamiento contra el cáncer adicional.
- 35 75. El método del punto 71 en el que el tratamiento adicional se selecciona del grupo que consiste en quimioterapia, radioterapia, tratamiento con sustancias inmunoestimulantes, terapia génica, tratamiento con anticuerpos y tratamiento usando células dendríticas
- 40 76. Uso del fragmento peptídico según cualquiera de los puntos 10 a 40 o la composición de vacuna según cualquiera de los puntos 1 a 9 y 41-57 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad de cáncer.
77. El uso del punto 76 en el que la enfermedad que va a tratarse es una enfermedad de cáncer en la que se expresa un miembro de la familia de proteínas Bcl-2.
- 45 78. El uso según cualquiera de los puntos 76-77 en el que la enfermedad de cáncer se selecciona del grupo que consiste en un tumor maligno hematopoyético incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mieloide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer de cérvix, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata.
79. El uso según cualquiera de los puntos 76-78, que se combina con un tratamiento contra el cáncer adicional.

80. El uso del punto 79 en el que el tratamiento adicional se selecciona del grupo que consiste en quimioterapia, radioterapia, tratamiento con sustancias inmunoestimulantes, terapia génica, tratamiento con anticuerpos y tratamiento usando células dendríticas.

81. Un método de monitorización de la inmunización, comprendiendo dicho método las etapas de

5 i) proporcionar una muestra de sangre de un individuo

ii) proporcionar una proteína que pertenece a la familia de proteínas Bcl-2 o un fragmento peptídico de la misma

iii) determinar si dicha muestra de sangre comprende anticuerpos o células T que comprenden receptores de células T que se unen específicamente a la proteína o el péptido

10 iv) determinar de ese modo si se ha generado una respuesta inmunitaria frente a dicha proteína o péptido en dicho individuo.

82. El método según el punto 81, en el que el fragmento peptídico es un fragmento peptídico según cualquiera de los puntos.

83. Una célula T aislada que comprende un receptor de células T según el punto 69.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitativos y los dibujos en los que

15 La figura 1 muestra la identificación de péptidos de unión a HLA-A2 de Bcl-2. Las bandas de cadena pesada del CMH de clase I se cuantificaron usando un aparato Phosphorimager. La cantidad de cadena pesada de HLA-A2 estabilizada está directamente relacionada con la afinidad de unión del péptido añadido. La unión del péptido control positivo restringido a HLA-A2 VIH Pol₄₇₆ (cuadrado en negro) se comparó con los péptidos Bcl₁₇₂ (triángulo en negro), Bcl₁₈₀ (círculo en negro) y Bcl₂₀₀ (círculo en blanco) y

20 La figura 2 ilustra la respuesta de células T frente a los péptidos Bcl₁₇₂, Bcl₁₈₀, Bcl₂₀₈ y Bcl₂₁₄. Se analizaron PBL de 15 pacientes con cáncer de mama. Se estimularon los linfocitos T una vez con el péptido antes de sembrarlos en placa a 10⁵ células por pocillo por triplicado o bien sin o bien con péptido. El número promedio de puntos específicos de péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) se calculó para cada paciente usando el analizador ImmunoSpot[®] serie 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, EE.UU.).

25 La figura 3 ilustra la respuesta de células T frente a Bcl-2 tal como se mide mediante ELISPOT de INF- γ . Se analizaron PBL de diez pacientes con LLC positivos para HLA-A2, tres pacientes con LMA positivos para HLA-A2 y dos pacientes con cáncer pancreático (PC). Se examinaron los péptidos Bcl₂₀₈ (A) y Bcl₂₁₄ (B). Se estimularon los linfocitos T una vez con el péptido antes de sembrarse en placa a 10⁵ células por pocillo por triplicado o bien sin o bien con péptido. El número promedio de puntos específicos de péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) se calculó para cada paciente usando el analizador ImmunoSpot[®] serie 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, EE.UU.). Los pacientes que responden al tratamiento (definido como el número promedio de puntos específicos de antígeno \pm 1/2 de la desviación estándar > 25 por 10⁵ linfocitos) están marcados como cuadrados en negro, mientras que los individuos que no responden están marcados como cuadrados en blanco.

35 La figura 4 ilustra la detección de CTL específicos de Bcl-2 mediante ELISPOT de granzima B. Se estimularon linfocitos T de cuatro pacientes con cáncer de mama en diferente estadio tardío (b19, b20, b22, b16) y un control sano (h1) una vez con el péptido antes de sembrarse en placa a 10⁵ células por pocillo por triplicado o bien sin o bien con péptido Bcl₂₀₈ (A) o Bcl₂₁₄ (B). El número promedio de puntos de granzima B específicos de péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) se calculó para cada paciente usando el analizador ImmunoSpot[®] serie 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, EE.UU.). Los pacientes que responden al tratamiento (definido como el número promedio de puntos específicos de antígeno \pm 1/2 de la desviación estándar > 25 por 10⁵ linfocitos) están marcados como cuadrados en negro, mientras que los individuos que no responden están marcados como cuadrados en blanco.

45 La figura 5 ilustra la capacidad citolítica de CTL específicos de Bcl-2. Se aislaron CTL reactivos para bcl₂₀₈ de PBL de un paciente con cáncer de mama usando perlas magnéticas recubiertas con HLA-A2/bcl₂₀₈. A) Se analizó el cultivo en masa aislado para determinar la lisis específica de células T2 con (cuadrado en negro) o sin (cuadrado en blanco) péptido bcl₂₀₈. B) Lisis mediante células T aisladas por bcl₂₀₈ de la línea celular de cáncer de mama positivas para HLA-A2 MDA-MB-231 (círculo en negro) y la línea celular de cáncer de mama negativas para HLA-A2 ZR75-1 (círculo en blanco).

50 La figura 6 ilustra las respuestas de célula T restringidas por HLA-A2 frente a Bcl-X_L tal como se mide mediante ELISPOT de INF- γ . Se analizaron PBL de doce individuos sanos, dieciocho pacientes con cáncer de mama (pacientes BC), seis pacientes con melanoma y dos pacientes con cáncer pancreático (pacientes PC). Todos los individuos eran positivos para HLA-A2. Se examinaron los péptidos Bcl-X_L₁₇₃₋₁₈₂ (YLNDHLEPWI) (SEQ ID NO:48) (A), Bcl-X_L₁₄₁₋₁₅₀ (VAFFSFGGAL) (SEQ ID NO:49) (B), Bcl-X_L₁₆₁₋₁₇₀ (VLVSRIAAMW) (SEQ ID NO:48) (C), y Bcl-X_L₁₆₅₋₁₇₄ (RIAAMWATYL) (SEQ ID NO:45) (D). Se estimularon los linfocitos T una vez con péptido antes de sembrarse en

placa a 10^5 células por pocillo por triplicado o bien sin o bien con el péptido relevante. Se calculó el número promedio de puntos específicos de péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) para cada paciente usando el analizador ImmunoSpot® serie 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, EE.UU.). Los pacientes que responden al tratamiento (definido como el número promedio de puntos específicos de antígeno $\pm \frac{1}{2}$ de la desviación estándar > 25 por 10^5 linfocitos) están marcados como cuadrados en negro, mientras que los individuos que no responden están marcados como cuadrados en blanco.

La figura 7 ilustra la detección de CTL específicos de Bcl-X_L mediante ELISPOT de granzima B. Se estimularon los linfocitos T de tres pacientes con cáncer de mama diferentes (BC35, BC36 y BC17) una vez con el péptido antes de sembrarse en placa a 3×10^5 células por pocillo por triplicado o bien sin o bien con péptido Bcl-X_{L173-182} (YLNDHLEPWI). Se calculó el número promedio de puntos de granzima B específicos de péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) para cada paciente usando el analizador ImmunoSpot® serie 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, EE.UU.). Los pacientes que responden al tratamiento (definido como el número promedio de puntos específicos de antígeno $\pm \frac{1}{2}$ de la desviación estándar > 25 por 10^5 linfocitos) están marcados como cuadrados en negro, mientras que los individuos que no responden están marcados como cuadrados en blanco.

La figura 8 ilustra el análisis de células CD8 positivas, específicas de Bcl-X_L, en PBL de un paciente con cáncer de mama. Se estimularon PBL del paciente BC36 una vez con Bcl-X_{L173-182} *in vitro* y se aislaron las células CD8+ antes del análisis. La tinción de FACS del cultivo usando un anticuerpo anti-CD8 y el complejo de pentámero HLA-A2/Bcl-X_{L173-182} reveló que el 95,5% de las células eran CD8 positivas y el 0,24% de éstas eran positivas para el pentámero (A). Se usó el pentámero HLA-A2/VIH como control negativo (B). Se analizó el cultivo celular adicionalmente por medio de ELISPOT (C).

La figura 9 ilustra las respuestas de célula T restringidas por HLA-A2 frente a Bcl-X_L tal como se mide mediante ELISPOT de INF- γ . Se analizaron PBL de doce individuos sanos, dieciocho pacientes con cáncer de mama (pacientes BC), seis pacientes con melanoma y dos pacientes con cáncer pancreático (pacientes PC). Todos los individuos era positivos para HLA-A2. Se examinaron los péptidos Bcl-X_{L118-126} (TAYQSFEQV) (SEQ ID NO:43) (A) y Bcl-X_{L169-178} (WMATYLNHDL) (SEQ ID NO:46) (B). Se estimularon los linfocitos T una vez con péptido antes de sembrarse en placa a 10^5 células por pocillo por triplicado o bien sin o bien con el péptido relevante. Se calculó el número promedio de puntos específicos de péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) para cada paciente usando el analizador ImmunoSpot® serie 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, EE.UU.). Los pacientes que responden al tratamiento (definido como el número promedio de puntos específicos de antígeno $\pm \frac{1}{2}$ de la desviación estándar > 25 por 10^5 linfocitos) están marcados como cuadrados en negro, mientras que los individuos que no responden están marcados como cuadrados en blanco.

La figura 10 ilustra las respuestas de célula T restringidas por HLA-A3 frente a Bcl-X_L tal como se mide mediante ELISPOT de INF- γ . Se estimularon los linfocitos T una vez con péptido antes de sembrarse en placa a 10^5 células por pocillo por triplicado o bien sin o bien con el péptido Bcl-X_{L165-173} (RIAAWMATY) (SEQ ID NO:50). Se examinaron PBL de siete individuos sanos, cinco pacientes con cáncer de mama, cuatro pacientes con melanoma, dos pacientes con cáncer pancreático, y cinco pacientes con mieloma múltiple. Todos los individuos eran positivos para HLA-A3. Se calculó el número promedio de puntos específicos de péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) para cada paciente usando el analizador ImmunoSpot® serie 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, EE.UU.).

La figura 11 ilustra las respuestas de célula T restringidas por HLA-A3 frente a Mcl-1 tal como se mide mediante ELISPOT de INF- γ . Se estimularon los linfocitos T una vez con péptido antes de sembrarse en placa a 3×10^5 células por pocillo por triplicado o bien sin o bien con el péptido. Se examinaron PBL de diez individuos sanos, seis pacientes con cáncer de mama (BC), dos pacientes con cáncer pancreático (PC), y seis pacientes con LLC frente al péptido Mcl-1₉₅₋₁₀₃ (izquierda) y el péptido Mcl-1₃₀₀₋₃₀₈ (derecha). Todos los individuos eran positivos para HLA-A3. Se calculó el número promedio de puntos específicos de péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) para cada paciente usando el analizador ImmunoSpot® serie 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, EE.UU.). Los pacientes que responden al tratamiento (definido como el número promedio de puntos específicos de antígeno $\pm \frac{1}{2}$ de la desviación estándar > 25 por 10^5 linfocitos) están marcados como cuadrados en negro, mientras que los individuos que no responden están marcados como cuadrados en blanco.

La figura 12 ilustra las respuestas de célula T restringidas por HLA-A1 frente a Mcl-1 tal como se mide mediante ELISPOT de INF- γ . Se estimularon los linfocitos T una vez con péptido antes de sembrarse en placa a 3×10^5 células por pocillo por triplicado o bien sin o bien con el péptido Mcl-1₁₆₆₋₁₇₅ o Mcl-1₁₇₇₋₁₈₅. Se examinaron PBL de seis individuos sanos, cuatro pacientes con cáncer de mama (BC) y siete pacientes con melanoma frente al péptido Mcl-1₉₅₋₁₀₃ (izquierda) y el péptido Mcl-1₃₀₀₋₃₀₈ (derecha). Todos los individuos eran positivos para HLA-A1. El número promedio de puntos específicos de péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) se calculó para cada paciente usando el analizador ImmunoSpot® serie 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, EE.UU.). Los pacientes que responden al tratamiento (definido como el número promedio de puntos específicos de antígeno $\pm \frac{1}{2}$ de la desviación estándar > 25 por 10^5 linfocitos) están marcados como cuadrados en negro, mientras que los individuos que no responden están marcados como cuadrados en blanco.

Ejemplos

Ejemplo 1

Respuestas inmunitarias frente a Bcl-2 en pacientes con cáncer de mama

Materiales y métodos

1. *Pacientes*

5 Se recogieron linfocitos de sangre periférica (PBL) de pacientes con cáncer de mama. Se aislaron los PBL usando separación con Lymphoprep, se tipificaron para HLA (Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario, Copenhague, Dinamarca) y se congelaron en FCS con DMSO al 10%. Ninguno de los pacientes recibió inmunoterapia antes de la toma de la muestra de sangre.

2. *Ensayo de ensamblaje para la unión de péptidos a moléculas de CMH de clase I*

10 Se midió la afinidad de unión de los péptidos sintéticos (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) a moléculas HLA-A2, marcadas metabólicamente con [³⁵S]-metionina, en el ensayo de ensamblaje, tal como se describió anteriormente. El ensayo se basa en la estabilización mediada por péptidos de moléculas de HLA vacías liberadas tras la lisis celular, a partir de la línea celular T2 deficiente en TAP. Se inmunoprecipitaron moléculas de HLA plegadas de manera estable usando el AcM W6/32 dependiente de la conformación, específico de HLA de clase I, y se separaron mediante electroforesis en gel e isoelectroenfoque (IEF). Se cuantificaron las bandas de cadena pesada del CMH usando el programa ImageGauge Phosphorimager (FUJI photo film Co., Carrollton, TX, EE.UU.). La intensidad de la banda está directamente relacionada con la cantidad de complejo del CMH de clase I unido a péptido recuperado durante el ensayo. Posteriormente, el grado de estabilización de HLA-A2 se relaciona directamente con la afinidad de unión del péptido añadido. Se midió la recuperación de HLA-A2 en presencia de 50, 5, 0,5, 0,05 µM del péptido relevante. Se calculó el valor C₅₀ para cada péptido como la concentración de péptido suficiente para obtener la mitad de la estabilización máxima.

3. *Estimulación antigénica de PBL*

25 Para extender la sensibilidad del ensayo ELISPOT, se estimularon los PBL una vez *in vitro* antes del análisis. En el día 0, se descongelaron PBL o ganglios linfáticos triturados y se sembraron en placa en 2 ml/pocillo a una concentración de 2 x 10⁶ células en placas de 24 pocillos (Nunc, Dinamarca) en medio X-vivo (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland), suero humano inactivado con calor al 5% y 2 mM de L-glutamina en presencia de 10 µM de péptido. Dos días después, se añadió a los cultivos interleucina-2 (IL-2) recombinante 20 UI/ml (Chiron, Ratingen, Alemania). Se sometieron a prueba las células cultivadas para determinar su reactividad en el ELISPOT en el día 12.

4. *Ensayo ELISPOT*

30 Se usó el ensayo ELISPOT para cuantificar las células efectoras que liberan interferón-γ específicas de epítipo peptídico tal como se describió anteriormente (4). En resumen, se recubrieron placas de 96-pocillos con fondo de nitrocelulosa (MultiScreen MAIP N45, Millipore, Hedehusene, Dinamarca) con anticuerpo anti-IFN-γ (1-D1K, Mabtech, Nacka, Suecia). Se lavaron los pocillos, se bloquearon mediante medio X-vivo y se añadieron células por duplicado a diferentes concentraciones celulares. Entonces se añadieron péptidos a cada pocillo y se incubaron las placas durante la noche. Al día siguiente, se desechó el medio y se lavaron los pocillos antes de la adición de anticuerpo secundario biotinilado (7-B6-1-Biotin, Mabtech). Se incubaron las placas durante 2 horas, se lavaron y se añadió conjugado de avidina-enzima (AP-Avidin, Calbiochem, Life Technologies) a cada pocillo. Se incubaron las placas a TA durante 1 hora y se añadió el sustrato enzimático NBT/BCIP (Gibco, Life Technologies) a cada pocillo y se incubó a TA durante 5-10 min. Se puso fin a la reacción lavando con agua corriente tras el surgimiento de puntos de color púrpura oscuro. Se contaron los puntos usando el analizador ImmunoSpot® serie 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, EE.UU.) y pudo calcularse la frecuencia de CTL específicos de péptido a partir de los números de células que formaban puntos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para cada antígeno peptídico.

5. *Resultados*

Unión de péptidos derivados de Bcl-2 a HLA-A2

45 Se investigó la secuencia de aminoácidos de la proteína Bcl-2 para determinar los epítopos peptídicos de nona y decámero de HLA-A2 más probables, usando los residuos de anclaje específicos de HLA-A2 principales (2). Se sintetizaron trece péptidos derivados de Bcl-2 y se examinaron para determinar su unión a HLA-A2 mediante comparación con el epítipo control positivo de alta afinidad por HLA-A2, VIH-1 pol₄₇₆₋₄₈₄ (ILKEPVHGV) (SEQ ID NO:39) mediante el ensayo de ensamblaje. El ensayo de ensamblaje se basa en la estabilización de la molécula de clase I tras cargar diferentes concentraciones de péptido en la línea celular T2 deficiente en TAP. Posteriormente, se inmunoprecipitan cadenas pesadas del CMH estables plegadas correctamente usando anticuerpos dependientes de la conformación. El grado de estabilización de moléculas de CMH de clase I está directamente relacionado con la afinidad de unión del péptido añadido tal como se muestra como ejemplo en la figura 1. La concentración de péptido requerida para lograr la mitad de la recuperación máxima de moléculas de CMH de clase I (valor C₅₀) fue de 0,7 µM para el VIH-1 pol₄₇₆₋₄₈₄ (tabla 1). Ocho péptidos derivados de Bcl-2 se unieron con una alta afinidad casi similar al

control positivo; Bcl₂₂₄, Bcl₈₅, Bcl₂₂₂, Bcl₂₁₈, Bcl₂₂₀, Bcl₂₁₄, Bcl₁₂₄ y Bcl₁₇₂ (C₅₀ = 0,7, 1, 1, 2, 1, 3, 1 y 2 μM, respectivamente) (tabla 1). Los péptidos Bcl₈₀, Bcl₂₀₈ y Bcl₁₈₀ se unieron sólo con una afinidad intermedia o débil (C₅₀ = 36, 7 y 20 μM, respectivamente). Dos de los péptidos examinados (Bcl₂₁₆, Bcl₂₀₀) no se unieron a HLA-A2 en absoluto. En la tabla 1 se muestra una lista de los péptidos incluidos en este estudio:

5 **Tabla 1. Péptidos examinados en este estudio**

Proteína ^a	Secuencia	SEQ ID NO	C ₅₀ (μM) ^b
VIH-1 pol ₄₇₆	ILKEPVHGV	39	0,7
Bcl ₂₂₄	ALVGACITL	1	0,7
Bcl ₈₅	ALSPVPPVV	2	1
bcl ₂₂₂	SLALVGACI	3	1
bcl ₂₁₈	KTLLSLALV	4	2
bcl ₂₂₀	LLSLALVGA	5	1
bcl ₂₁₄	WLSLKTLLSL	6	3
bcl ₈₀	AAAGPALSPV	7	36
bcl ₂₁₆	SLKTLLSLAL	40	Sin unión
bcl ₂₀₈	PLFDFSWLSL	8	7
bcl ₁₂₄	FTARGRFATV	9	1
bcl ₁₈₀	YLNRLHHTWI	10	15
bcl ₁₇₂	NIALWMTEYL	11	2
bcl ₂₀₀	ELYGPSMRPL	41	Sin unión

^a El intervalo de valores enumerado en subíndices indica la posición del primer aminoácido en la secuencia

^b El valor C₅₀ es la concentración del péptido requerida para lograr la mitad de la unión máxima a HLA-A2

Respuestas de CTL frente a péptidos derivados de BCL-2 en pacientes con cáncer de mama tratados con quimioterapia

10 Usando el ensayo de secreción de IFN-γ ELISPOT, se examinó la presencia de respuestas de células T específicas frente a los péptidos derivados de Bcl-2 en células T de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama. Este método ha sido anteriormente altamente eficaz cuando se identificaban CTL específicos de tumores en pacientes con cáncer.

15 Se estimularon una vez *in vitro* PBL de 15 pacientes con cáncer de mama positivos para HLA-A2 antes del examen en el ELISPOT. Se eligió este procedimiento para extender la sensibilidad del ELISPOT tal como se describió (4). Puesto que muchos epítomos de CTL descritos son de hecho péptidos de baja afinidad, se incluyeron los trece péptidos deducidos de Bcl-2 en la primera línea de experimentos. Se detectaron respuestas frente a Bcl₁₇₂, Bcl₁₈₀, Bcl₂₀₈ y Bcl₂₁₄ y en la figura 2 se facilitan sólo datos de estos péptidos. Se detectaron respuestas de CTL espontáneas frente a Bcl₁₇₂ en PBL de ocho de los pacientes (50%), y frente a Bcl₁₈₀ en cuatro de los pacientes (≈25%) (figura 2). Sin embargo, las respuestas más frecuentes se detectaron frente a Bcl₂₀₈ y Bcl₂₁₄, ya que doce (≈80%) de los pacientes albergaron una respuesta de CTL detectable frente a Bcl₂₀₈ y once de los pacientes (≈75%) albergaron una respuesta frente a Bcl₂₁₄ (figura 2).

Ejemplo 2

Inmunogenicidad de Bcl-2 en pacientes con cáncer

25 Resumen

En este ejemplo, se describe la reactividad de células T espontánea frente a Bcl-2 en sangre periférica de pacientes que padecen tipos de tumores no relacionados, es decir, cáncer pancreático, AML y CLL. Adicionalmente, se muestra que estas células T reactivas frente a Bcl-2 son de hecho células efectoras citotóxicas, específicas de péptido. Por tanto, Bcl-2 puede servir como una diana importante y ampliamente aplicable para estrategias

inmunoterapéuticas contra el cáncer, por ejemplo en combinación con radio y quimioterapia convencionales.

Introducción

La familia Bcl-2 comprende varios actores clave en la regulación de la apoptosis e incluye tanto moléculas proapoptóticas como antiapoptóticas. Bcl-2 es un factor celular crítico que contribuye a la patogenia y la progresión del cáncer. En el presente estudio, se examinó la inmunogenicidad celular natural de Bcl-2 en pacientes con cáncer.

Métodos

Pacientes

Se aislaron PBL usando separación con Lymphoprep, se tipificaron para HLA (Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario, Copenhague, Dinamarca) y se congelaron en FCS con DMSO al 10%. Ninguno de los pacientes recibió inmunoterapia antes de la toma de la muestra de sangre. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes antes de cualquiera de estas medidas. Se recogieron linfocitos de sangre periférica (PBL) de trece pacientes con cáncer de mama positivos para HLA-A2 que presentaban enfermedad progresiva con metástasis a distancia que definían la enfermedad en estadio IV; la mayoría de los pacientes tenían más de una ubicación de tumor (8/13 pacientes). El tratamiento anterior incluía quimioterapia, tratamiento endocrino y radioterapia. Ocho pacientes se trataron anteriormente con quimioterapia, mientras que cinco pacientes habían recibido sólo tratamiento endocrino y no quimioterapia antes de su inclusión en el estudio. Además, se incluyeron doce pacientes positivos para HLA-A2 con cáncer de mama operable localizado y se recogieron muestras de sangre antes de la intervención quirúrgica primaria y quimioterapia. Adicionalmente, se recogieron PBL de dos pacientes con cáncer pancreático positivos para HLA-A2 que presentaban enfermedad progresiva con metástasis a distancia que definían la enfermedad en estadio IV. Finalmente, se recogieron PBL de diez pacientes con CLL recién diagnosticados HLA-A2 y tres con AML antes del tratamiento. Como controles, sirvieron PBL de doce individuos sanos positivos para HLA-A2.

ELISPOT de granzima B

Se usó el ensayo ELISPOT de granzima B (GrB) para medir la citotoxicidad de CTL específica de antígeno tal como se describe. En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (MultiScreen MAIP N45, Millipore) con anticuerpo de captura de GrB (BD Biosciences, Brondby, Dinamarca). Se lavaron los pocillos y se bloquearon mediante medio X-vivo con suero humano al 5%. Se añadieron las células a diferentes concentraciones celulares. Entonces se añadieron células T2 y péptidos a cada pocillo y se incubaron las placas durante 4 horas, se desechó el medio y se lavaron los pocillos antes de la adición del anticuerpo de detección de GrB (BD Biosciences). Se incubaron las placas durante 2 horas, se lavaron y se añadió avidina-peroxidasa del rábano (BD Biosciences) a cada pocillo. Se incubaron las placas a TA durante 1 hora, se añadió reactivo de sustrato AEC (BD Biosciences) a cada pocillo y se incubó a TA durante 5-10 min. Se puso fin a la reacción lavando con agua corriente tras el surgimiento de puntos rojos. Se contaron los puntos y se calculó la frecuencia de CTL específicos de péptido como para el ELISPOT de IFN- γ . Se realizaron todos los ensayos por duplicado o triplicado para cada antígeno peptídico.

Aislamiento de células T específicas de péptido

Se aislaron células específicas de antígeno por medio de perlas magnéticas recubiertas con Bcl₂₀₈/HLA-A2 tal como se describió anteriormente. Se acoplaron monómeros biotinilados (ProImmune, Oxford, RU) a perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynabeads M-280, Dynal A/S, Oslo, Noruega) incubando 2,5 μ g de monómeros con 5x10⁶ perlas en 40 μ l de PBS, durante 20 min. a temperatura ambiente. Se lavaron los complejos magnéticos tres veces en PBS en un campo magnético (Dynal A/S, Oslo, Noruega) y posteriormente se mezclaron con PBL, a una razón de 1:10 en PBS con BSA al 5%, y se hicieron rotar muy suavemente durante 1 h. Se lavaron muy suavemente tres veces células T CD8⁺ específicas de antígeno que se asociaban a los complejos magnéticos. Se resuspendieron las células aisladas numerosas veces en X-vivo con HS al 5% y se incubaron durante 2 h, antes de liberarse las perlas magnéticas y eliminarlas de la suspensión celular. Se cultivaron las células aisladas en una placa de 48 pocillos en X-vivo, HS al 5% y 10⁶ células presentadoras de antígeno basadas en células artificiales recubiertas con anticuerpo anti-CD28, anticuerpo anti-CD3 (K32/41 BBL) que expresan el ligando de 4-1BB (4-1 BBL) (proporcionadas por gentileza del Dr. Carl H. June, Departamento de Patología y Medicina de laboratorio, Universidad de Pensilvania). Un día tras el aislamiento, se añadió IL-2 20 unidades/ml, y en el día 5 se sometió a prueba la capacidad de estas células para destruir células diana cualquiera en ensayos de liberación de ⁵¹Cr convencionales.

Clonación mediante dilución límite

Se establecieron clones de CTL a partir de los cultivos aislados mediante dilución límite en placas de 96 pocillos usando PBMC irradiadas como células alimentadoras en presencia de IL-2 40 UI/ml y PHA 1 μ g/ml en X-vivo con HS al 5%. Se añadieron medio nuevo e IL-2 a los clones cada 3-4 días.

Ensayo de citotoxicidad

Se llevaron a cabo ensayos de liberación de [⁵¹Cr] convencionales para determinar la citotoxicidad mediada por CTL tal como se describe en otra parte en el presente documento. Las células diana eran células T2 con o sin el péptido relevante, la línea celular de cáncer de mama positiva para HLA-A2 MDA-MB-231 y la línea celular de cáncer de mama negativa para HLA-A2 ZR75-1. Ambas líneas de cáncer de mama expresaban Bcl-2 tal como se examinó mediante PCR de transcripción inversa (datos no mostrados).

Resultados

Respuestas de CTL frente a péptidos derivados de Bcl-2

Para examinar si células T específicas de Bcl-2 estaban también presentes en PBL de pacientes con leucemia, se examinaron PBL de diez pacientes con CLL positivos para HLA-A2 y tres pacientes con AML para determinar la reactividad frente a los dos péptidos bcl₂₀₈ y bcl₂₁₄. Estaban presentes respuestas frente a Bcl-2 en cinco de los pacientes con CLL y dos de los pacientes con AML (figura 3). Además, se examinaron PBL de dos cánceres pancreáticos y se identificó que ambos pacientes albergaban una respuesta de CTL frente a los péptidos bcl₂₀₈ y bcl₂₁₄ (figura 3). De manera similar, se examinaron PBL de doce individuos sanos positivos para HLA-A2. Sorprendentemente, se detectó una respuesta de CTL débil frente al péptido bcl₂₀₈ en uno de los individuos sanos (datos no mostrados).

Liberación de granzima B específica de Bcl-2 en PBL

Usando el ELISPOT de GrB, se evaluó si las células T específicas de bcl-2 detectadas en PBL mostraban función citotóxica. Por tanto, se analizaron PBL de tres de los pacientes con cáncer de mama reactivos con bcl-2 (pacientes n°: 19, 20 y 22) para determinar la reactividad frente a los dos epítomos bcl₂₀₈ y bcl₂₁₄ (figura 4). En los tres pacientes, pudieron detectarse respuestas frente a ambos péptidos con una frecuencia a aproximadamente 50-140 CTL específicos de péptido por 10⁵ PBL. Como control, se incluyó un paciente (paciente n°: 16), en el que sólo pudo detectarse una respuesta frente a bcl₁₇₂ pero no frente a bcl₂₀₈ y bcl₂₁₄ en el ELISPOT de IFN- γ y un control sano (h1). Tal como se esperaba, no se detectó liberación de GrB frente a bcl₂₀₈ o bcl₂₁₄ ni en el paciente con cáncer de mama n° 16 ni en el control sano.

La capacidad funcional de CTL reactivos con Bcl-2

Para caracterizar adicionalmente la capacidad funcional de CTL reactivos con Bcl-2, se enriquecieron estas células por medio de perlas magnéticas recubiertas con complejos de HLA-A2/bcl₂₀₈ tal como se describe. Se estimularon las células una vez con péptido *in vitro* antes del aislamiento. Se clonó una pequeña fracción de las células aisladas mediante dilución límite. Se examinaron los cultivos en expansión para el reconocimiento de las células T2 o bien sin péptido o bien pulsadas con bcl₂₀₈ en un ELISPOT de GrB. Varios de estos clones mostraron un reconocimiento específico de células T2 pulsadas con bcl₂₀₈ (datos no mostrados). Sin embargo, desafortunadamente no se pudieron expandir estos clones para análisis adicionales.

Un día tras el aislamiento, se añadió IL-2 a las células restantes, y en el día 5 se sometió a prueba la capacidad de las células para destruir células T2 cargadas con péptido en ensayos de liberación de ⁵¹Cr convencionales. Para este fin, o bien células T2 no cargadas o bien células T2 cargadas con péptido bcl₂₀₈ sirvieron como dianas. Este ensayo reveló que sólo se destruían células T2 pulsadas con bcl₂₀₈ (figura 5a). Se usaron adicionalmente estas células T reactivas con bcl₂₀₈ estimuladas *in vitro* y enriquecidas para someter a prueba la capacidad para destruir la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, que expresa Bcl-2 y es positiva para HLA-A2. Las células T enriquecidas lisaron eficazmente las células MDA-MB-231, mientras que en cambio no se observó citotoxicidad frente a la línea celular de cáncer de mama ZR75-1, que es negativa para HLA-A2 y expresa Bcl-2 (figura 5b).

Ejemplo 3

Inmunogenicidad de Bcl-X(L) en pacientes con cáncer

Resumen

En este ejemplo, se demuestra que Bcl-X_L es una diana para el reconocimiento de células T en pacientes con cáncer. Por tanto, se describen respuestas de células T citotóxicas espontáneas restringidas por HLA-A2 y HLA-A3 frente a epítomos peptídicos derivados de Bcl-X_L por medio de tinciones de citometría de flujo y ELISPOT. Por tanto, las respuestas inmunitarias celulares frente a inhibidores de la apoptosis como las proteínas de la familia Bcl-2 parecen representar un fenómeno general en el cáncer, y en consecuencia, este grupo de proteínas representa proteínas diana universales atractivas para la inmunoterapia contra el cáncer. Adicionalmente, puesto que la expresión elevada de estas proteínas en células está correlacionada con la resistencia a fármacos, la combinación de inmunoterapia con quimioterapia citotóxica es un modo muy atractivo para tratar el cáncer.

Introducción

La proteína antiapoptótica Bcl-X_L se produce a partir de la forma de corte y empalme alternativo larga del gen *bcl-x*, mientras que Bcl-X_S proapoptótica se deriva de la forma de corte y empalme alternativo corta del mismo gen. Bcl-X_L

desempeña un importante papel ya que se ha relacionado directamente con la resistencia a formas convencionales de tratamientos y malos pronósticos. La inhibición funcional de Bcl-X_L restablece el proceso apoptótico y hace a las células neoplásicas sensibles a quimio y radioterapias, mientras que la manipulación de líneas celulares cancerosas para que expresen altos niveles de Bcl-X_L da como resultado un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. Se ha notificado el aumento de la expresión de Bcl-X_L en una variedad de tumores malignos diferentes incluyendo AML y mieloma múltiple así como cánceres sólidos como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer pancreático y melanoma.

Dianas ideales para inmunoterapia son productos génicos silenciados en tejidos normales, sobreexpresados en células cancerosas, e implicados directamente en la progresión y supervivencia de las células tumorales.

10 Materiales y métodos

Pacientes

Se recogieron linfocitos de sangre periférica (PBL) de pacientes que padecían cáncer de origen diferente y de controles sanos y se aislaron usando separación con Lymphoprep, se tipificaron para HLA (Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario, Copenhague, Dinamarca) y se congelaron en FCS con DMSO al 10%. Ninguno de los pacientes recibió inmunoterapia antes de la toma de la muestra de sangre. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes antes de cualquiera de estas medidas.

Citometría de flujo (FACS)

Se estimularon una vez *in vitro* PBL de un paciente con cáncer de mama con el péptido relevante y en el día siete se aislaron las células CD8⁺ a partir de PBL usando el kit de aislamiento de CD8 negativo Dynal (Dynal Biotech ASA, Oslo, Noruega). Se tiñó el cultivo de células T CD8 positivas resultante con pentámeros de CMH Pro5TM acoplados con PE (ProlImmune, Oxford, RU), seguido de tinción de anticuerpos con los AcM acoplados a fluorocromo: CD8-APC y CD3-FITC (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San José, CA). Se realizaron ambas tinciones en PBS + FCS al 2%, durante 30 min., 4°C, en la oscuridad. Se usaron los complejos de pentámero del CMH Pro5TM: HLA-A2/Bcl-X_L₁₇₃₋₁₈₂ (YLNDHLEPWI) (SEQ ID NO:42) y HLA-A2/VIH-1 pol₄₇₆₋₄₈₄ (ILKEPVHGV) (SEQ ID NO:39). Se analizaron las muestras sobre BD FACS aria, usando el software DIVA (BD, San José, CA).

Resultados

Respuestas de CTL espontáneas frente a péptidos derivados de Bcl-X_L

El gen *bcl-x* se transcribe en dos ARNm a través de corte y empalme alternativo. La proteína antiapoptótica Bcl-X_L se produce a partir de la forma de corte y empalme alternativo larga, mientras que Bcl-X_S proapoptótica se deriva de la forma de corte y empalme alternativo corta de este gen. El producto proteico de la BCL-X_L más grande difiere de la proteína Bcl-X_S en una región insertada (aminoácidos 126-188). Por tanto, para investigar si Bcl-X_L es una diana natural para las células T en pacientes con cáncer, se inspeccionó esta región insertada (incluyendo nueve aminoácidos en cada extremo) para determinar epítomos de HLA-A2 supuestos usando los residuos de anclaje específicos de HLA-A2 principales. Posteriormente, se sintetizaron siete péptidos deducidos de Bcl-X_L (Bcl-X_L₁₅₈₋₁₆₆ (EMQVLVSR) (SEQ ID NO:44), Bcl-X_L₁₁₈₋₁₂₆ (TAYQSFEQV) (SEQ ID NO:43), Bcl-X_L₁₇₃₋₁₈₂ (YLNDHLEPWI) (SEQ ID NO:42), Bcl-X_L₁₆₅₋₁₇₄ (RIAAWMATYL) (SEQ ID NO:45), Bcl-X_L₁₆₉₋₁₇₈ (WMATYLNDHL) (SEQ ID NO:46), Bcl-X_L₁₆₁₋₁₇₀ (VLVSRIAAWM) (SEQ ID NO:48), Bcl-X_L₁₄₁₋₁₅₀ (VAFFSFGGAL) (SEQ ID NO:49)) y se inspeccionaron PBL de pacientes con cáncer HLA-A2+ de origen diferente por medio de ELISPOT frente a estos péptidos. Anteriormente, se ha demostrado que este método es altamente eficaz para identificar CTL específicos de tumores en pacientes con cáncer. De hecho, se detectaron respuestas de CTL fuertes y frecuentes frente a cuatro de los péptidos examinados (Bcl-X_L₁₇₃₋₁₈₂, Bcl-X_L₁₄₁₋₁₅₀, Bcl-X_L₁₆₁₋₁₇₀ y Bcl-X_L₁₆₅₋₁₇₄) en pacientes con cáncer de origen diferente (figura 6). En total, quince de los dieciocho pacientes con cáncer de mama HLA-A2+ albergaron una respuesta inmunitaria frente a al menos uno de estos cuatro péptidos de Bcl-X_L (los pacientes que responden al tratamiento se definen como el número promedio de células específicas de antígeno $\pm 1/2$ de la desviación estándar > 25 por 10^5 células). Asimismo, cuatro de los seis pacientes con melanoma examinados y uno de los dos pacientes con cáncer pancreático examinados albergaron una respuesta inmunitaria frente a al menos uno de estos cuatro péptidos. Por tanto, nueve de los dieciocho pacientes con cáncer de mama examinados albergaron una respuesta inmunitaria frente a Bcl-X_L₁₇₃₋₁₈₂, mientras que dos de los seis pacientes con melanoma HLA-A2+ examinados albergaron una respuesta inmunitaria frente a este péptido (figura 6a). Cuatro de los dieciocho pacientes con cáncer de mama examinados albergaron una respuesta inmunitaria frente a Bcl-X_L₁₄₁₋₁₅₀, mientras que se detectaron respuestas en PBL de uno de los dos pacientes con cáncer pancreático examinados. No se pudo detectar una respuesta en PBL de ninguno de los cinco pacientes con melanoma examinados frente a este péptido (figura 6b). Asimismo, se detectó una respuesta en PBL de seis pacientes con cáncer de mama y un paciente con cáncer pancreático examinado frente a Bcl-X_L₁₆₁₋₁₇₀ (figura 6c). Finalmente, cuatro pacientes con cáncer de mama, dos pacientes con melanoma y un paciente con cáncer pancreático albergaron una respuesta frente a Bcl-X_L₁₆₅₋₁₇₄ (figura 6d). Como control, se examinaron PBL de 12 individuos sanos HLA-A2+. De manera importante, no se detectaron respuestas frente a ningún péptido Bcl-X_L₁₇₃₋₁₈₂, Bcl-X_L₁₄₁₋₁₅₀, Bcl-X_L₁₆₁₋₁₇₀ ni Bcl-X_L₁₆₅₋₁₇₄ en ninguno de los individuos sanos (figura 6)

Liberación de granzima B específica de Bcl-X_L en PBL

Usando el ELISPOT de GrB, se evaluó si las células T específicas de Bcl-X_L detectadas en PBL mostraban función citotóxica. Por tanto, se analizaron PBL de dos de los pacientes con cáncer de mama reactivos frente a Bcl-X_L (pacientes n°: 35 y 36) para determinar la reactividad frente a Bcl-X_{L173-182} (figura 7). En ambos pacientes, pudieron detectarse respuestas frente a Bcl-X_{L173-182} con una frecuencia a aproximadamente 50-100 CTL específicos de péptido por 3x10⁵ células. Como control se incluyó un paciente (paciente n°: 17), en el que sólo pudo detectarse una respuesta frente a Bcl-X_{L141-150} pero no frente a Bcl-X_{L173-182} en el ELISPOT de IFN-γ. Tal como se esperaba, no se detectó liberación de GrB frente a Bcl-X_{L173-182} en el paciente con cáncer de mama n° 17.

Análisis de FACS de células T específicas de Bcl-X_L

Se evaluó adicionalmente la aparición espontánea de CTL específicos de Bcl-X_{L173-182} en PBL de pacientes con cáncer de mama usando análisis de FACS y tinción con pentámero de CMH Pro5™. Se estimularon una vez *in vitro* PBL del paciente con cáncer de mama n° 36 con péptido y se aislaron las células CD8 positivas. Se tiñó este cultivo con el complejo de pentámero de HLA-A2/BCL-X. Los análisis de FACS revelaron una población fácilmente detectable de células T positivas para el pentámero que constituían el 0,24% de las células T CD8⁺ (figura 8a). En comparación, las mismas células T CD8⁺ mostraron aproximadamente el 1,4% de células T CD8⁺ que secretan IFN_γ, específicas de Bcl-X_{L173-182} cuando se analizaron por medio de ELISPOT (figura 8c).

Epítomos restringidos a HLA-A2 adicionales frente a Bcl-X(L)

Se inspeccionaron PBL de pacientes con cáncer HLA-A2+ de origen diferente por medio de ELISPOT frente a Bcl-X_{L118-126} (TAYQSFEQV) (SEQ ID NO:43) (figura 9a) y Bcl-X_{L169-178} (WMATYLNHDL) (SEQ ID NO:46) (figura 9b) identificando una respuesta de CTL espontánea débil en pacientes con cáncer de origen diferente frente a ambos péptidos.

Respuestas restringidas por HLA-A3 frente a Bcl-X(L)

Adicionalmente, se inspeccionó la región insertada (incluyendo nueve aminoácidos en cada extremo) para determinar epítomos de HLA-A3 supuestos usando los residuos de anclaje específicos de HLA-A3 principales. Posteriormente, se sintetizaron dos péptidos; Bcl-X_{L165-173} (RIAAWMATY) (SEQ ID NO:50) y el Bcl-X_{L149-157} (ALCVESVDK) (SEQ ID NO 51). A continuación, se inspeccionaron PBL de pacientes con cáncer HLA-A3+ de origen diferente por medio de ELISPOT frente al péptido Bcl-X_{L165-173} (RIAAWMATY) (SEQ ID NO:50) y el Bcl-X_{L149-157} (ALCVESVDK) (SEQ ID NO:51). Anteriormente, se ha demostrado que este método es altamente eficaz para identificar CTL específicos de tumores en pacientes con cáncer. De hecho, se detectaron respuestas de CTL fuertes y frecuentes frente a Bcl-X_{L165-173} (RIAAWMATY) (SEQ ID NO:50) en pacientes con cáncer de origen diferente. También se pudo detectar una respuesta frente al Bcl-X_{L165-173} en PBL HLA-A3+ en cuatro de los cinco pacientes con cáncer de mama examinados (los pacientes que responden al tratamiento se definen como el número promedio de células específicas de antígeno ± ½ de la desviación estándar > 25 por 10⁵ células), cuatro de los cuatro pacientes con melanoma examinados, dos de los dos pacientes con cáncer pancreático examinados así como uno de los cuatro pacientes con mieloma múltiple examinados (figura 10). De manera importante, no pudo detectarse una respuesta en ninguno de los siete individuos sanos HLA-A3+ que se examinaron como controles (figura 10).

Ejemplo 4

Inmunogenicidad de Mcl-1 en pacientes con cáncer

Resumen

En este ejemplo, se demuestra que Mcl-1 es una diana para el reconocimiento de células T en pacientes con cáncer. Por tanto, se describen respuestas de células T espontáneas restringidas por HLA-A1 y HLA-A3 frente a epítomos peptídicos derivados de Mcl-1 por medio de ELISPOT

Introducción

El factor-1 de célula mielóide (Mcl-1) es un miembro que inhibe la muerte de la familia Bcl-2 que se expresa en la diferenciación monocítica temprana y que puede promover la viabilidad en la transfección en células mieloides inmaduras. Mcl-1 en ratones transgénicos promueve la supervivencia en un espectro de tipos de células hematopoyéticas y la immortalización de células mieloides. Se han notificado niveles elevados de Mcl-1 para varios cánceres en seres humanos incluyendo cánceres de próstata, cánceres pancreáticos, melanoma, cánceres de mama, pacientes con cáncer de ovario y cáncer de cérvix, así como leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) y en AML y ALL tras recidiva. En pacientes con B-CLL, niveles superiores de Mcl-1 están fuertemente correlacionados con no poder lograr una remisión completa tras el tratamiento con un único agente. En el mieloma múltiple, Mcl-1 desempeña un importante papel en la supervivencia de las células malignas. En este aspecto, se ha demostrado que los ratones que expresan un transgén *mcl-1* bajo el control de su propio promotor desarrollan neoplasias de células B con alta frecuencia, que oscilan desde linfoma folicular hasta linfoma de células grandes difusas.

Respuestas restringidas por HLA-A3 frente a Mcl-1

Para investigar si Mcl-1 es una diana natural para células T en pacientes con cáncer, se examinó la secuencia de proteína para los epítomos peptídicos de nona y decámero de HLA-A3 más probables, usando los residuos de anclaje específicos de HLA-A3 principales. Posteriormente, se sintetizaron seis péptidos deducidos de Mcl-1 (Mcl-1₁₈₅₋₁₉₄ (YLREQATGAK) (SEQ ID NO:52), Mcl-1₂₉₃₋₃₀₂ (SITDVLVVRTK) (SEQ ID NO:53), Mcl-1₂₆₇₋₂₇₆ (LISFGAFVAK) (SEQ ID NO:54), Mcl-1₉₅₋₁₀₃ (RLLFFAPTR) (SEQ ID NO:55), Mcl-1₃₀₀₋₃₀₈ (RTKRDWLVK) (SEQ ID NO:56), Mcl-1₂₃₆₋₂₄₄ (DIKNEDDVK) (SEQ ID NO:57)) y se examinaron PBL de pacientes con cáncer HLA-A3+ de origen diferente para determinar la reactividad frente a estos péptidos, aprovechándose del ensayo ELISPOT. Anteriormente, se ha demostrado que este método es altamente eficaz para la identificación de CTL específicos de tumores en pacientes con cáncer. De hecho, se detectaron respuestas de CTL fuertes y frecuentes frente a dos péptidos derivados de Mcl-1 en pacientes con cáncer de origen diferente (Mcl-1₉₅₋₁₀₃ y Mcl-1₃₀₀₋₃₀₈) (figura 11). En total, cinco de los seis pacientes con cáncer de mama HLA-A3+ examinados albergaron una respuesta inmunitaria frente a uno de estos dos péptidos de Mcl-1. Por tanto, cinco pacientes con cáncer de mama albergaron una respuesta frente a Mcl-1₉₅₋₁₀₃ (los pacientes que responden al tratamiento se definen como el número promedio de células específicas de antígeno $\pm \frac{1}{2}$ de la desviación estándar > 25 por 10^5 células), y tres pacientes albergaron una respuesta frente a Mcl-1₃₀₀₋₃₀₈ (figura 11). Adicionalmente dos de los dos pacientes con cáncer pancreático HLA-A3+ examinados albergaron una respuesta inmunitaria frente al péptido Mcl-1₉₅₋₁₀₃, mientras que uno de éstos también reaccionó frente a Mcl-1₃₀₀₋₃₀₈. Adicionalmente se examinaron los PBL de seis pacientes que padecían B-CLL y se identificó una respuesta frente a Mcl-1₉₅₋₁₀₃ en dos de estos pacientes. Como control, se examinaron PBL de 10 individuos sanos HLA-A3+. De manera importante, no se detectaron respuestas frente a o bien el péptido Mcl-1₉₅₋₁₀₃ o bien el Mcl-1₃₀₀₋₃₀₈ en ninguno de los donantes sanos (figura 11). De manera similar, no pudieron detectarse respuestas frente a ninguno de los cuatro péptidos derivados de Mcl-1 adicionales en ninguno de los pacientes con cáncer o controles sanos (datos no mostrados).

Respuestas restringidas por HLA-A1 frente a Mcl-1

Para investigar si Mcl-1 es una diana natural para células T en pacientes con cáncer, se examinó la secuencia de proteína para los epítomos peptídicos de nona y decámero de HLA-A1 más probables, usando los residuos de anclaje específicos de HLA-A1 principales. Posteriormente, se sintetizaron cuatro péptidos deducidos de Mcl-1 (Mcl-1₁₆₆₋₁₇₅ (PAEEEEEDLY) (SEQ ID NO:58), Mcl-1₁₂₁₋₁₂₉ (SPEEELDGY) (SEQ ID NO:59), Mcl-1₁₇₇₋₁₈₅ (QSLEISRY) (SEQ ID NO:60), Mcl-1₃₃₉₋₃₄₇ (AGVGAGLAY) (SEQ ID NO:61)) y se inspeccionaron PBL de pacientes con cáncer HLA-A1+ de origen diferente para determinar la reactividad frente a estos péptidos, aprovechándose del ensayo ELISPOT. De hecho, se detectaron respuestas de CTL frente a dos péptidos derivados de Mcl-1 en pacientes con cáncer de origen diferente (Mcl-1₁₆₆₋₁₇₅ y Mcl-1₁₇₇₋₁₈₅) (figura 12). En total, tres de los cuatro pacientes con cáncer de mama HLA-A1+ examinados albergaron una respuesta inmunitaria frente a Mcl-1₁₇₇₋₁₈₅ y uno de éstos albergó además una respuesta frente a Mcl-1₁₆₆₋₁₇₅ (figura 12). Adicionalmente uno de los siete pacientes con melanoma albergó una respuesta inmunitaria frente al péptido Mcl-1₁₇₇₋₁₈₅, y otro de éstos albergó una respuesta frente a Mcl-1₁₆₆₋₁₇₅. Como control, se examinaron PBL de seis individuos sanos HLA-A1+. De manera importante, no se detectaron respuestas frente a o bien el péptido Mcl-1₁₆₆₋₁₇₅ o bien el Mcl-1₁₇₇₋₁₈₅ en ninguno de los donantes sanos (figura 12).

Respuestas frente a péptidos modificados.

La inmunogenicidad del péptido Mcl-1₃₀₀₋₃₀₈ restringido a HLA-A3 se aumentó sustituyendo treonina en la posición 2 por un mejor residuo de anclaje de HLA-A3, concretamente leucina (Mcl-1₃₀₀₋₃₀₈L2 (RLKRDWLVK) (SEQ ID NO:62)). Se detectaron respuestas inmunitarias espontáneas en dos pacientes con cáncer de mama frente a Mcl-1₃₀₀₋₃₀₈L2 (datos no mostrados). Asimismo, para generar epítomo más inmunogenético, se modificó el péptido Mcl-1₁₇₇₋₁₈₅ restringido a HLA-A1 (QSLEISRY) (SEQ ID NO:60) en la posición 3 generando los dos péptidos Mcl-1₁₇₇₋₁₈₅D3 (QSDEISRY) (SEQ ID NO:63) y Mcl-1₁₇₇₋₁₈₅E3 (QSEEISRY) (SEQ ID NO:64).

45 Discusión

Casi todos los tumores malignos se caracterizan por defectos en la señalización de la apoptosis. Esto hace que las células malignas sean resistentes a estímulos apoptóticos endógenos, así como estímulos exógenos tales como radiación y fármacos quimioterápicos. La apoptosis defectuosa observada en cánceres en seres humanos resulta a menudo de la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas en la familia de proteínas Bcl-2, es decir, Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1A1, Bcl-b y Bcl2-L-10. El uso de tales inhibidores de proteínas de apoptosis para fines de vacunación es ventajoso porque la regulación por disminución o la pérdida de expresión de estas proteínas como alguna forma de escape inmunitario alteraría el crecimiento tumoral sostenido, puesto que la supervivencia de células tumorales requiere miembros funcionalmente activos de la familia Bcl-2. Para estrategias terapéuticas, la selección como diana de antígenos que desempeñan un papel insignificante en relación con el crecimiento y la supervivencia de células tumorales, la selección de tumores deficientes en antígenos es una limitación bien reconocida. Además, puesto que la expresión elevada de proteínas de la familia Bcl-2 en células está correlacionada con la resistencia a fármacos, la combinación de una inmunoterapia basada en la familia Bcl-2 con quimioterapia citotóxica es un nuevo modo muy fascinante para tratar el cáncer.

Se exploraron las proteínas Bcl-2, Bcl-X(L) y Mcl-1 para determinar la presencia de motivos de unión a péptido y se usaron éstos para la búsqueda de respuestas de células T específicas en pacientes con cáncer. Para este fin, se

detectó la reactividad de células T espontánea frente a todos los miembros de la familia Bcl-2 en pacientes que padecían tipos de tumor no relacionados, es decir, cáncer pancreático, cáncer de mama, melanoma, AML y CLL por medio de ELISPOT. Se confirmó la presencia de células CD8⁺ específicas de Bcl-X_L en PBL de pacientes con cáncer mediante tinciones de FACS de CD8/ pentámero. Tomados juntos, estos datos muestran que los epítomos definidos por CTL de estas proteínas podrían aplicarse ampliamente en la vacunación terapéutica contra el cáncer y por tanto son de valor inmunoterapéutico sustancial.

Además, once de los pacientes con cáncer de mama poseían CTL específicos de Bcl-2, ocho de éstos pacientes se trataron anteriormente con al menos un tipo de quimioterapia. En dos pacientes (pacientes n°: 14 y 17) no pudieron detectarse respuestas de CTL frente a los cuatro péptidos de Bcl-2 diferentes. Ambos pacientes habían recibido anteriormente tratamiento anti-hormonal pero no quimioterapia. De manera similar, no pudo detectarse ninguna respuesta en pacientes con cáncer de mama localizado primario antes de la quimioterapia. Por tanto, en pacientes con cáncer de mama, se detectaron sólo respuestas frente a Bcl-2 en los pacientes que habían recibido quimioterapia. Aunque la carga tumoral puede desempeñar un papel importante, esto podría indicar que las respuestas inmunitarias se introducen o aumentan como consecuencia del aumento inducido por el tratamiento de la expresión de Bcl-2. Esto apunta a un caso en el que la combinación de una inmunoterapia basada en la familia Bcl-2 con quimioterapia citotóxica podría mejorar de manera sinérgica las tasas de respuesta actuales. El estado de tratamiento de los pacientes examinados para determinar las respuestas frente a Bcl-X(L) y Mcl-1 no estaba disponible.

En el presente estudio, se aprovechó el ensayo ELISPOT de GrB para demostrar que los CTL específicos de Bcl-2 o Bcl-X(L) en los PBL de pacientes son de hecho células efectoras citotóxicas. Para demostrar adicionalmente este concepto, se enriquecieron células T reactivas frente a Bcl-2 a partir de PBL de pacientes, y se mostró que la línea de células T resultante podía lisar células T2 pulsadas con péptidos en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr convencional. Además, esta línea de células T reactivas frente a Bcl-2 podía destruir una línea celular de cáncer de mama ajustada para HLA, mientras que las células diana HLA-A2 negativas no se destruían. Estos hallazgos muestran que de hecho las células cancerosas procesan y presentan el péptido Bcl-2 en el contexto de la molécula HLA-A2. Finalmente, se pudieron clonar estas células aisladas y se mostró que reaccionaban de manera altamente eficaz frente al epítomo peptídico de Bcl-2.

Cuando se usaron por primera vez péptidos derivados de antígenos de diferenciación melanocítica para tratar pacientes con melanoma en estadio IV, se previó que esto podría conducir a una destrucción de melanocitos pronunciada, que a su vez se manifestaría clínicamente, es decir, vitíligo o retinitis. Sin embargo, la experiencia clínica demostró que la incidencia de vitíligo en pacientes que recibieron vacunaciones no era significativamente superior a la incidencia de hipopigmentación asociada a melanoma en pacientes que recibieron otras formas de tratamiento. Adicionalmente, no se han notificado efectos secundarios graves en diversas campañas de vacunación frente a autoantígenos. Los datos, tomados juntos, demuestran que las respuestas inmunitarias celulares frente al grupo de proteínas de la familia Bcl-2 son una característica general en el cáncer. En el intento por maximizar el impacto de la inmunoterapia, una estrategia fascinante sería considerar el perfil de expresión y la significación del pronóstico de la diana elegida en la enfermedad particular, o estadio de enfermedad, que está tratándose. Por tanto, mientras que se observa la expresión conjunta de Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-X_L en algunos cánceres, o un estadio de enfermedad particular, otros cánceres muestran la expresión exclusiva de una o la otra proteína. Por tanto, en algunas enfermedades como cáncer de ovario, la expresión de Mcl-1, pero no de Bcl-2, está asociada al estadio avanzado y a la mala supervivencia, razón por la que Mcl-1 podría ser el antígeno principal, mientras que en enfermedades tales como CLL, en la que se sobreexpresan conjuntamente Bcl-2 y Mcl-1, la selección como diana simultánea de ambas proteínas puede representar una estrategia más eficaz que la selección como diana de cualquier molécula sola. De manera similar, Tanaka *et al* describieron que la presencia de otra proteína survivina inhibidora de la apoptosis en el carcinoma de mama estaba fuertemente asociada a la expresión de Bcl-2 y a un índice apoptótico reducido (AI) y a una mala supervivencia global. Se ha descrito una asociación similar entre la survivina y Bcl-2 en el neuroblastoma, cáncer gástrico, cáncer colorrectal y linfoma no Hodgkin de alto grado. La eficacia potencial y la seguridad de péptidos derivados de survivina en vacunaciones terapéuticas contra el cáncer se están investigando actualmente en ensayos clínicos de fase I/II (J. Becker, comunicación personal). Por tanto, una estrategia inmunoterapéutica fascinante sería seleccionar como diana tanto la familia de proteínas Bcl-2 como la survivina especialmente debido a que ejecutan su función antiapoptótica a través de rutas celulares diferentes.

Ejemplo 5

Vacuna peptídica

Los péptidos de la familia de proteínas Bcl-2 pueden por ejemplo sintetizarse por ejemplo en la instalación UVA Biomolecular Core con un extremo NH₂ terminal de amida libre y un extremo COOH terminal de ácido libre. Cada uno se proporciona como un péptido liofilizado, que entonces se reconstituye en agua estéril y se diluye con solución de Ringer con lactato (LR, Baxter Healthcare, Deerfield, IL) como tampón para una concentración final del 67-80% de solución de Ringer con lactato en agua. Entonces, se someten a filtración estéril estas disoluciones, se colocan en viales de vidrio de borosilicato y se someten a una serie de estudios de garantía de calidad incluyendo confirmación de la identidad, esterilidad, seguridad general y pureza, según las directrices de la FDA, tal como se define en la norma IND 6453. Las pruebas de la estabilidad del péptido demostraron que no disminuía la pureza o la

concentración de péptido, cuando se almacenaban estas disoluciones de péptido a -20°C durante 3 años.

En circunstancias prácticas, los pacientes recibirán una vacuna que comprende aproximadamente 100 µg de un péptido restringido a HLA de clase I con o sin un péptido auxiliar restringido a HLA de clase II. Los pacientes se vacunan con por ejemplo aproximadamente 100 µg del péptido de HLA de clase I en adyuvante solo, o se vacunan con por ejemplo aproximadamente 100 µg del péptido restringido a HLA de clase I más 190 µg del péptido auxiliar restringido a la clase II. Se calcula la dosis superior del péptido auxiliar para proporcionar cantidades equimolares de los péptidos auxiliar y citotóxico. Adicionalmente, los pacientes pueden vacunarse con un péptido más largo que comprende las secuencias de aminoácidos de ambos péptidos.

Los péptidos anteriores, en 1 ml de disolución acuosa, pueden administrarse o bien como una disolución/suspensión con aproximadamente 100 µg de QS-21, o bien como una emulsión con aproximadamente 1 ml de adyuvante Montanide ISA-51.

Se inmunizaron los pacientes por ejemplo en el día 0 y los meses 1, 2, 3, 6, 9 y 12, con los péptidos más adyuvante, para un total de siete inmunizaciones. Con raras excepciones, las vacunaciones se administran en el mismo brazo con cada vacuna. Los péptidos se administran preferiblemente por vía s.c.

15 Bibliografía

1. Altieri, D. C., Marchisio, P. C., y Marchisio, C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death y cell proliferation in cancer. *Lab Invest*, 79: 1327-1333, 1999.

2. Andersen, M. H., L. Tan, I. Sondergaard, J. Zeuthen, T. Elliott, y J. S. Haurum. 2000. Poor correspondence between predicted y experimental binding of peptides to class I MHC molecules. *Tissue Antigens* 55:519.

20 3. Reed, J. C. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17:3225.

4. Andersen, M.H., L. O. Pedersen, J. C. Becker, y P. thor Straten. 2001. Identification of a Cytotoxic T Lymphocyte Response to the Apoptose Inhibitor Protein Survivin in Cancer Patients. *Cancer Res.* 61:869.

25 5. Thurner, B., Roder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kampgen, E., Bender, A., y Schuler, G. (1999) Generation of large numbers of fully mature y stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application *J.Immunol.Methods* 223, 1.

6. Shangary S y Johnson DE (2003) Recent advances in the development of anticancer agents targeting cell death inhibitors in the Bcl-2 protefina family. *Leukemia* 17:1470-1482

7. Rosenberg SA y Dudley ME (2004) Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *PNAS* 101:14639-14645.

30 8. WO 98/58541

9. Schmidt *et al.* *Blood*. 15 de julio de 2003, vol. 102. nº 2.

Lista de secuencias

<110> Survac A/S

35 <120> Proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2 y fragmentos de las mismas y su uso en pacientes con cáncer

<130> P 985 EP01

<160> 64

40

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido derivado de Bcl-2

<400> 1

Ala Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu
1 5

<210> 2

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-2

15 <400> 2

Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-2

<400> 3

Ser Leu Ala Leu Val Gly Ala Cys Ile
1 5

25

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-2

<400> 4

Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala Leu Val
1 5

<210> 5

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-2

10 <400> 5

Leu Leu Ser Leu Ala Leu Val Gly Ala
1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-2

<400> 6

Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu
1 5 10

20

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-2

<400> 7

Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val
1 5 10

30 <210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido derivado de Bcl-2

<400> 8

Pro Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu
1 5 10

<210> 9

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido derivado de Bcl-2

<400> 9

Phe Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala Thr Val
1 5 10

<210> 10

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-2

25 <400> 10

Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-2

<400> 11

Asn Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu Tyr Leu
1 5 10

5 <210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Péptido derivado de survivina

<400> 12

Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala
1 5

<210> 13

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptido derivado de survivina

<400> 13

Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu
1 5 10

<210> 14

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de survivina

30 <400> 14

Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5 10

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de survivina modificado

<400> 15

Leu Leu Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5

10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido derivado de survivina modificado

<400> 16

Leu Met Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5

20

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido derivado de survivina

<400> 17

Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu
1 5

<210> 18

30

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido derivado de survivina

<400> 18

Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe
1 5

<210> 19

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de survivina modificado

15 <400> 19

Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Tyr
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de survivina modificado

<400> 20

Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Tyr
1 5

25

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido derivado de survivina modificado

<400> 21

Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Tyr
1 5

<210> 22

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido derivado de survivina modificado

<400> 22

Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Tyr
1 5 10

<210> 23

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de survivina

20 <400> 23

Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
1 5 10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de survivina modificado

<400> 24

Phe Thr Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
1 5

30

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido derivado de survivina modificado

<400> 25

Arg	Ile	Ser	Thr	Phe	Lys	Asn	Trp	Pro	Lys
1				5					10

10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido derivado de survivina

<400> 26

Asp	Leu	Ala	Gln	Cys	Phe	Phe	Cys	Phe	Lys
1				5					10

20

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Péptido derivado de survivina

<400> 27

Arg	Ile	Ser	Thr	Phe	Lys	Asn	Trp	Pro	Phe	Leu
1				5					10	

<210> 28

<211> 10

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de ML-IAP

<400> 28

	Arg	Leu	Gln	Glu	Glu	Arg	Thr	Cys	Lys	Val
	1				5					10

5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido derivado de ML-IAP

<400> 29

	Gln	Leu	Cys	Pro	Ile	Cys	Arg	Ala	Pro	Val
	1				5					10

15

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido derivado de ML-IAP

<400> 30

	Arg	Leu	Ala	Ser	Phe	Tyr	Asp	Trp	Pro	Leu
	1				5					10

<210> 31

25

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Péptido derivado de ML-IAP

<400> 31

Leu Leu Arg Ser Lys Gly Arg Asp Phe Val
 1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de ML-IAP

<400> 32

Val Leu Glu Pro Pro Gly Ala Arg Asp Val
 1 5 10

10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido derivado de ML-IAP

<400> 33

Pro Leu Thr Ala Glu Val Pro Pro Glu Leu
 1 5 10

20

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido derivado de ML-IAP

<400> 34

Ser Leu Gly Ser Pro Val Leu Gly Leu
 1 5

<210> 35

30

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de ML-IAP

5 <400> 35

Gln Ile Leu Gly Gln Leu Arg Pro Leu
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de ML-IAP

<400> 36

Leu Thr Ala Glu Val Pro Pro Glu Leu
1 5

15

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido derivado de ML-IAP

<400> 37

Gly Met Gly Ser Glu Glu Leu Arg Leu
1 5

25

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido derivado de ML-IAP

<400> 38

Glu Leu Pro Thr Pro Arg Arg Glu Val
1 5

<210> 39

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epitopo de VIH-1 pol

10 <400> 39

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-2

<400> 40

Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10

20

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-2

<400> 41

Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro Leu
1 5 10

30 <210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido derivado de Bcl-XL

<400> 42

Tyr Leu Asn Asp His Leu Glu Pro Trp Ile
1 5 10

<210> 43

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido derivado de Bcl-XL

<400> 43

Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val
1 5

<210> 44

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-XL

25 <400> 44

Glu Met Gln Val Leu Val Ser Arg Ile
1 5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-XL

<400> 45

Arg Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr Tyr Leu
1 5 10

<210> 46

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido derivado de Bcl-XL

<400> 46

Trp Met Ala Thr Tyr Leu Asn Asp His Leu
1 5 10

<210> 47

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de Bcl-2 modificado

20 <400> 47

Pro Leu Phe Asp Phe Ser Trp Val Ser Leu
1 5 10

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-XL

30 <400> 48

Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ala Trp Met
 1 5 10

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-XL

<400> 49

Val Ala Phe Phe Ser Phe Gly Gly Ala Leu
 1 5 10

10

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-XL

<400> 50

Arg Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr Tyr
 1 5

20

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido derivado de Bcl-XL

<400> 51

Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys
 1 5

30

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Mcl-1

5 <400> 52

Tyr	Leu	Arg	Glu	Gln	Ala	Thr	Gly	Ala	Lys
1				5					10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Mcl-1

<400> 53

Ser	Ile	Thr	Asp	Val	Leu	Val	Arg	Thr	Lys
1				5					10

15

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido derivado de Mcl-1

<400> 54

Leu	Ile	Ser	Phe	Gly	Ala	Phe	Val	Ala	Lys
1				5					10

25

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido derivado de Mcl-1

<400> 55

Arg Leu Leu Phe Phe Ala Pro Thr Arg
 1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Mcl-1

<400> 56

Arg Thr Lys Arg Asp Trp Leu Val Lys
 1 5

10

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido derivado de Mcl-1

<400> 57

Asp Ile Lys Asn Glu Asp Asp Val Lys
 1 5

20

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido derivado de Mcl-1

<400> 58

Pro Ala Glu Glu Glu Glu Asp Asp Leu Tyr
 1 5 10

<210> 59

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido derivado de Mcl-1

<400> 59

Ser Pro Glu Glu Glu Leu Asp Gly Tyr
1 5

<210> 60

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Mcl-1

15 <400> 60

Gln Ser Leu Glu Ile Ile Ser Arg Tyr
1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de Mcl-1

<400> 61

Ala Gly Val Gly Ala Gly Leu Ala Tyr
1 5

25

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido Mcl-1 modificado

<400> 62

Arg Leu Lys Arg Asp Trp Leu Val Lys
1 5

<210> 63

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido Mcl-1 modificado

<400> 63

Gln Ser Asp Glu Ile Ile Ser Arg Tyr
1 5

<210> 64

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Mcl-1 modificado

20 <400> 64

Gln Ser Glu Glu Ile Ile Ser Arg Tyr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Péptido inmunogénicamente activo aislado que comprende como máximo 15 aminoácidos derivado de la proteína Bcl-X_L, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: YLNDHLEPWI (SEQ ID NO: 42), RIAAWMATYL (SEQ ID NO: 45), VLVSRIAAM (SEQ ID NO: 48) y VAFFSFGGAL (SEQ ID NO: 49) para su uso como medicamento.
2. Péptido según la reivindicación 1, para su uso como medicamento, siendo dicho péptido un péptido restringido a CMH de clase I, que tiene al menos una de las siguientes características;
 - (i) puede unirse a la molécula de HLA de clase I a la que está restringido a una afinidad, tal como se mide mediante la cantidad del péptido que puede realizar la mitad de la recuperación máxima de la molécula de HLA de clase I (valor C₅₀), que es como máximo de 50 μM tal como se determina mediante el ensayo de unión-ensamblaje tal como se describe en el presente documento,
 - (ii) puede provocar células productoras de INF-γ en una población de PBL de un paciente con cáncer a una frecuencia de al menos 1 por 10⁴ PBL tal como se determina mediante un ensayo ELISPOT, y/o
 - (iii) puede realizar la detección *in situ* en un tejido tumoral de CTL que son reactivos con el péptido de epítipo.
3. Péptido según la reivindicación 2 para su uso como medicamento, que tiene un valor C₅₀ que es como máximo de 30 μM.
4. Péptido según la reivindicación 3 para su uso como medicamento, que tiene un valor C₅₀ que es como máximo de 20 μM.
5. Péptido según la reivindicación 4 para su uso como medicamento, que tiene un valor C₅₀ que es como máximo de 10 μM.
6. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso como medicamento, que puede provocar una respuesta inmunitaria celular en un paciente con cáncer.
7. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso como medicamento, que está restringido a una molécula HLA-A del CMH de clase I o una HLA-B del CMH de clase I.
8. Péptido según la reivindicación 7 para su uso como medicamento, que está restringido a una especie de HLA-A del CMH de clase I seleccionada del grupo que consiste en HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 y HLA-A24.
9. Péptido según la reivindicación 8 para su uso como medicamento, que está restringido a HLA-A2.
10. Péptido según la reivindicación 7 para su uso como medicamento, que está restringido a una especie de HLA-B del CMH de clase I seleccionada del grupo que consiste en HLA-B7, HLA-B35, HLA-B44, HLA-B8, HLA-B15, HLA-B27 y HLA-B51.
11. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso como medicamento, que es un nonapéptido o un decapeptido.
12. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 3-11 para su uso como medicamento, que puede provocar células productoras de INF-γ en una población de PBL de un paciente con cáncer a una frecuencia de al menos 10 por 10⁴ PBL.
13. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 3-11 para su uso como medicamento, que puede provocar células productoras de INF-γ en una población de PBL de un paciente que tiene una enfermedad de cáncer en la que se expresa la proteína Bcl-X_L.
14. Péptido según la reivindicación 13 para su uso como medicamento, en el que la enfermedad de cáncer se selecciona del grupo que consiste en un tumor maligno hematopoyético incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mieloide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer de cervix, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata.
15. Composición de vacuna que comprende un péptido inmunogénicamente activo aislado derivado de Bcl-X_L según la reivindicación 1-15, o un ácido nucleico que codifica para dicho péptido, en la que dicho péptido es un péptido restringido a CMH de clase I que tiene al menos una de las siguientes características;
 - (i) puede unirse a la molécula de HLA de clase I a la que está restringido a una afinidad tal como se mide mediante la cantidad del péptido que puede realizar la mitad de la recuperación máxima de la molécula de HLA de clase I (valor C₅₀) que es como máximo de 50 μM tal como se determina mediante el ensayo de

unión-ensamblaje tal como se describe en el presente documento,

(ii) puede provocar células productoras de INF- γ en una población de PBL de un paciente con cáncer a una frecuencia de al menos 1 por 10⁴ PBL tal como se determina mediante un ensayo ELISPOT, y/o

(iii) puede realizar la detección *in situ* en un tejido tumoral de CTL que son reactivos con el péptido de epítipo,

- 5 para su uso como medicamento.
16. Composición de vacuna según la reivindicación 15 para su uso como medicamento, en la que la vacuna provoca la producción en un paciente vacunado de células T efectoras que tienen un efecto citotóxico frente a las células cancerosas.
- 10 17. Composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 15-16 para su uso como medicamento, comprendiendo la composición un adyuvante.
18. Composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 15-17 para su uso como medicamento, que comprende un péptido que está restringido a una molécula HLA-A del CMH de clase I en combinación con un péptido que está restringido a una molécula HLA-B del CMH de clase I.
- 15 19. Composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 15-18 para su uso como medicamento, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en adyuvantes a base de ADN bacteriano, adyuvantes a base de aceite/tensioactivo, adyuvantes a base de ARN bicatenario viral e imidazoquinilinas.
20. Kit de partes que comprende la composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 15-19 y un agente anticancerígeno adicional.
- 20 21. Kit de partes según la reivindicación 20, en el que el agente anticancerígeno es un anticuerpo.
22. Kit de partes según la reivindicación 20, en el que el agente anticancerígeno es una citocina.
23. Uso del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 en una composición para el diagnóstico *ex vivo* de la presencia en un paciente con cáncer de células T en PBL o en tejido tumoral que son reactivas con Bcl-X_L.
- 25 24. Uso del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o la composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 15-19 en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad de cáncer.
25. Uso según 24, en el que la enfermedad que va a tratarse es una enfermedad de cáncer en la que se expresa un miembro de la familia de proteínas Bcl-X_L.
- 30 26. Uso según la reivindicación 25, en el que la enfermedad de cáncer se selecciona del grupo que consiste en un tumor maligno hematopoyético incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mieloide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer de cervix, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata.
- 35 27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24-26, que se combina con un tratamiento contra el cáncer adicional.
28. Uso según 27, en el que el tratamiento adicional se selecciona del grupo que consiste en quimioterapia, radioterapia, tratamiento con sustancias inmunoestimulantes, terapia génica, tratamiento con anticuerpos y tratamiento usando células dendríticas.
- 40 29. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 15-19, para su uso como medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad de cáncer.
30. Péptido o composición de vacuna según la reivindicación 29 para su uso como medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad de cáncer, seleccionándose la enfermedad de cáncer del grupo que consiste en un tumor maligno hematopoyético incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mieloide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer de cervix, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata.
- 45 31. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para su uso en un método para el diagnóstico *in situ* de la presencia en un paciente con cáncer de células T en PBL o en tejido tumoral que son reactivas con Bcl-X_L.

32. Péptidos o composiciones de vacuna según la reivindicación 29 para su uso como medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad de cáncer, combinándose en el tratamiento con un tratamiento contra el cáncer adicional.
- 5 33. Péptidos o composiciones de vacuna según la reivindicación 32 para su uso como medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad de cáncer, seleccionándose el tratamiento adicional del grupo que consiste en quimioterapia, radioterapia, tratamiento con sustancias inmunoestimulantes, terapia génica, tratamiento con anticuerpos y tratamiento usando células dendríticas.

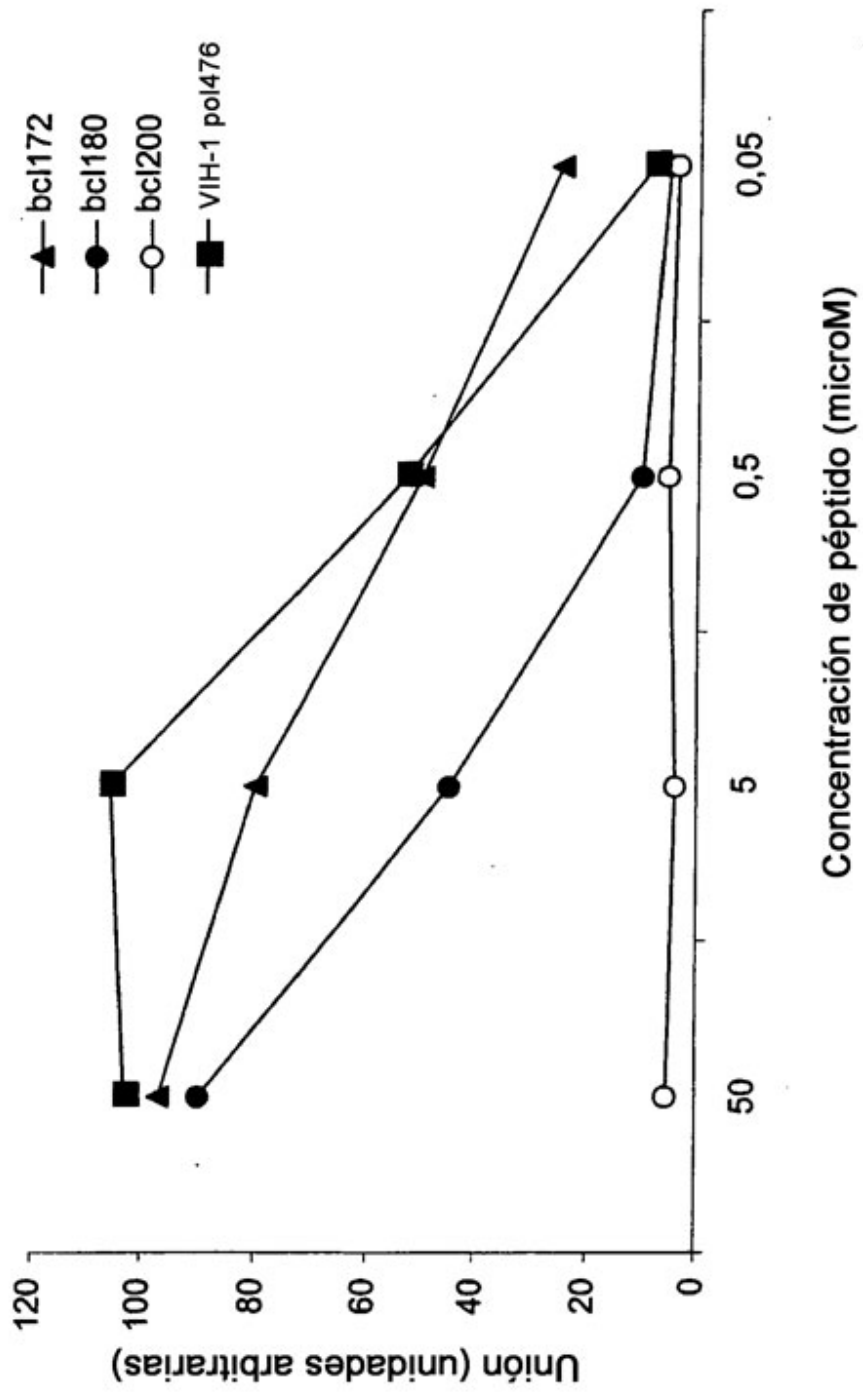
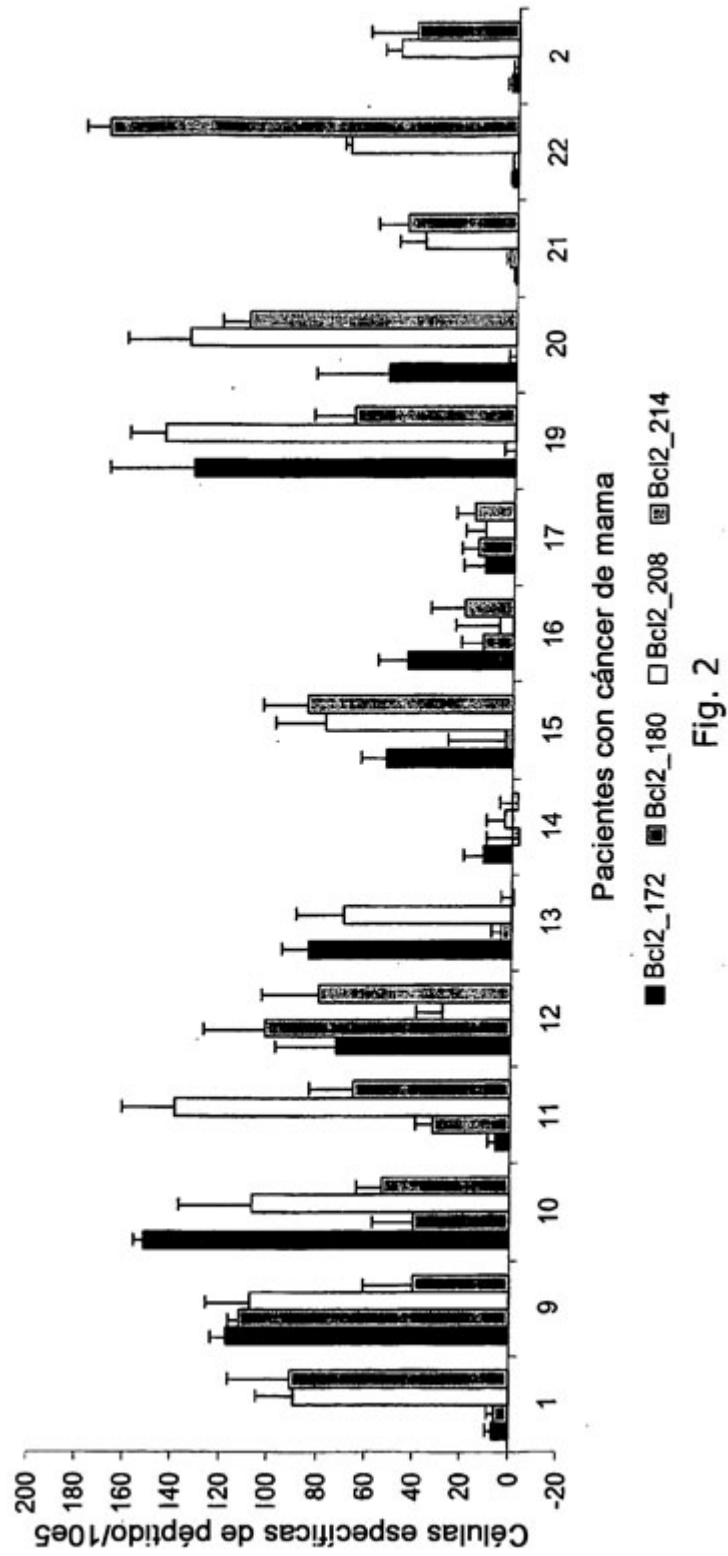


Fig. 1



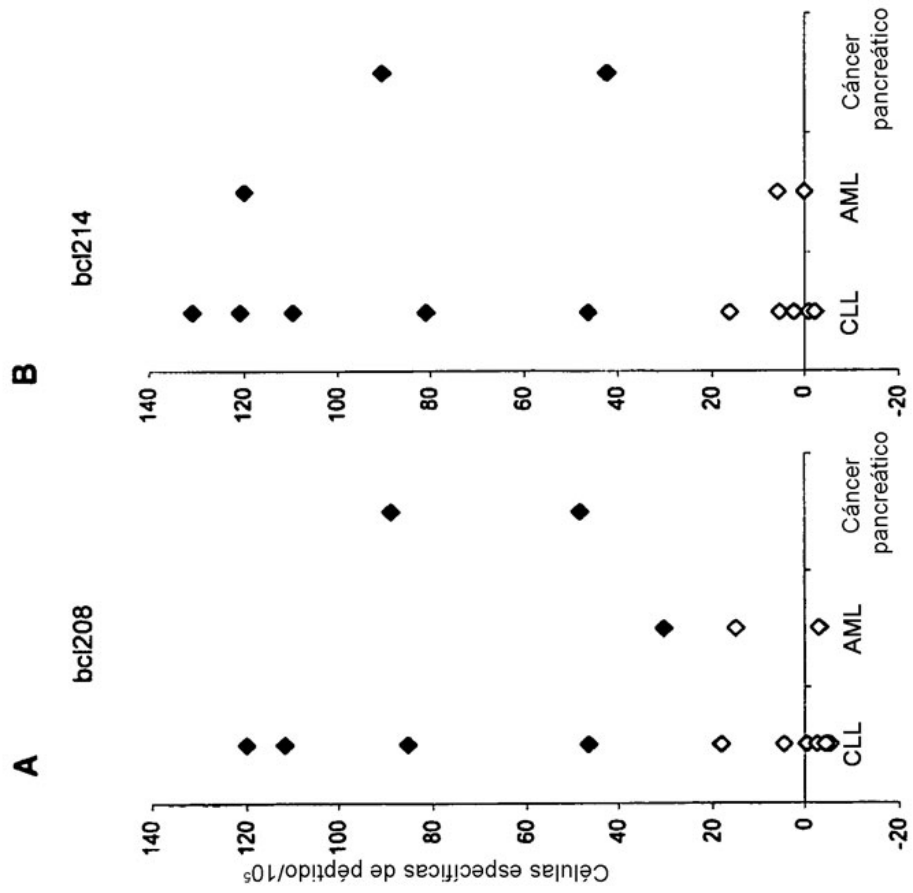


Fig. 3

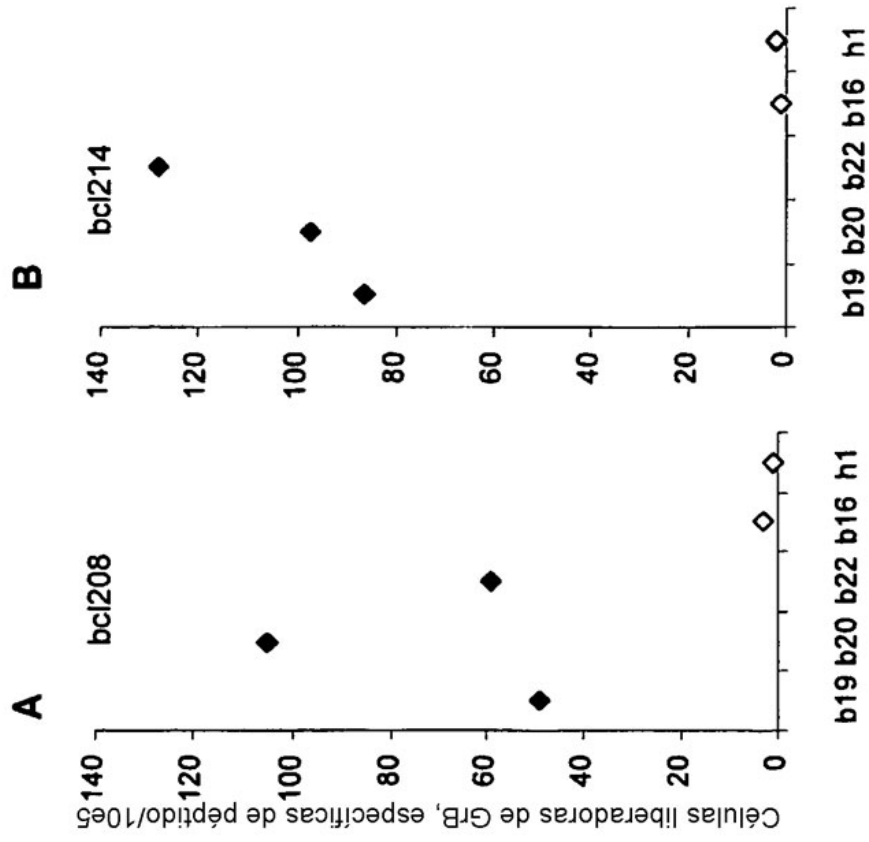


Fig. 4

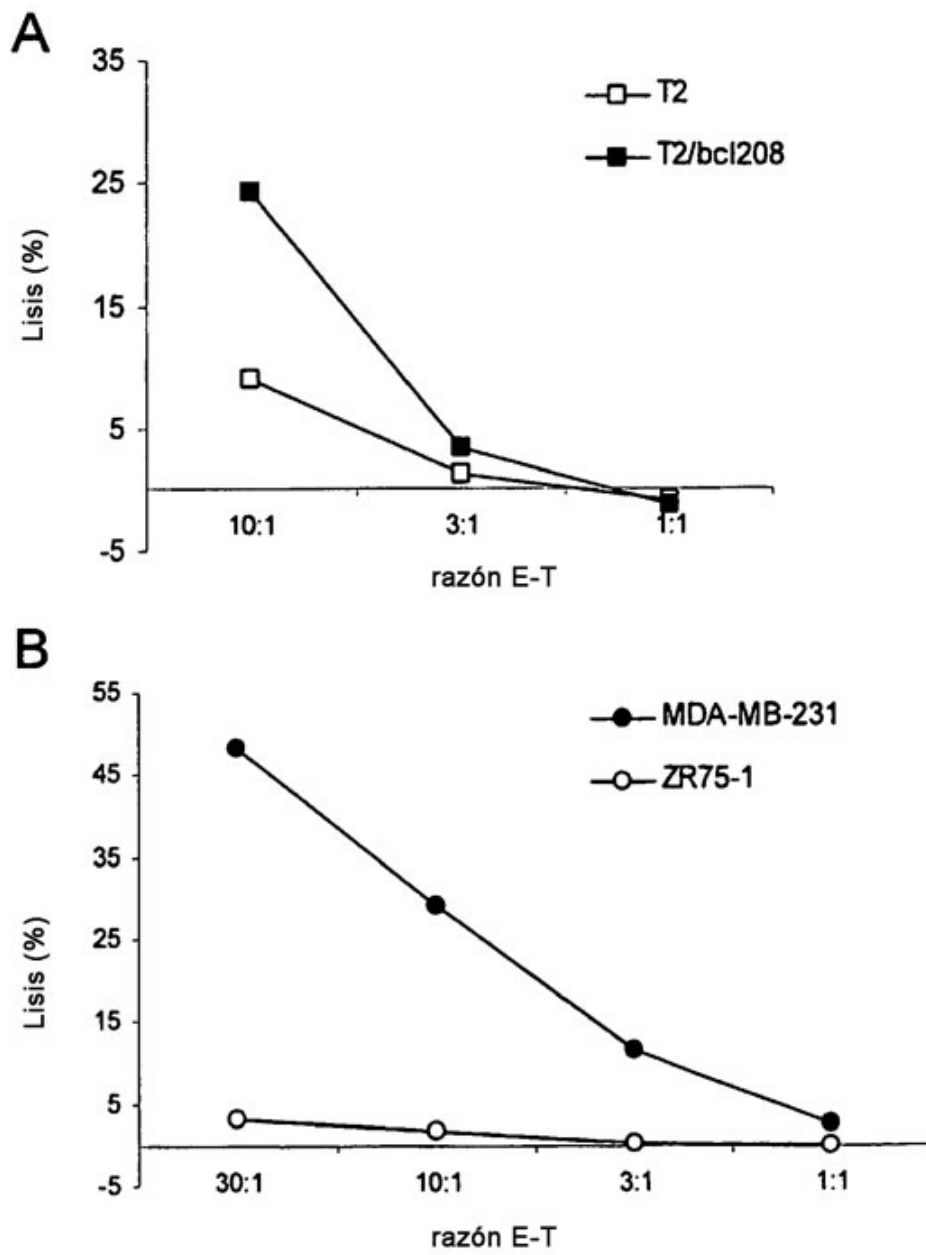


Fig. 5

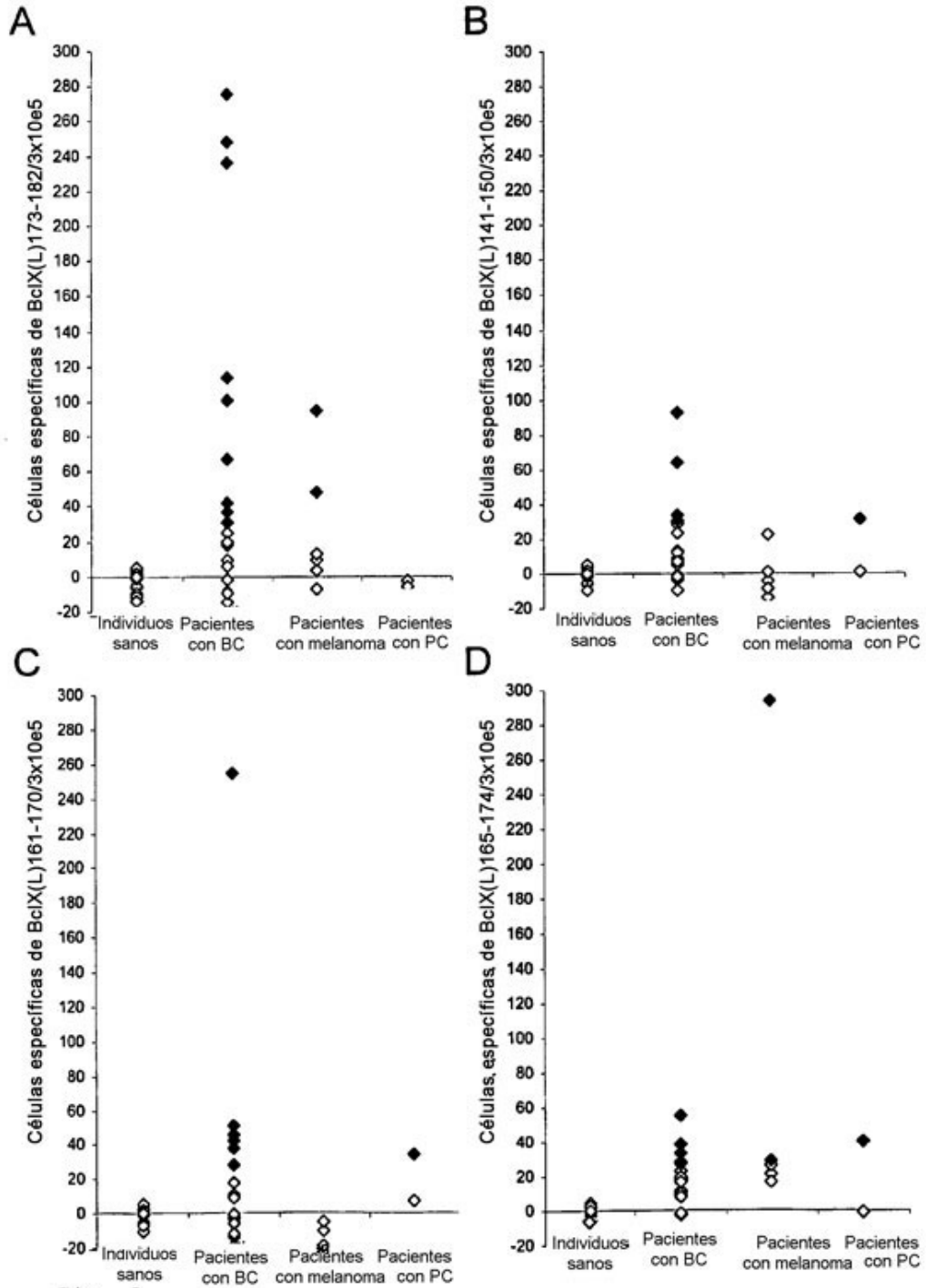


Fig. 6

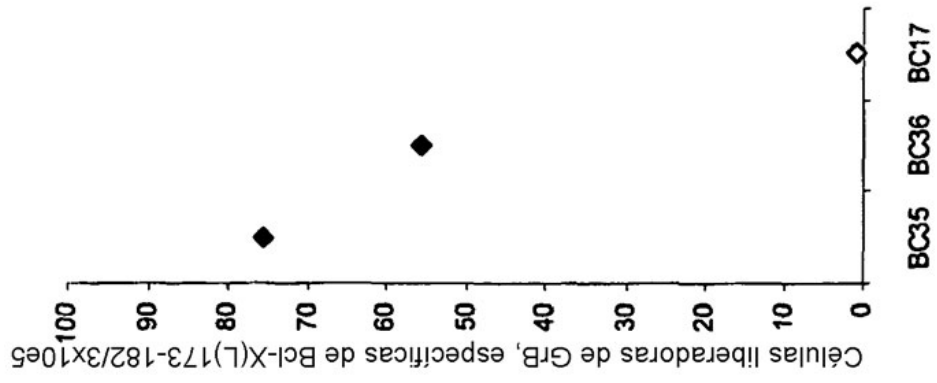


Fig. 7

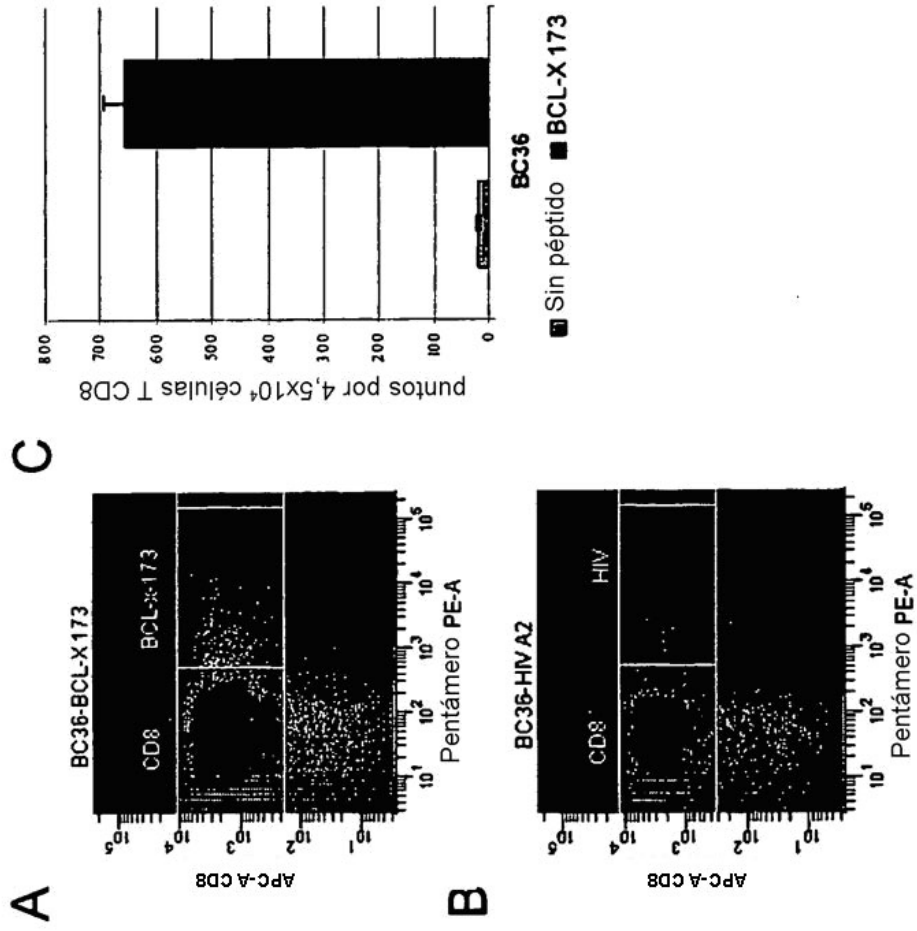


Fig. 8

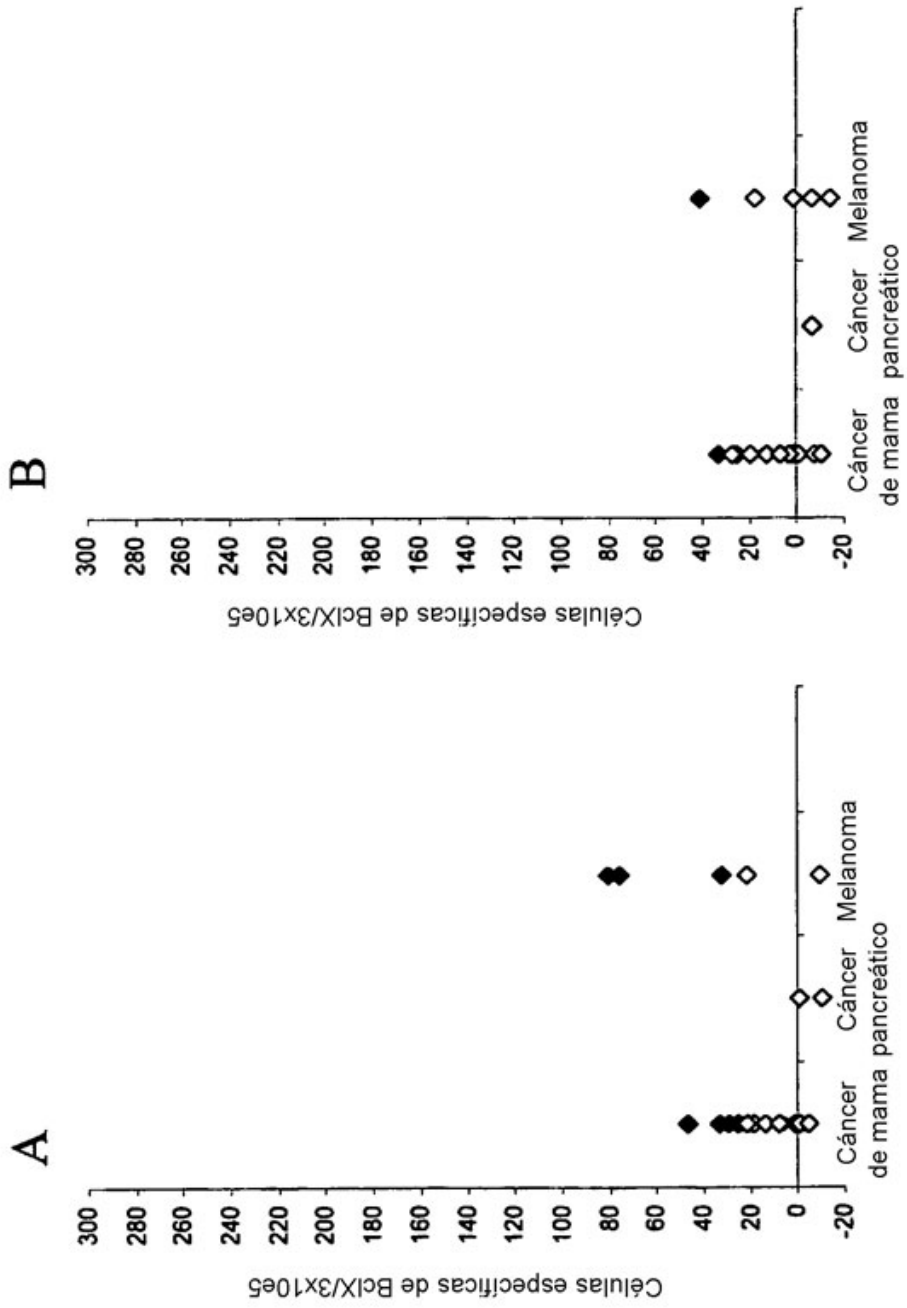


Fig. 9

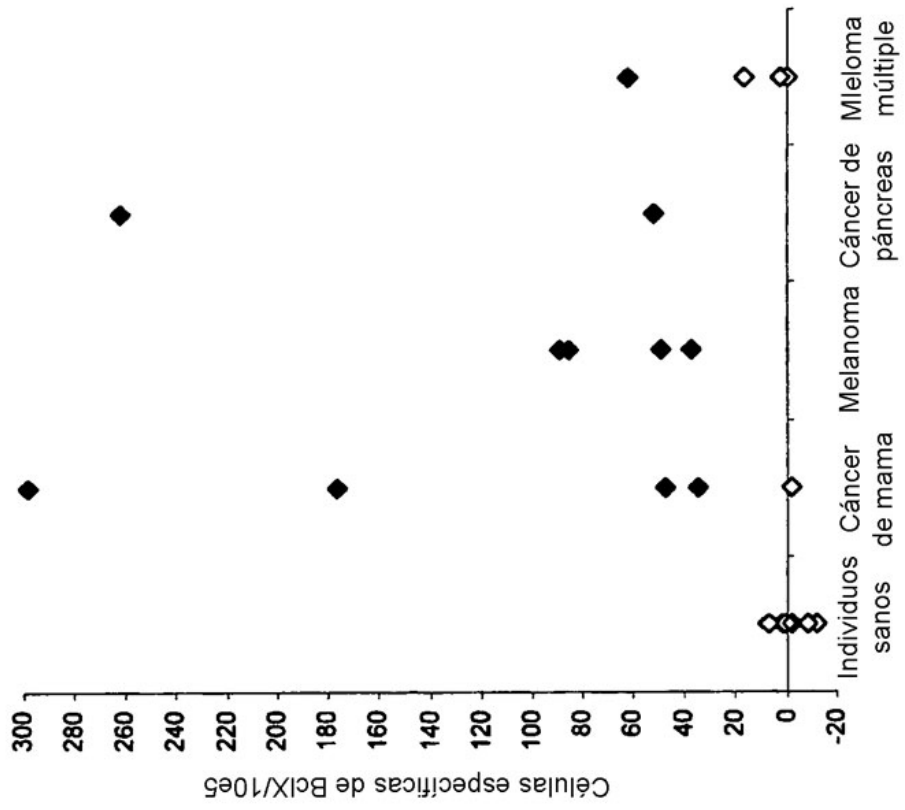


Fig. 10

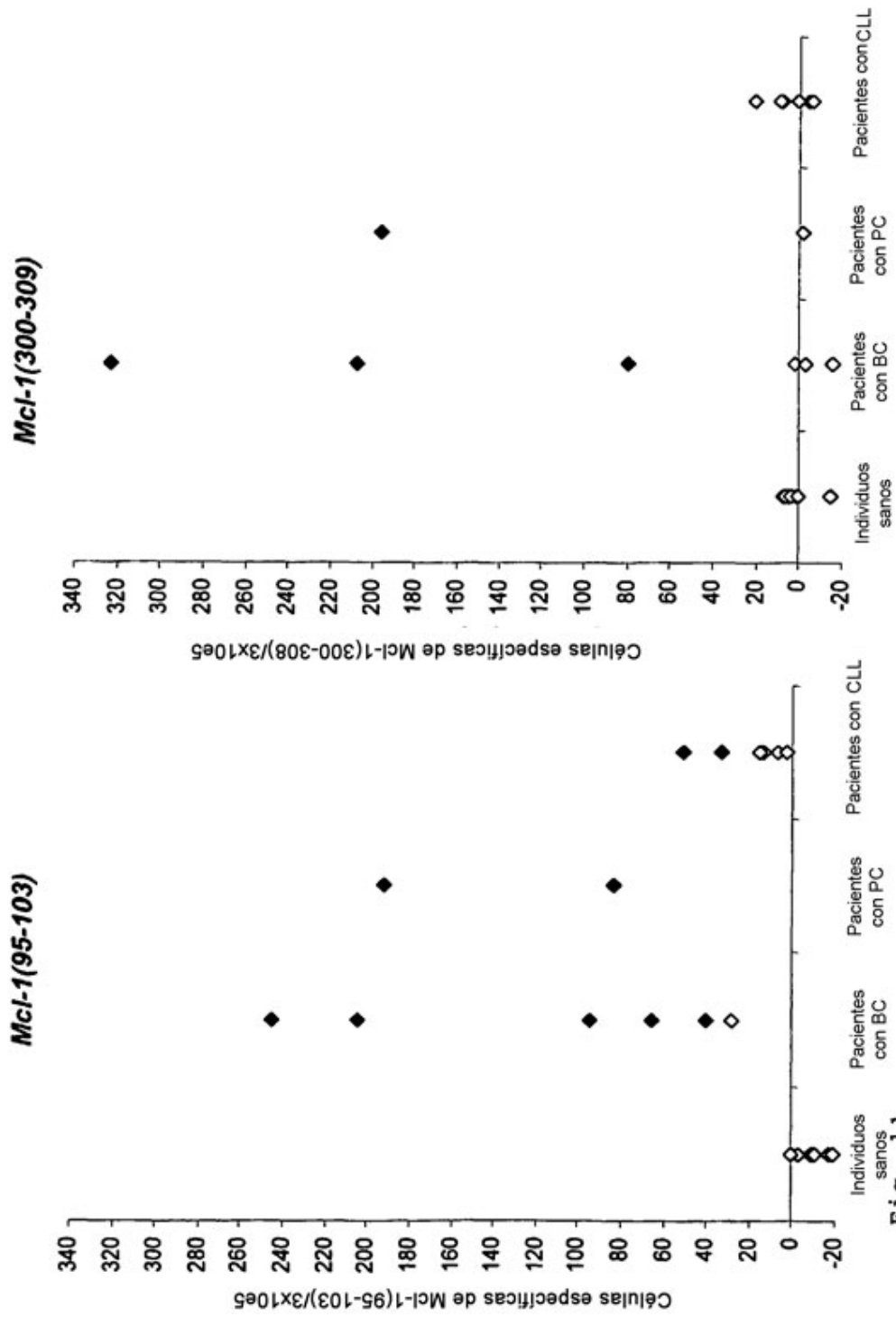


Fig. 11

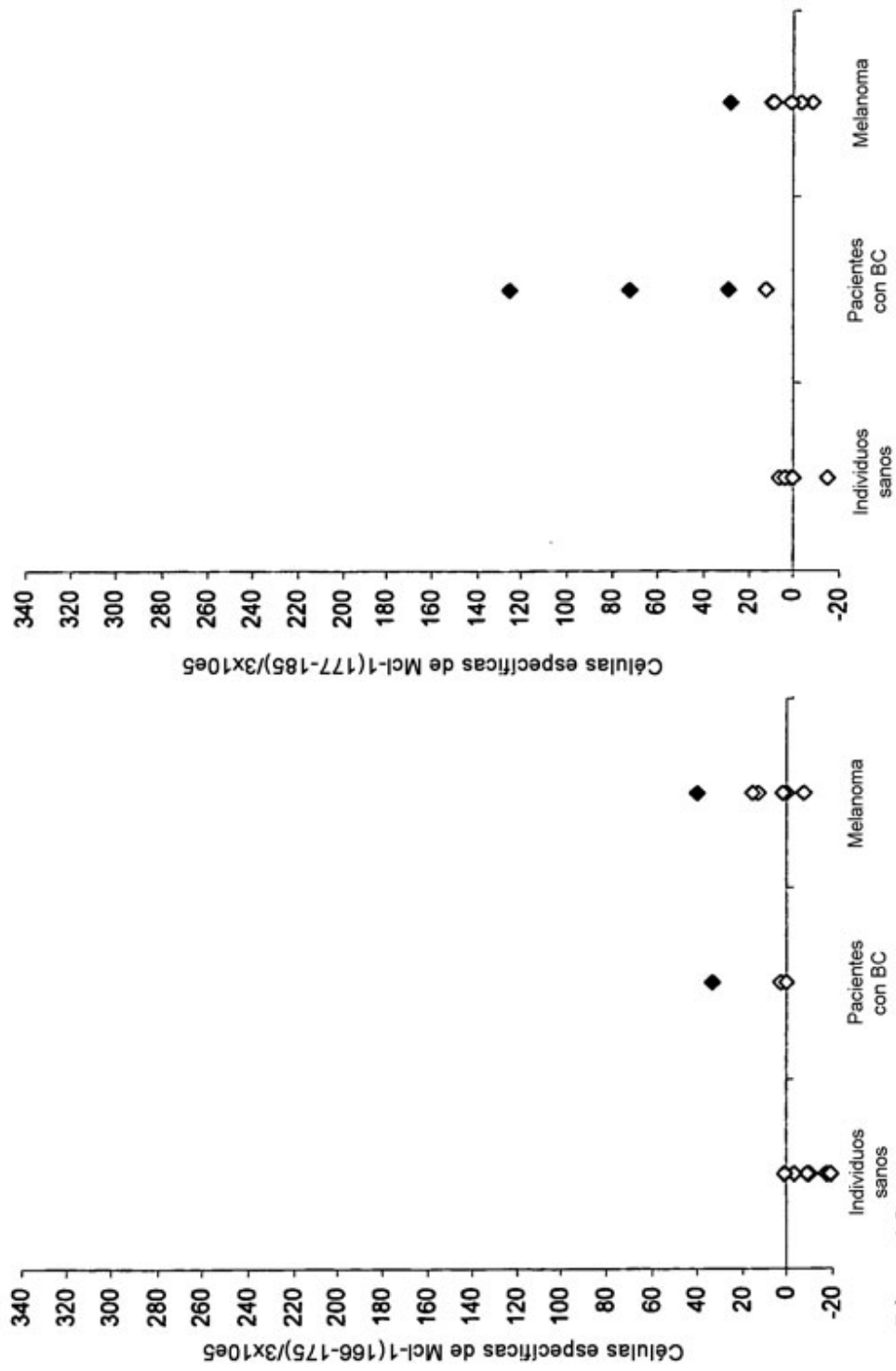


Fig. 12