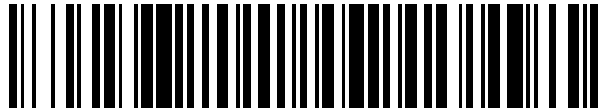


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 193**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2008 E 08796301 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2178548**

54 Título: **Péptidos de survivina como vacunas contra el cáncer**

30 Prioridad:

19.07.2007 US 961206 P

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

17.02.2015

73 Titular/es:

**HEALTH RESEARCH, INC. (100.0%)
ELM AND CARLTON STREETS
BUFFALO, NY 14263, US**

72 Inventor/es:

**CIESIELSKI, MICHAEL y
FENSTERMAKER, ROBERT, A.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 529 193 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

Péptidos de survivina como vacunas contra el cáncer

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere generalmente a vacunas contra el cáncer y más específicamente a un péptido de survivina modificado para su uso como vacuna contra el cáncer.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La survivina es una proteína intracelular de 16,5 kDa que pertenece a la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP). La survivina actúa en sintonía con el aparato del huso mitótico para regular la división celular. Se expresa en ciertas células durante la fase G2/M del ciclo celular y se asocia con el centro organizador de microtúbulos del huso durante esta fase de progresión del ciclo celular [Zhao J, y col. (2000) J Cell Sci, 113:4363-71; Li F y col. (1998) Nature, 396:580-4; Fortugno P y col. (2002) J Cell Sci, 115:575-85]. También se ha mostrado que la survivina modula la función de ciertas caspasas, inhibiendo directamente la apoptosis [Tamm I y col. (1998) Cancer Res, 58:5215-20; Conway y col. (2000) Blood 95:1435-42; Shin S y col. (2001) Biochemistry, 40:1117-23]. Además, la survivina inhibe el complejo de ciclina D/cdk4 [Fukuda S, Pelus LM. (2002) Cell Cycle, 1(5):322-6], permitiendo la progresión del ciclo celular. Así, la survivina funciona en funciones críticas en varios sitios celulares diferentes para regular el ciclo celular y para inhibir la muerte de células apoptóticas.

[0003] La survivina se expresa en exceso durante la fase G(2)/M del ciclo celular en la mayoría de las células cancerosas y es uno de los antígenos del cáncer más específicos identificados hasta la fecha. Se expresa en un gran porcentaje de tumores y raramente es detectable en tejidos de adultos normales [Overwijk WW, y col. (1998) J Exp Med, 188:277-86; Adida C y col. (1998) Am J Pathol 152:43-49]. Aunque la survivina se expresa en algunos casos dentro de las células precursoras y progenitoras hematopoyéticas CD34(+) que se han estimulado por factores de crecimiento hematopoyéticos, generalmente no se presenta sobre la superficie de estas células [Fukuda S, Pelus LM. (2002) Cell Cycle. 1(5):322-6].

[0004] Además de muchos otros cánceres, la expresión de survivina se produce comúnmente en gliomas malignos en los que está asociada a una mal pronóstico [Kajiwara Y, y col. (2003) Cancer 97:1077-1083; Sasaki T, (2002) Acta Neuropathol (Berl) 104:105-109; Chakravarti A, y col. (2002) J Clin Oncol, 20:1063-8]. Se han investigado los efectos antitumorales de una vacuna de células dendríticas derivadas de la médula ósea de survivina xenógena contra gliomas GL261 murinos [Ciesielski M. J. y col., (2006) Cancer Immunology, vol. 55, nº 12: 1491-1503]. Como la survivina se expresa por muchos tipos de cáncer diferentes, y por consiguiente, su uso como una diana de vacuna tumoral tiene amplias implicaciones para la terapia con vacunas contra el cáncer. Sin embargo, estudios previos no han identificado péptidos de survivina que sean eficaces cuando se administran tras la exposición al tumor. Además, están disponibles pocos datos referentes a la posible eficacia de los péptidos de survivina en seres humanos. Por tanto, hay una necesidad continua de péptidos de survivina que puedan provocar fuertes respuestas inmunitarias celulares para su uso como inmunoterapias contra el cáncer anti-survivalina.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0005] La presente invención proporciona composiciones para tratar cánceres que expresan survivina y se desvelan procedimientos para las mismas. Las composiciones comprenden miméticos de péptidos de survivina que contienen una alteración de cisteína a metionina en la posición de aminoácido 57 de la secuencia de proteínas de survivina no mutada. Las composiciones de la invención se definen en las reivindicaciones 1-10. También se desvelan péptidos que tienen 9-23 aminoácidos de longitud y la secuencia de SEQ ID NO:4 (ENEPDLAQMFFCFKELEGWEPDD) o un fragmento de la misma, en la que el fragmento comprende al menos 9 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:4, y en la que el fragmento también comprende la secuencia de SEQ ID NO:5 (QMFFCF). Los péptidos pueden estimular una respuesta inmunitaria mediada por células humanas mejorada contra células cancerosas humanas que expresan survivina, en comparación con la respuesta inmunitaria mediada por células provocada por péptidos que tienen la secuencia de survivina no mutada. También se demuestra que los péptidos confieren supervivencia prolongada en un modelo de ratón de glioma.

[0006] El procedimiento desvelado comprende administrar a un individuo diagnosticado con o que se sospecha que tiene un cáncer que expresa survivina una composición que comprende un péptido de la invención de forma que se inhiba el crecimiento del cáncer.

[0007] También se proporciona una población sustancialmente purificada de células dendríticas de mamífero que se cargan con un péptido de la invención, como se define en la reivindicación 11.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

[0008]

La Figura 1 proporciona un resumen de secuencias de péptidos no mutadas y alteradas utilizadas en la presente invención.

10 La Figura 2 proporciona una comparación gráfica de secuencias de péptidos no mutadas y alteradas que muestran epítopes de la clase I del MHC (HLA-A*0201) en recuadros. Una secuencia común a todos los péptidos de la invención (QMFFCF) está en cursiva en Survivina-53-67/57M.

La Figura 3 proporciona una representación gráfica de datos de pruebas *in vitro* obtenidos de ensayos de unión de péptidos de survivina.

15 La Figura 4 proporciona una representación gráfica de datos obtenidos de estudios de supervivencia intracraneal en un modelo murino GL261 que utiliza péptidos alterados basándose en los aminoácidos de survivina 53-67. Los péptidos se administraron usando vacunas de células dendríticas (CD) cargadas con péptido o como conjugados de hemocianina de lapa californiana (KLH).

20 La Figura 5 proporciona una representación fotográfica de análisis de imágenes por resonancia magnética de un ratón tratado según el procedimiento de la invención (panel derecho) y un control negativo (panel izquierdo).

La Figuras 6A, 6B y 6C proporcionan representaciones gráficas de los datos de un análisis de propiedades de unión de HLA-A*0201 de péptidos de survivina. Para obtener los datos resumidos en la Figura 6A y 6B, se usaron epítopes de péptidos de survivina en ensayos de desplazamiento competitivo de péptidos de la clase I del MHC. CI_{50} representa el 50 % de concentración de inhibición del péptido de survivina requerido para desplazar un ligando de la clase I del MHC humano conocido fluorescentemente marcado (HPV18-27). Los péptidos de control positivo (Flu y gp100) representan ligandos de la clase I del MHC inmunogénicos conocidos. Los datos representan fluorescencia media \pm E.E.M. de muestras por triplicado. La Figura 6C proporciona una representación gráfica de datos para la unión específica del pentámero HLA-A*0201 de epítopes del péptido de survivina no mutada y alterada.

30 La Figura 7 proporciona una representación fotográfica de la separación electroforética de la amplificación por RT-PCR de ARNm de survivina de especímenes de glioma humano. Se aisló ARN de lisados celulares de gliomas humanos y se amplificó usando RT-PCR. La banda de survivina de tamaño esperado se detectó abundantemente en 11/12 muestras, además de controles (M). La banda de control se derivó de PCR de un ADNc de survivina.

35 La Figura 8 proporciona una representación gráfica de datos obtenidos de la estimulación de linfocitos T *ex vivo* mediante células dendríticas autólogas cargadas con survivina expuestas a un glioma U87 no coincidente alógeno (linfocitos T de HLA-A*03 frente a glioma HLA-A*02; Alo-discordante).

40 La Figura 9 proporciona una representación gráfica de datos obtenidos de la estimulación de linfocitos T *ex vivo* mediante células dendríticas autólogas cargadas con survivina expuestas a un glioma U87 alógeno (HLA-A*02; Alo-coincidente).

La Figura 10 proporciona una representación gráfica de un segundo caso en el que se realizó la estimulación de linfocitos T *ex vivo* mediante células dendríticas autólogas cargadas con survivina expuestas al glioma U87 alógeno (HLA-A*02; Alo-coincidente).

45 La Figura 11 proporciona una representación gráfica de datos obtenidos de la estimulación de linfocitos T *ex vivo* mediante células dendríticas autólogas cargadas con survivina expuestas a glioma autólogo (HLA-A*03, HLA-A*29; Auto).

La Figura 12 proporciona una representación gráfica de datos obtenidos de la estimulación de linfocitos T *ex vivo* mediante células dendríticas autólogas cargadas con survivina expuestas al glioma DS-GBM alógeno (HLA-A*03; Alo-coincidente).

50 La Figura 13 proporciona una representación gráfica de datos obtenidos de la estimulación de linfocitos T *ex vivo* mediante células dendríticas autólogas cargadas con survivina expuestas a linfoma del SNC autólogo (HLA-A*2901, HLA-A*3002; Auto).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

55

[0009] La presente invención proporciona composiciones para inhibir el crecimiento de células cancerosas que expresan survivina. Las composiciones de la invención comprenden miméticos de péptidos de survivina que provocan una fuerte inmunidad antitumoral mediada por células que puede inhibir el crecimiento de tumores que contienen células cancerosas que expresan survivina. Se desvela un procedimiento que comprende administrar a un

individuo diagnosticado con o que se sospecha que tiene un cáncer que expresa survivina un mimético de péptido de la invención en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de las células cancerosas que expresan survivina en el individuo. La inhibición del crecimiento como se usa en el presente documento puede incluir reducción del tamaño de un tumor existente.

5

[0010] El procedimiento desvelado estimula una respuesta inmunitaria mediada por células a células cancerosas que expresan survivina. A propósito de la generación de inmunidad mediada por células, se considera que una respuesta inmunitaria celular robusta generalmente requiere que se exprese un epítipo del péptido en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC) unida a la molécula de la clase I del MHC, que puede desencadenar una respuesta de linfocitos T CD8+ (linfocito T citotóxico o CTL). Para respaldarse a sí misma, la respuesta inmunitaria de CTL está preferentemente respaldada mediante la presentación de epítopes del péptido unidos a moléculas de la clase II del MHC a linfocitos T CD4+ (linfocitos T colaboradores) que secretan citocinas. Aunque se ha mostrado que algunos péptidos de survivina provocan respuestas de CTL, han fracasado los intentos por proporcionar candidatos a vacuna de péptidos viables de la región de survivina de los números de aminoácido 15 53-67, posiblemente debido a una falta de capacidad de unión de HLA*0201 [Bachinsky MM, y col. (2005) Cancer Immun. 22;5:6].

[0011] La presente invención vence estas y otras limitaciones proporcionando péptidos derivados de la secuencia de survivina no mutada, en los que los péptidos comprenden una secuencia de aminoácidos alterada que mejora las propiedades de unión de I del MHC de manera que los péptidos son más eficaces que los péptidos no mutados en provocar respuestas de CTL humanas contra células cancerosas que expresan survivina.

[0012] La secuencia de aminoácidos completa de proteínas de survivina humana y de ratón se proporcionan como SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente. Las secuencias humanas y de ratón son el 100 % homólogas 25 entre los aminoácidos 31 y 71.

[0013] Se desvelan fragmentos de péptidos de survivina de longitud completa. Los fragmentos y pueden oscilar en tamaño de 9-23 aminoácidos. SEQ ID NO:3 (ENEPDLAQCFCKELEGWEPDD) consiste en los aminoácidos de survivina no mutada 49-71.

30

[0014] Cada péptido de aminoácido 9-23 desvelado comprende un cambio de cisteína a metionina (C a M) en la posición de aminoácido 57 de la secuencia de proteínas de survivina no mutada.

[0015] SEQ ID NO:4 (ENEPDLAQMFCKELEGWEPDD) es un péptido de 23 aminoácidos que consiste en los aminoácidos 49-71 de survivina no mutada, pero para una alteración de C a M en la posición de aminoácido 57 de survivina de longitud completa (la alteración de C a M está presente en el número de aminoácido 9 de SEQ ID NO:4). Los péptidos desvelados pueden consistir en 9-23 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:4, que incluyen todos los números enteros entre 9-23 aminoácidos, en los que los péptidos incluyen la alteración de C a M en la posición de aminoácido 57 de survivina de longitud completa. Cada péptido desvelado también comprende la 40 secuencia central de SEQ ID NO: 5 (QMFFCF).

En la Figura 1 se proporcionan péptidos de survivina representativos y la nomenclatura usada en el presente documento para los péptidos.

[0016] Algunos ejemplos no limitantes de los péptidos desvelados también se representan en la Figura 2, en la que la secuencia de epítopes central de SEQ ID NO:5 se muestra recuadrada y en cursiva en el contexto de secuencias de péptidos adecuadas más largas, también recuadradas, en el péptido mostrado a la derecha de la Figura 2. Por consiguiente, cada una de las secuencias recuadradas que incluyen la secuencia central en cursiva son secuencias de péptidos desvelados.

[0017] En una realización, un péptido de la invención consiste en SEQ ID NO:6 (DLAQMFCKELEGW). Este péptido se denomina alternativamente "SVN53-67/M57", "Survivina M57" y "M57". SVN53-67/M57 contiene epítopes para la unión de moléculas de MHC I humano y epítopes que pueden unirse a moléculas de MHC II humano para provocar respuestas de linfocitos T cooperadores CD4+.

[0018] Sin pretender quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que el cambio de C a M en los péptidos de la presente invención permite presentación mejorada de los epítopes de unión de MHC I al sistema inmunitario humano, en parte mediante el anclaje más eficaz a MHC I, produciendo un periodo de asociación más largo entre el péptido, la molécula de I del MHC y posiblemente los receptores de linfocitos T, y así, una respuesta inmunitaria más robusta. Péptidos más cortos pueden unirse a I del MHC exclusivamente. Péptidos más largos, tales como el 15-

mero SVN53-67/M57, se diseñan para unirse a la clase II del MHC, además de a la clase I del MHC.

- [0019]** Los presentes inventores demuestran que la sustitución de aminoácidos de C a M en SVN53-67/M57 aumenta la unión de I del MHC aproximadamente 73 veces en ensayos de unión *in situ* para HLA-A*0201 con respecto a la secuencia no mutada (resumido en la Figura 2 y la Figura 6C). Los presentes inventores también han determinado que los péptidos que comprenden el cambio de C a M pueden usarse para estimular eficazmente CTL CD8+, para estimular el soporte de citocinas derivadas de linfocitos T CD4+, para potenciar la supervivencia (y potencialmente ser curativos para glioma) en un modelo de ratón de cáncer cerebral, además de provocar una fuerte respuesta lítica *ex vivo* contra glioma humano y especímenes de linfoma del SNC. Por tanto, se espera que los péptidos de la invención puedan usarse en procedimientos para provocar unión de MHC-1 potenciada y actividad de CTL mejorada contra células cancerosas que expresan survivina cuando se usa como una vacuna *in vivo* en seres humanos debido a la asociación concomitantemente mejorada entre los epítopes del péptido procesado y residuos de anclaje de MHC-I.
- 15 **[0020]** Se espera que los péptidos 53-67 de SVN (con o sin el cambio de C a M) se unan a numerosas moléculas de la clase I y II del MHC que conjuntamente representan una gran población de pacientes (Tabla 1).

Tabla 1.

MHC Clase I		MHC Clase II
HLA-A*0201	HLA-B*08	HLA-DRB1*0301 (DR17)
HLA-A*03	HLA-B*1501 (B62)	HLA-DRB1*0401 (DR4Dw4)
HLA-A*1101	HLA-B*1510	HLA-DRB1*0701
HLA-A*2402	HLA-B*18	
HLA-A*2402	HLA-B*2705	HLA-DRB1*1501 (DR2b)
HLA-A*26	HLA-B*2709	
HLA-A*6801	HLA-B*3901	
HLA-B*0702	HLA-B*4402	
HLA-B*08	HLA-B*5101	
HLA-B*1402		

- 20 **[0021]** Los péptidos de la invención pueden prepararse por cualquier técnica conocida para aquellos expertos en la materia o por técnicas desarrolladas de ahora en adelante. Por ejemplo, los péptidos pueden prepararse usando la técnica sintética en fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 15:2149-2154 (1963); M. Bodanszky y col., (1976) Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2d Ed.; Kent y Clark-Lewis en Synthetic Peptides in Biology and Medicine, pág. 295-358, eds. Alitalo, K., y col. Science Publishers (Ámsterdam, 1985). La síntesis de péptidos por procedimientos de disolución también puede usarse, como se describe en The Proteins, vol. II, 3ª ed., pág. 105-237, Neurath, H., y col., Eds., Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976). Los péptidos sintetizados pueden purificarse sustancialmente por cromatografía líquida de alta resolución preparativa u otras técnicas comparables disponibles en la materia. La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse por una técnica para el análisis de la composición de aminoácidos.
- 25 **[0022]** Los péptidos de la presente invención pueden formularse con un adyuvante adecuado con el fin de potenciar la respuesta inmunológica. Adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, sales minerales, que incluyen geles de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio y de calcio, emulsiones de aceite y formulaciones basadas en tensioactivo, saponina, AS02 [SBAS2] (emulsión de aceite en agua), Montanide ISA-51 e ISA-720, adyuvantes en partículas, que incluyen virosomas, AS04, [SBAS4] sal de Al con MPL, ISCOEM (complejo estructurado de saponinas y lípidos), polilactida-co-glicolida (PLG), derivados microbianos naturales y sintéticos, inmunoestimulantes lipoidales OM-174 (derivado de lípido A), oligonucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG inmunoestimulantes, toxinas bacterianas modificadas, inmunomoduladores humanos endógenos, que incluyen hGM-CSF y hIL-12, hIL-15, hIL-17, hIL-21, Immudaptin y vehículos inertes, que incluyen partículas de oro. Los péptidos pueden administrarse en una forma de dosificación convencional preparada combinando los péptidos con un vehículo farmacéuticamente aceptable convencional según técnicas conocidas. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables pueden encontrarse en: Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2005) 21ª edición, Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins.
- 30 **[0023]** En una realización, los péptidos de la invención pueden conjugarse con una proteína transportadora inmunogénica. Vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de *Limulus polyphemus* (LPH), hemocianina de *Tachypleus tridentatus* (TTH) y albúmina de suero bovino (BSA), toxoide tetánico y toxina diftérica, DHBcAg, poliribitol ribosil fosfato (PRP), PncPD11 y formulaciones de nanopartículas.
- 35 **[0022]**
- 40 **[0023]**
- 45 **[0023]**

[0024] En una realización, una proteína transportadora inmunogénica adecuada es hemocianina de lapa californiana (KLH).

[0025] Los péptidos de la invención también pueden administrarse como células dendríticas cargadas de péptido. Así, el procedimiento incluye administrar las células dendríticas individuales que se han incubado con un péptido de la invención de forma que las células dendríticas hayan captado el péptido para obtener células dendríticas cargadas de péptido que facilitan la presentación de epítoto(s) del MHC presente(s) en el péptido. Las células dendríticas empleadas para este fin pueden aislarse del individuo al que van a administrarse después de la incubación con el péptido, o pueden obtenerse de un individuo alo-coincidente. Por consiguiente, la invención también proporciona una composición que comprende una población sustancialmente purificada de células dendríticas de mamífero, en la que las células dendríticas se han incubado con un péptido de la invención de forma que las células dendríticas capten el péptido.

[0026] Pueden usarse diversos procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia para introducir las composiciones de la invención a un individuo. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, vías intracraneal, intratecal, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral y intranasal.

[0027] Se reconocerá por aquellos expertos en la materia que la forma y el carácter de la pauta de dosificación particular empleada en el procedimiento de la invención estará impuesta por la vía de administración y otras variables muy conocidas, tales como el tamaño del individuo y el estadio de la enfermedad. Basándose en tales criterios y en los datos presentados en el presente documento, un experto en la materia puede determinar una cantidad de péptido eficaz para inhibir el crecimiento de células cancerosas que expresan survivina para cualquier individuo particular. Se considera generalmente que la cantidad de péptido administrado oscilará de cantidades de microgramo a miligramo.

[0028] El procedimiento desvelado puede realizarse conjuntamente con terapias contra el cáncer convencionales. Tales terapias pueden incluir, pero no se limitan a, quimioterapias, intervenciones quirúrgicas y radioterapia. Las composiciones de la invención pueden administrarse antes de, simultáneamente, o posterior a tales terapias contra el cáncer.

[0029] Los siguientes ejemplos se indican para ilustrar, pero no para limitar, la presente invención.

Ejemplo 1

[0030] Este ejemplo proporciona un análisis *in vitro* de epítotos de péptidos de survivina seleccionados predichos por el análisis de SYFPEITHI para unirse a moléculas de la clase I del MHC (Tabla 2). El péptido de control positivo (OVA-258) representa un ligando de la clase I del MHC inmunogénico conocido con una puntuación que indica fuerte unión posible. Residuos de aminoácidos subrayados representan posiciones de anclaje de I del MHC.

Tabla 2.

Posición de unión a H-2K ^b predicha	Epítoto	Puntuación
OVA-258	S IIN F E K L (SEQ ID NO:7)	25
SVN-9	A W Q P F L K D (SEQ ID NO:8)	12
SVN-18	R I S T F K N W (SEQ ID NO:9)	13
SVN-39	A E A G F I H C (SEQ ID NO:10)	12
SVN-57-64	C F F C F K E L (SEQ ID NO:11)	20
SVN-57-64/M57	M F F C F K E L (SEQ ID NO:17)	20
SVN-82	S G C A F L S V (SEQ ID NO:12)	18
SVN-L82	L G C A F L S V (SEQ ID NO:13)	18
SVN-97	T L G E F L K L (SEQ ID NO:14)	22

[0031] En la Figura 3 se presentan datos de pruebas *in vitro* para ensayos de unión de péptido. Para obtener los datos presentados en la Figura 3, se usaron epítotos de péptidos de survivina en ensayos de unión de péptidos de la clase I del MHC convencionales. La fluorescencia media en la Figura 3 representa la unión de péptidos de SVN a H2-K^b. Se usó regulación por incremento de moléculas H2-K^b sobre la superficie de células RMA-S murinas que son deficientes en la expresión de moléculas de la clase I del MHC de la superficie para determinar la unión real del péptido de survivina *in vitro*. Los datos presentados en la Figura 3 representan la unión de péptido 100 µM a 37 °C.

El control negativo es un péptido irrelevante que no se une a la clase I del MHC. Los datos representan fluorescencia media \pm E.E.M. de muestras por triplicado.

[0032] Como puede apreciarse de los datos presentados en la Figura 3, el análisis informático es insuficiente para predecir de manera fiable el efecto de secuencias de péptidos alteradas sobre la intensidad de la unión de MHC. En particular, SVN₉₇₋₁₀₄ es un péptido que está actualmente en ensayos clínicos, pero presenta unión que es inferior a la de SVN 57-64wt, y considerablemente inferior a la de SVN 57-64/M57, a pesar de los datos en la Tabla 2 que indican que SVN₉₇₋₁₀₄ debe presentar unión más fuerte que cualquiera del péptido SVN 57-64 no mutado o mutante. Además, aunque otros cambios a aminoácidos también pueden potenciar la unión, los presentes inventores han determinado que cambios a las posiciones de anclaje de aminoácidos 57, 59 y 64 (incluyendo los cambios 57C>L, 59F>Y y 64L>V) no mejoran la respuesta inmunitaria a los péptidos, a pesar del análisis informático que predice la retención de MHC mejorada en comparación con la secuencia no mutada. Adicionalmente, los presentes inventores también han determinado que la mera sustitución de una metionina con un aminoácido en la primera posición de anclaje de la clase I del MHC no produce necesariamente supervivencia potenciada en un modelo de ratón de glioma intracraneal, como se demuestra por los análisis de los presentes inventores de un nonapéptido de survivina que comprende un cambio de S a M en la posición de aminoácido de survivina 82.

Ejemplo 2

[0033] Este ejemplo demuestra la eficacia de los péptidos de la invención en el tratamiento de un modelo de ratón de glioma intracraneal.

[0034] Para evaluar la capacidad de los péptidos de la invención para provocar una respuesta inmunitaria contra células cancerosas que expresan survivina, los presentes inventores usaron lo que se cree que es el modelo más riguroso disponible para probar la eficacia de vacunas contra glioma. A este respecto, se sabe ampliamente que el crecimiento de tumores intracraneales es muy difícil de inhibir, especialmente con vacunas contra el cáncer, ya que los resultados obtenidos para tumores subcutáneos no se reflejan frecuentemente en la eficacia intracraneal. El crecimiento inhibido de tumores intracraneales en respuesta a múltiples estrategias de péptidos basadas en M57 soporta un efecto antineoplásico válido de la presente invención.

[0035] A menos que se especifique de otro modo, los datos presentados en este ejemplo se generaron usando el modelo de glioma intracraneal murino singénico GL261-C57BL/6. El modelo de glioma intracerebral GL261 se caracteriza por una estrecha ventana de supervivencia, alta supervivencia inicial y reproducibilidad coherente.

[0036] Se emplearon los siguientes materiales y procedimientos para obtener los datos presentados en este ejemplo.

[0037] Líneas celulares y condiciones de cultivo. Se cultivan células de glioma murino GL261 sobre placas de cultivo de tejido de 100 mm en medio Eagle modificado por Dulbecco completo (DMEM) que contenía 10 % de suero bovino fetal, 5.000 unidades de penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol 50 μ M, HEPES 25 mM y 1x aminoácidos no esenciales a 37 °C en 5 % de CO₂ con cambios de medio de dos a tres veces por semana. La línea de células dendríticas DC2.4 se cultivó a una densidad de 2x10⁶ células/ml en RPMI que contenía 10 % de suero bovino fetal, 5.000 unidades de penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol 50 μ M, HEPES 25 mM, 1x aminoácidos no esenciales y 20 ng/ml de GM-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Las células de glioma murino GL261 se cultivaron sobre placas de cultivo de tejido de 100 mm en medio Eagle modificado por Dulbecco completo (DMEM) que contenía 10 % de suero bovino fetal, 5.000 unidades de penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol 50 μ M, HEPES 25 mM y 1x aminoácidos no esenciales a 37 °C en 5 % de CO₂ con cambios de medio de dos a tres veces por semana.

[0038] Péptidos. La síntesis de péptidos se realizó usando química de Fmoc y una resina de soporte sólido (Sigma-Genosys, The Woodlands, TX). Cada péptido se almacenó a -20 °C hasta uso y se diluyó en DMSO. Se usó una de secuencia de péptidos de albúmina de huevo (OVA) SIINFEKL como control

[0039] Inmunización de ratones con CD cargadas de péptido. Se generan células dendríticas (CD) cargadas de péptido a partir de tanto la línea celular DC2.4 como células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) recogidas cultivadas en cultivo como se ha descrito previamente en, por ejemplo, Ciesielski y col. Cancer Immunol Immunother. 2006 Vol. 12, pp1491-503. Las BMDC se recogen de los huesos largos de ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad sacrificados y las células se cultivan a una densidad de 2x10⁶ células/ml en RPMI que

contiene 10 % de suero bovino fetal, 5.000 U de penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol 50 µM, HEPES 25 mM, 1x aminoácidos no esenciales y 20 ng/ml de GM-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, EE.UU.). Después de 48 horas, se eliminan las células no adherentes y se repone medio que contiene GM-CSF. Después de 6 días, se recogen las células no adherentes para la carga de péptido. Se cargan células DC2.4 y BMDC con 40 µg de cada péptido 5 añadido a pocillos individuales que contienen 3x10⁶ CD por ml. Se incuban los péptidos y las CD a 37 °C durante 2 horas, se recogen, se lavan y se resuspenden en PBS. Generalmente se usa un total de 1x10⁶ CS para vacunar cada animal mediante la vía subcutánea. Se proporcionan vacunas de refuerzo de la misma composición cada 7 15 días, dependiendo de la supervivencia.

10 **[0040] Aislamiento de esplenocitos y linfocitos T.** Se recoge tejido esplénico de ratones C57BL/6 vacunados en el criterio de valoración sacrificio. Se desmenuzan las células de los bazo de ratón con pinzas estériles y se pasan a través de un filtro de 70 µm (BD Falcon). Se cultivan esplenocitos en DMEM que contiene 10 % de suero bovino fetal, IL-2 (10 unidades/ml) y IL-7 (1 ng/ml). Se repone medio en los días 2 y 7. Para aislar linfocitos T, los esplenocitos se centrifugan durante 5 min y el sedimento se resuspende en tampón de lisis RBC 15 (R&D Systems). Las células se lavan dos veces y se resuspenden en medio de cultivo RPMI completo.

[0041] Lisis de células tumorales por CTL. Se realizan ensayos celulares para la lisis específica de linfocitos T de células tumorales diana usando el kit de citotoxicidad mediada por células Live/Dead (Molecular Probes-Invitrogen). Se tripsinan células GL261 y se suspenden a 1x10⁶ células/ml, seguido de la adición de 10 µl de marca DiOC₁₈ (fluorescencia verde) durante 20 min a 37 °C. Después del marcado, las células se centrifugan, se lavan en PBS dos veces y se resuspenden a 1x10⁶ células/ml de DMEM. A continuación, se añaden 1x10⁴ células diana GL261 marcadas con DiOC₁₈ a tubos de cultivo individuales. Se añaden esplenocitos de animales vacunados a las células diana en relaciones que oscilan de 1:25 a 1:100 durante 2 horas a 37 °C. También se fijan condiciones para ensayar niveles de referencia, pérdida espontánea de la integridad de la membrana y lisis máxima. Se añade 25 yoduro de propidio a cada tubo para marcar de rojo células con membranas celulares permeadas. Se sedimentan las células y se usan para análisis de FACS. El porcentaje de citotoxicidad se calcula usando la fórmula: (células PI-DiOC₁₈ experimentales - espontáneas)/(PI-DiOC₁₈ máximo - PI-DiOC₁₈ espontáneo) x 100. La máxima liberación se determina por congelación-descongelación repetida de células diana marcadas con DiOC₁₈. La liberación espontánea se mide incubando células PI-DiOC₁₈ en ausencia de células efectoras. Los datos se analizan usando el 30 software FCS Express. El análisis se basa en regular células GL261 para eliminar cualquier ruido de fondo de células efectoras.

[0042] Inyección de células tumorales GL261 intracerebrales y análisis de supervivencia. Se anestesian ratones C57BL/6 macho con una inyección intraperitoneal (i.p.) de ketamina (80 mg/kg) y xilazina (20 mg/kg) y se fijan en un marco para la cabeza estereotáctico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). Se hace una incisión en la línea media del cuero cabelludo y se identifica el bregma. Se miden las coordenadas estereotácticas (2,0 mm lateral al bregma) para la implantación de células en la sustancia blanca frontal profunda. Se perfora un agujero de trépano en ese punto y se suspenden 1x10⁵ células GL261 en 5 µl de DMEM y se inyectan mediante una jeringa de Hamilton con una cánula fija de 25 de calibre a una profundidad de 3,0 mm con respecto a la duramadre. Se realizan 40 inyecciones a 2,5 µl/min. Se saca la aguja y se sutura la incisión. Se dibujan representaciones de supervivencia de Kaplan-Meier y se determina la mediana de los tiempos de supervivencia para todos los grupos. Se evalúan diferencias de supervivencia para significancia usando el método del orden logarítmico de Mantel-Cox.

[0043] Se proporciona un resumen de resultados de los estudios de supervivencia en el modelo de glioma 45 intracraneal murino en la Tabla 3.

Tabla 3.

Secuencia de péptidos	Resultado
DLAQMFFCFKELEGW (SVN53-67/57M) (SEQ ID NO:6)	Vacuna de CD = Mediana de la supervivencia de 53 días 2/8 supervivientes en 100 días
DLAQMFFCFKELEGW (SVN53-67/57M) (SEQ ID NO:6)	KLH Vacuna = Mediana de la supervivencia de 51 días 1/8 supervivientes en 100 días
AQMFFCFKEL (SVN55-64/57M) (SEQ ID NO:15)	Vacuna de CD = Mediana de la supervivencia de 43 días
QMFFCFKEL (SVN56-64/57M) (SEQ ID NO:16)	Vacuna de CD = Mediana de la supervivencia de 40 días
MFFCFKEL (SVN57-64/57M) (SEQ ID NO:17)	Vacuna de CD = Mediana de la supervivencia de 29 días

Secuencia de péptidos	Resultado
DLAQCFFCFKELEGW (SVN53-67) (SEQ ID NO:18)	Vacuna de CD = Mediana de la supervivencia de 57 días 2/8 supervivientes en 100 días
CFFCFKEL (SVN57-64) (SEQ ID NO:11)	Vacuna de CD = Mediana de la supervivencia de 25 días

[0044] La Figura 4 proporciona un resumen gráfico de los datos de estudios de supervivencia intracraneal que muestran la supervivencia de ratones C57BL6 con implantes de glioma GL261 intracerebral. Para obtener los datos presentados en la Figura 4, se implantaron intracranealmente ratones con 1×10^5 células GL261 y se trataron con 5 vacunas de CD de péptido de survivina. Se inmunizaron ratones C57BL/6 con péptidos alterados basados en SVN57-64, o células DC2.4 cargadas de péptido de OVA258-265, además de una inyección subcutánea directa de 100 ug del péptido SVN 53-67/M57-KLH en adyuvante incompleto de Freund (IFA) más 100 ng de GM-CSF. Las vacunaciones empezaron 4 días después de la implantación de células tumorales y se repitieron (reforzaron) cada 7 días para simular un entorno terapéutico. La supervivencia se representó según métodos de Kaplan-Meier. Se 10 confirmaron supervivientes a largo plazo libres de tumor por IRM de intensidad de campo alto.

[0045] Como puede apreciarse de la Tabla 3 y la Figura 4, la vacuna de CD del péptido SVN57-64/M57 potencia la supervivencia moderadamente con respecto al péptido mutado en el modelo de glioma GL261-C57BL/6. Y, lo que es más importante, tanto SVN53-67/M57 como SVN53-67 (no mutada) confieren 100 % de tasas de 15 supervivencia en ratones durante más de 40 días cuando se usan como vacunas de CD. SVN53-67/M57 también se probó como vacuna de KLH y produjo una mediana de la supervivencia de 51 días.

[0046] La Figura 5 proporciona una imagen de resonancia magnética representativa de un ratón de una curva de supervivencia mostrada en la Figura 4. Normalmente, se desarrolla un tumor letal por el día 18, como se 20 representa en cerebro de ratón de control en el panel izquierdo. Los ratones que recibieron vacuna de péptido de SVN53-67/M57 estuvieron

[0047] La Figura 5 proporciona una imagen de resonancia magnética representativa de un ratón de una curva de supervivencia mostrada en la Figura 4. Normalmente, se desarrolla un tumor letal por el día 18, como se 25 representa en cerebro de ratón de control en el panel izquierdo. Los ratones que recibieron vacuna de péptido de SVN53-67/M57 todavía estuvieron libres de tumor a partir del día 40. Puede observarse un pequeño tramo de aguja y tejido cicatricial residual en el hemisferio frontal izquierdo de la imagen del ratón vacunado.

[0048] Así, este ejemplo demuestra que los péptidos de la invención pueden potenciar la supervivencia y son 30 potencialmente curativos en un modelo de ratón clínicamente relevante de glioma.

Ejemplo 3

[0049] Este ejemplo demuestra la unión potenciada de la clase I del MHC de los péptidos de la invención con 35 respecto a péptidos no mutados, y también demuestra que los péptidos de la invención pueden provocar una respuesta inmunitaria mediada por células potenciada contra células cancerosas humanas que expresan survivina, que incluye contra células cancerosas no de glioma.

[0050] Sin pretender quedar ligado a teoría particular alguna, se considera que SVN53-67/M57 y SVN53-67 40 presentan perfiles de supervivencia similares en ratones C57BL/6 debido a que la alteración de M57 no se encuentra en una posición de anclaje con respecto a la molécula H-2Kb de ratón. Como tal, ambos péptidos se unirán a H-2Kb (el homólogo de la clase I del MHC murino) a un grado similar en ratones. La observación de que SVN53-67/M57 retiene la respuesta inmunogénica no mutada en ratones a pesar de contener un epítipo humano en alerta indica que es un mimético de péptido eficaz (a pesar del hecho de que podría esperarse que una alteración de aminoácido tal afectara negativamente la inmunidad debido a la rotura de la interacción con el receptor de linfocitos T) y que la 45 alteración de C a M no confiere efectos perjudiciales cuando SVN53-67/M57 se usa como vacuna. Sin embargo, es en la administración a seres humanos que se espera que los péptidos de la invención muestren su potencial mejorado, ya que la alteración de 57C a M altera el péptido no mutado de manera que contenga una secuencia que facilite la interacción mejorada con I del MHC humano. Esto está soportado por las dispares características de unión 50 de la clase I del MHC de los péptidos no mutados y de M57 (Figura 6A-C). Como se ha determinado por ensayos de unión de péptidos competitivos, SVN53-67/M57 se une a HLA-A*0201 aproximadamente 12 veces más fuertemente que SVN53-67 no mutada (Figura 6A-B). Además de utilizar un pentámero específico de survivina/ clase I del MHC, el péptido central SVN56-64/M57 se une a HLA-A*0201 aproximadamente 73 veces más fuertemente que SVN56-64 no mutada (Figura 6C). Conjuntamente, esto significa que la alteración de C>M conduce a afinidad potenciada del

mimético de péptido para la molécula de la clase I del MHC con respecto a la secuencia de survivina no mutada. Así, el cambio de C a M provoca una profunda mejora en la unión de la clase I del MHC con respecto a la secuencia no mutada. Cabría esperar que esta mejora produjera activación de CTL potenciada contra células cancerosas autólogas. Es, por consiguiente, digno de mención que, en comparación con el péptido no mutado, SVN53-67/M57 5 provoca un aumento de 3 a 5 veces en la destrucción mediada por CTL contra glioma humano coincidente con HLA alógeno (Figuras 9-10), glioma humano autólogo (Figuras 11-12) y células de linfoma humano autólogo (Figura 13), demostrando que los péptidos de la invención pueden provocar una respuesta inmunitaria mediada por células que está significativamente mejorada con respecto a la inducida por péptidos que tienen una secuencia no mutada. Además, los datos en la Figura 13 demuestran que los péptidos de la invención pueden provocar una respuesta 10 inmunitaria mediada por células contra células cancerosas humanas distintas de glioma. Así, se espera que los péptidos tengan amplia aplicabilidad contra todos los tipos de células cancerosas que expresan survivina.

Ejemplo 4

15 **[0051]** Este ejemplo demuestra la estimulación de linfocitos T *ex vivo* usando células dendríticas humanas autólogas cargadas de survivina expuestas a glioblastoma U87 humano o células de linfoma humano. Datos obtenidos de estas exposiciones se presentan en las Figuras 8-13.

20 **[0052]** Para producir los datos presentados en las Figuras 8-13, se realizaron ensayos de CTL para la lisis de linfocitos T específicos de células diana usando el procedimiento de citotoxicidad mediada por células Live/Dead usando citometría de flujo. Se cultivaron células de monocitos de sangre periférica (PBMC) derivada del paciente en CD *ex vivo* en presencia de GM-CSF e IL-4. Después de 5-6 días de diferenciación en CD inmaduras, se añadieron péptidos específicos junto con CD-40L para estimular y desarrollar CD maduras. Se añadieron PBMC autólogas adicionales después de la maduración y se dejó que se desarrollaran en CTL. Después de 10 días se eliminaron las 25 células y se mezclaron con células de glioma humano autólogas o alógenas en cultivo para evaluar la capacidad de destrucción de las células de CTL. Se añadieron CTL a las células de glioma diana en relaciones que oscilaban de 5:1 a 40:1 durante 2 horas a 37 °C. El análisis se basa en la regulación de células de glioma marcadas para eliminar el ruido de fondo de células efectoras. Se simuló la citotoxicidad máxima usando células diana tratadas con etanol. La citotoxicidad espontánea representa células diana incubadas en ausencia de células efectoras. Las 30 estimulaciones con péptido Flu y gp100 representan controles de estimulación adicionales. Los datos representan la media del porcentaje de lisis específica \pm E.E.M. de muestras por triplicado.

[0053] Los datos presentados en la Figura 13 se obtuvieron en esencialmente la misma forma que para las Figuras 9-12, con la excepción de que se analizó el efecto de CTL sobre células de linfoma del SNC autólogas (en 35 vez de sobre glioma autólogo o alógeno).

[0054] Los datos presentados en las Figuras 9-12 demuestran la eficacia de los péptidos de la invención en provocar una fuerte respuesta inmunitaria mediada por células contra gliomas alo-coincidentes o autólogos. Por tanto, se espera que los péptidos de la invención provoquen una respuesta similar cuando se administran a un 40 individuo. Y, lo que es más importante, también se generó una fuerte respuesta inmunitaria mediada por células contra células de linfoma del SNC autólogo (Figura 13), demostrando que los péptidos de la invención no se limitan a ser capaces de provocar una respuesta mediadas por células contra solo células de glioblastoma.

[0055] Así, basándose en los datos anteriores, se espera que los péptidos de la presente invención provoquen 45 una respuesta inmunitaria mediada por células eficaz contra cualquier tipo de célula cancerosa que exprese survivina en un individuo y, por consiguiente, inhiban el crecimiento de tales células cancerosas.

[0056] La invención se ha descrito mediante realizaciones específicas. Sin embargo, modificaciones rutinarias a las composiciones, procedimientos y dispositivos serán evidentes para aquellos expertos en la materia y tales 50 modificaciones pretenden estar cubiertas dentro del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

55 **[0057]**

<110> Fenstermaker, Robert A
Ciesielski, Michael J

<120> PÉPTIDOS DE SURVIVINA COMO VACUNAS CONTRA EL CÁNCER

<130> 003551.00331
 <150> 60/961.206
 <151> 19/07/2007

5

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.4

10

<210> 1
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> humano

15

<400> 1

```

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
 1           5           10           15

His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
 20           25           30

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
 35           40           45

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 50           55           60

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
 65           70           75

Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
 85           90           95

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
 100          105          110

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
 115          120          125

Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
 130          135          140
    
```

20

<210> 2
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> ratón

25

<400> 2

ES 2 529 193 T3

Met Gly Ala Pro Ala Leu Pro Gln Ile Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asn
 1 5 10 15

Tyr Arg Ile Ala Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Asp Cys Ala
 20 25 30

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
 35 40 45

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 50 55 60

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asn Pro Ile Glu Glu His Arg Lys His
 65 70 75 80

Ser Pro Gly Cys Ala Phe Leu Thr Val Lys Lys Gln Met Glu Glu Leu
 85 90 95

Thr Val Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Gln Arg Ala Lys Asn Lys
 100 105 110

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
 115 120 125

Lys Thr Thr Arg Gln Ser Ile Glu Gln Leu Ala Ala
 130 135 140

<210> 3
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> humano

<400> 3

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 1 5 10 15

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp
 20

<210> 4
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> aminoácidos 49-71 de survivina no mutada con cambio de C a M en la posición de aminoácido 57

<400> 4

ES 2 529 193 T3

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 1 5 10 15

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp
 20

<210> 5
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> cambio de C a M del epítopo central de la vacuna de survivina en el aminoácido 57 de survivina de longitud completa
 10
 <400> 5

Gln Met Phe Phe Cys Phe
 1 5

15 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> aminoácidos de survivina 53-67 con cambio de C a M en la posición 57
 <400> 6
 25

Asp Leu Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 7

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 8
 40 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 8

Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
 1 5

<210> 9
 <211> 8
 50 <212> PRT
 <213> humano
 <400> 9

ES 2 529 193 T3

Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp
1 5

5 <210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> humano

<400> 10

Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys
1 5

10 <210> 11
<211> 8
<212> PRT
15 <213> humano

<400> 11

Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
1 5

20 <210> 12
<211> 8
<212> PRT
25 <213> humano

<400> 12

Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val
1 5

30 <210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> cambio de S a L de SVN-L82

<400> 13

Leu Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val
1 5

40 <210> 14
<211> 7
<212> PRT
45 <213> humano

<400> 14

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys
1 5

50 <210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

ES 2 529 193 T3

<220>
 <223> cambio de C a M en la posición 57

<400> 15

5

Ala Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 1 5 10

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> cambio de C a M en la posición 57

15

<400> 16

Gln Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 1 5

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> SVN-57-64 con cambio de C a M en la posición 57

<400> 17

Met Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 1 5

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> humano

<400> 18

Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> humano

<400> 19

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

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> humano

<400> 20

ES 2 529 193 T3

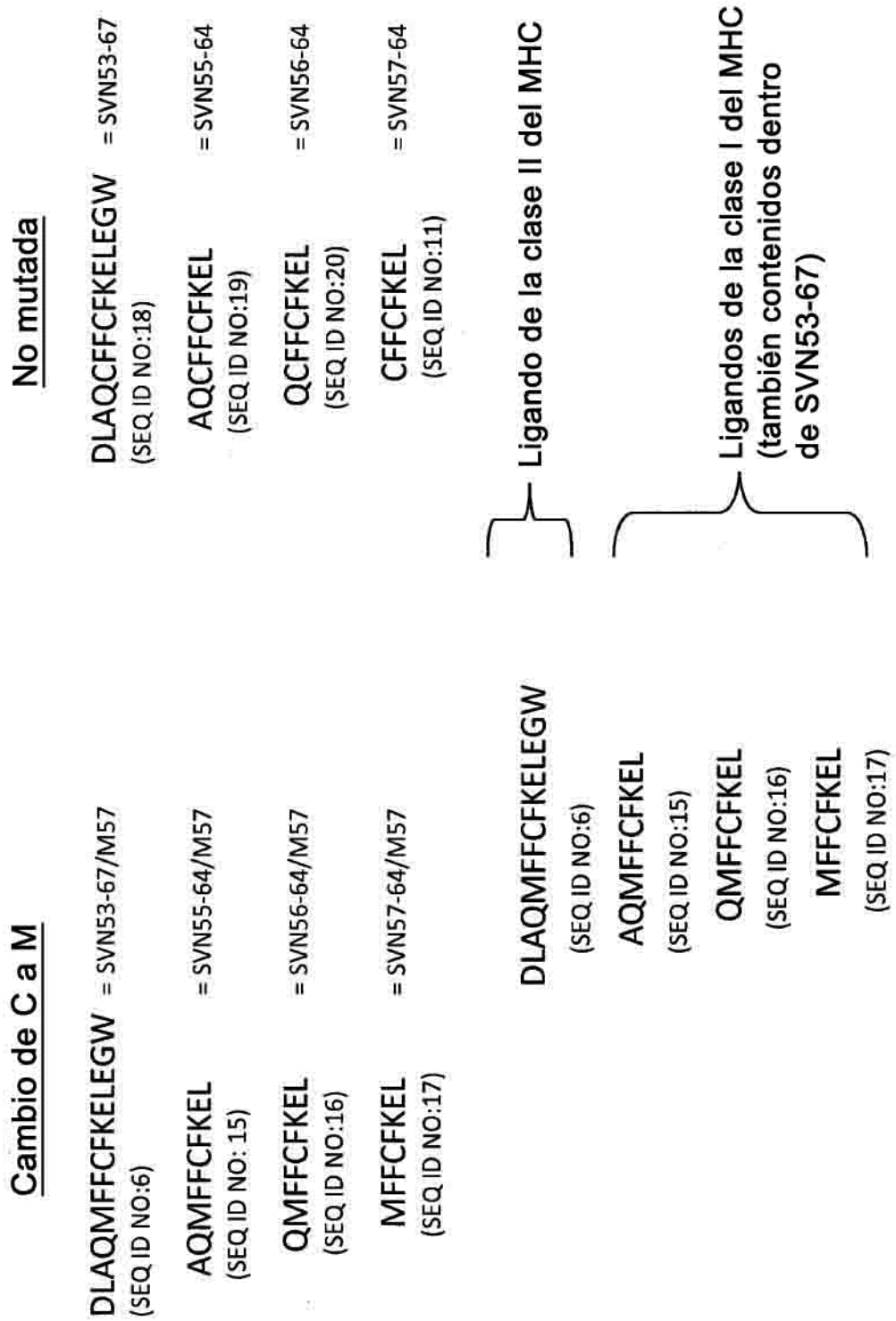
Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO:6 (DLAQMFFCFKELEGW).
5
2. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido está conjugado con un transportador de proteína inmunogénica.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende además células
10 dendríticas que se han incubado con el péptido.
4. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un adyuvante.
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1- 4, para su uso en un procedimiento de
15 inhibición del crecimiento de células cancerosas en un individuo diagnosticado con o que se sospecha que tiene cáncer, en la que las células cancerosas expresan survivina.
6. Una composición para su uso según la reivindicación 5, en la que el individuo se ha diagnosticado con
20 un glioma, o en la que el individuo se ha diagnosticado con linfoma.
7. Una composición para su uso según la reivindicación 5, en la que el péptido está conjugado con una proteína transportadora inmunogénica.
8. Una composición para su uso según la reivindicación 5, en la que el péptido en la composición está
25 presente en células dendríticas que han captado el péptido.
9. Una composición para su uso según la reivindicación 5, en la que las células cancerosas están presentes en un tumor, preferentemente en la que la composición se administra posterior a la resección del tumor.
- 30 10. Una composición para su uso según la reivindicación 5, en la que la administración de la composición estimula una respuesta inmunitaria mediada por células contra survivina en el individuo.
11. Una población sustancialmente purificada de células dendríticas de mamífero, en la que las células dendríticas se han incubado con un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1- 4, de forma que el péptido
35 es captado por las células dendríticas.

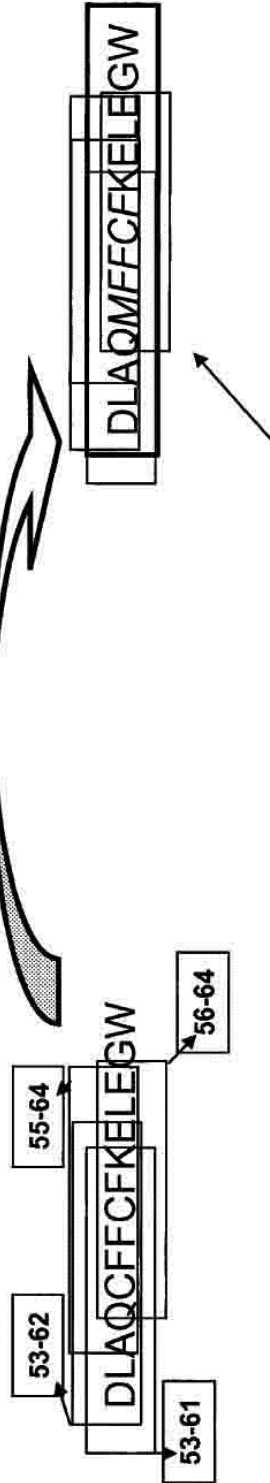
Figura 1.

AA49-ENE~~PD~~DLAQCFKKELEGWEPDD-AA71 (no mutada, SEQ ID NO:3)



Survivina-^{53-67/57M}

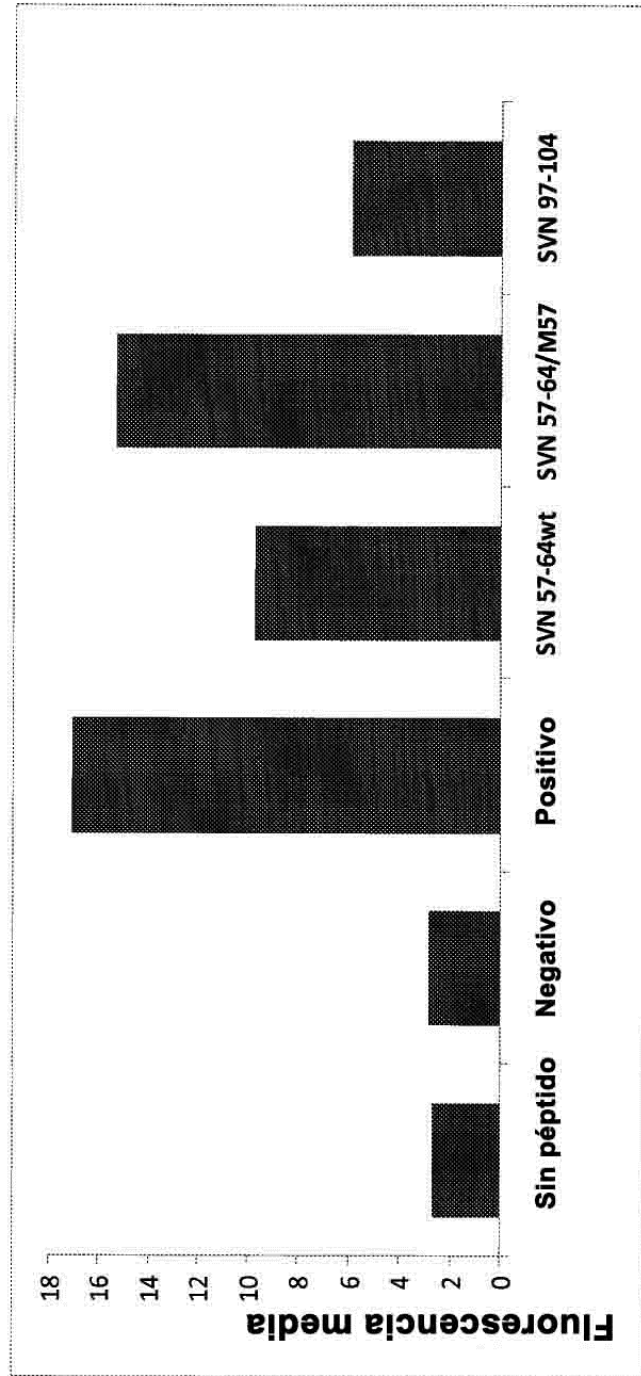
Epítopes de la clase I del MHC (HLA-A*0201)



(C>M en AA 57 aumenta la unión de I del MHC del 1,78 % al 131 % en ensayos de unión *in situ* del epítipo central de SVN56)

Figura 2.

Figura 3.



Ratón intracraneal

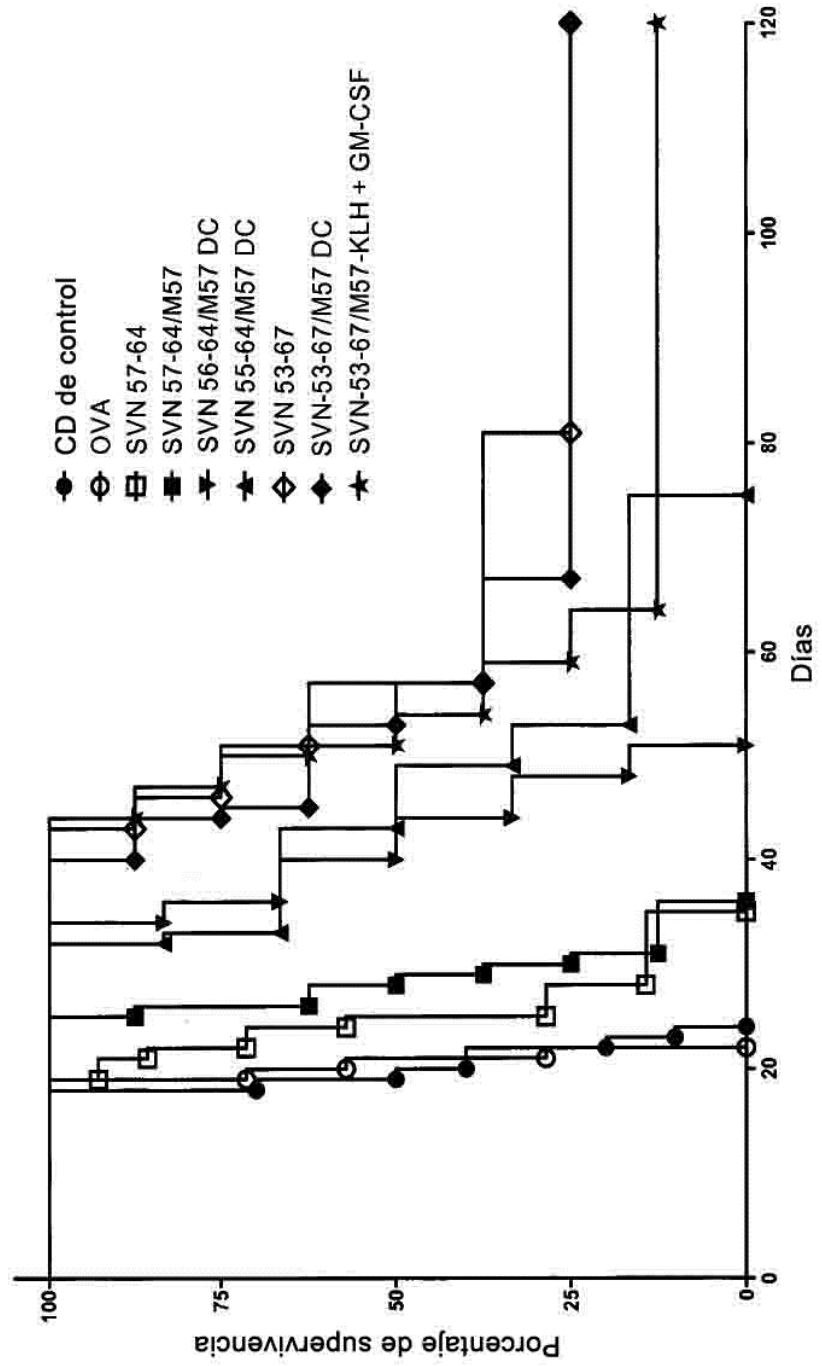


Figura 4.

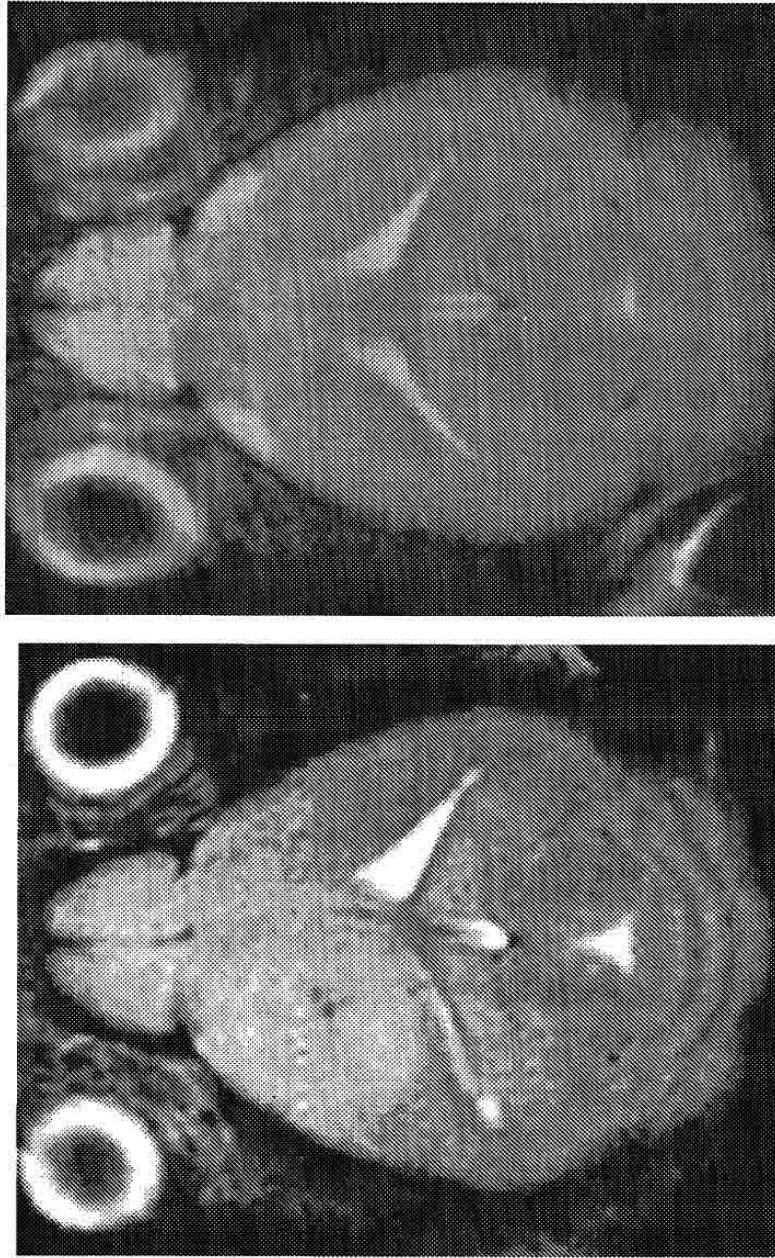
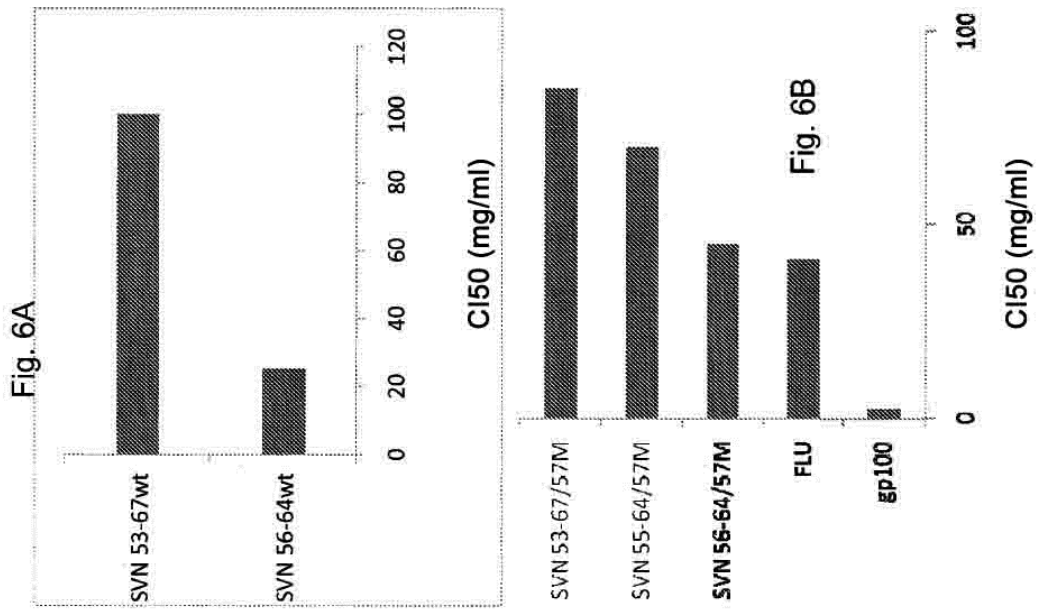


Figura 5.



Porcentaje de unión de I del MHC (A*0201)

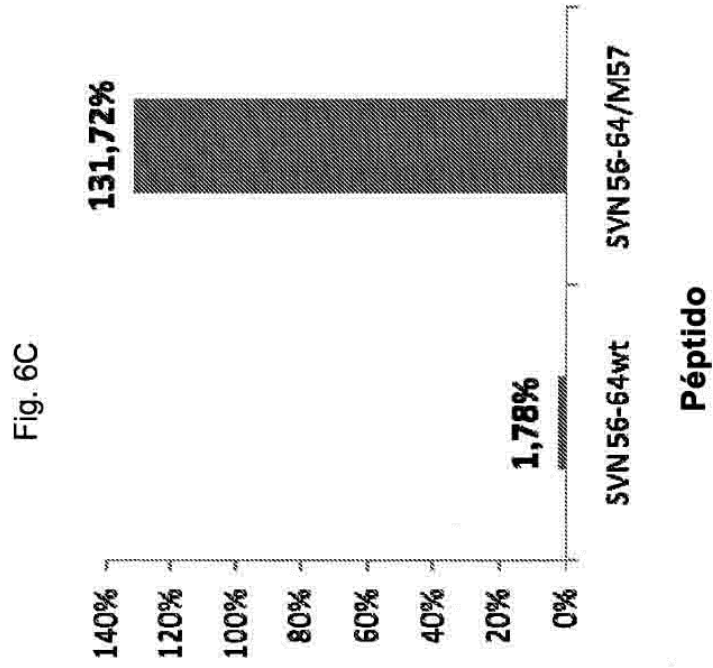


Figura 7.

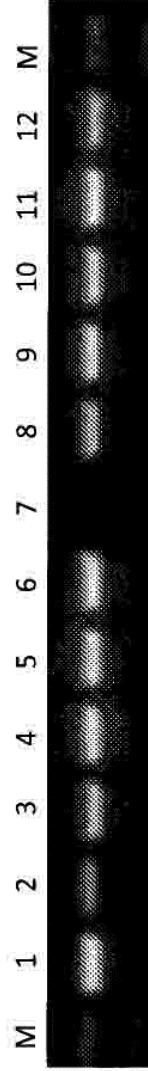


Figura 8

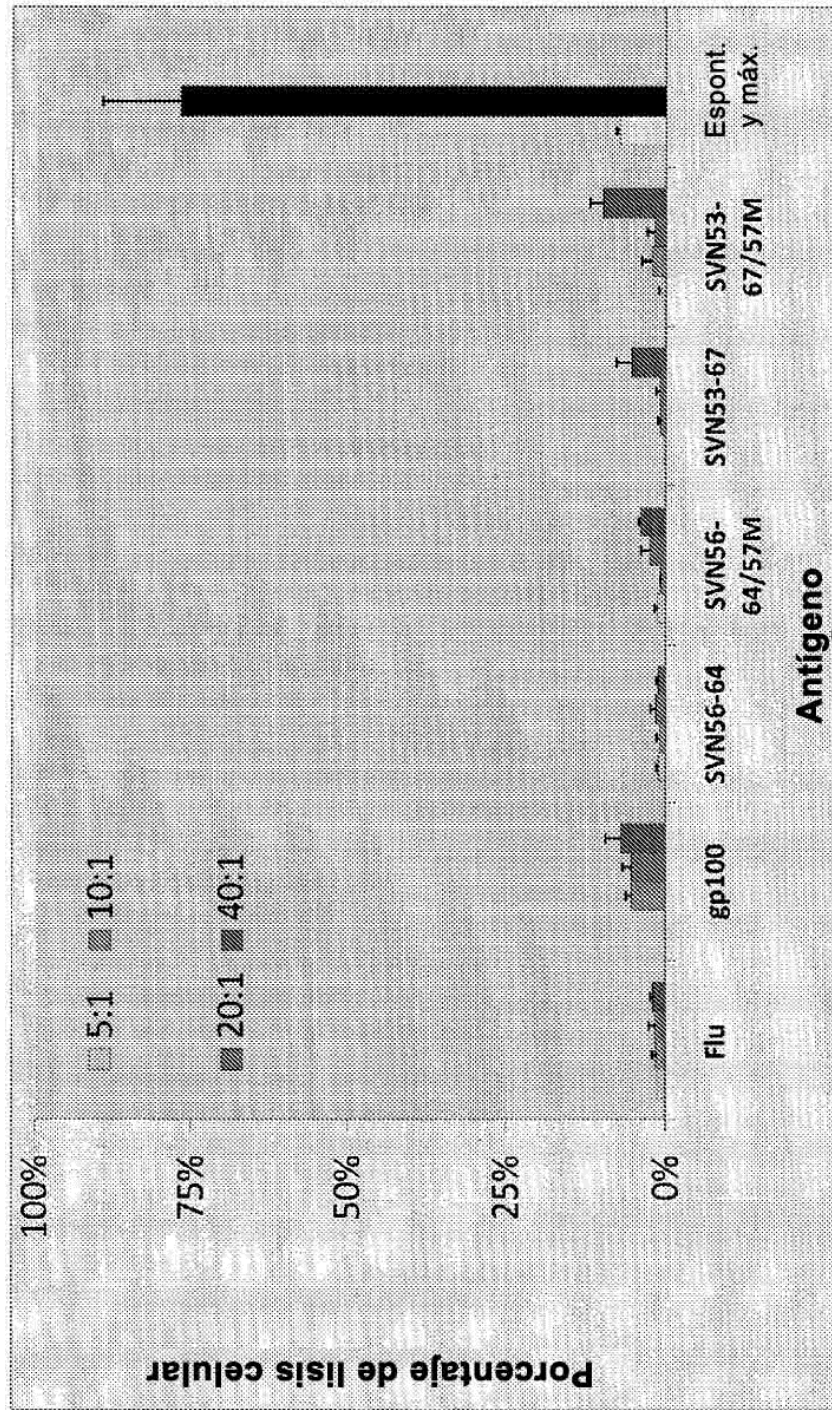


Figura 9

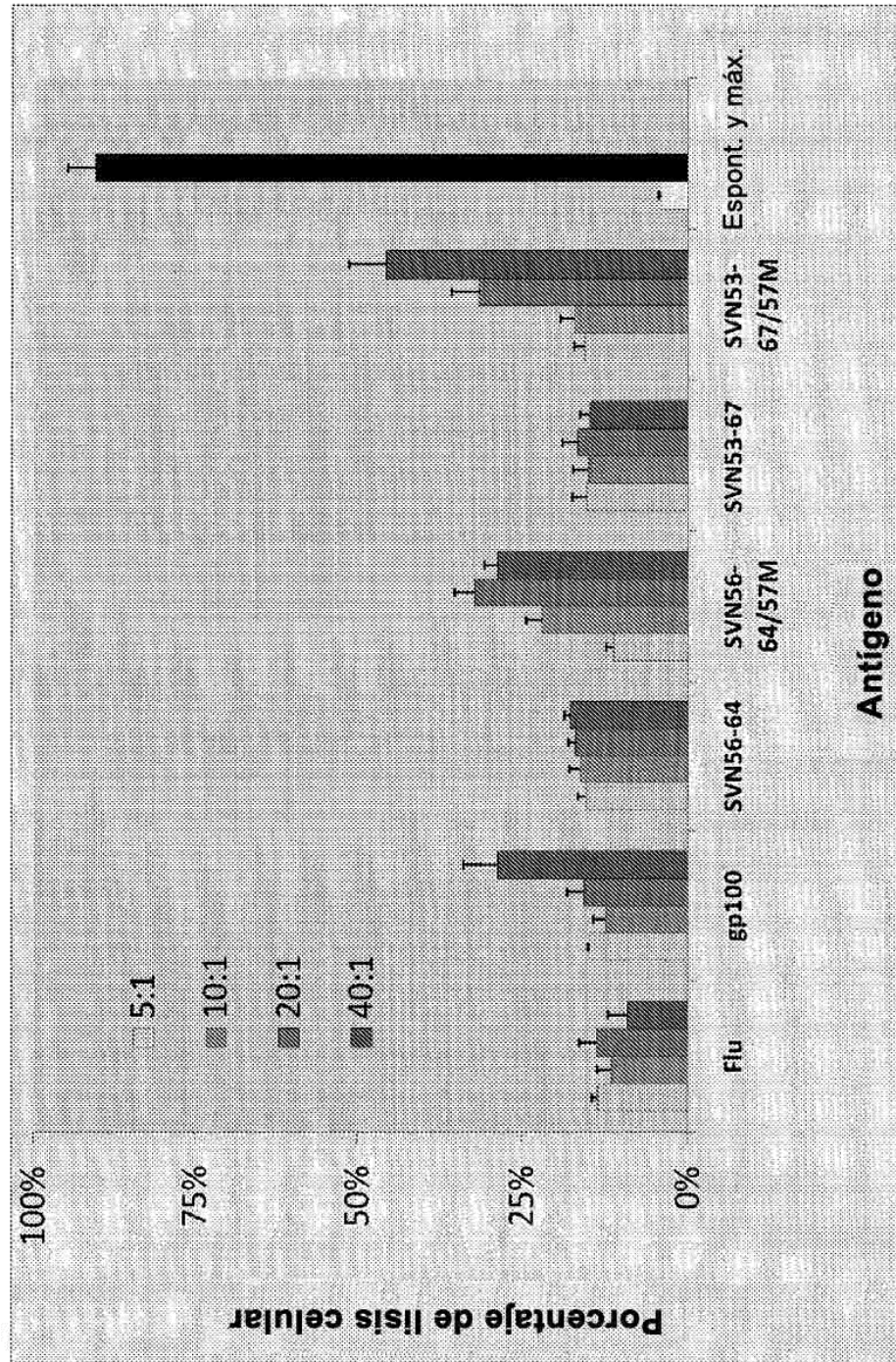


Figura 10

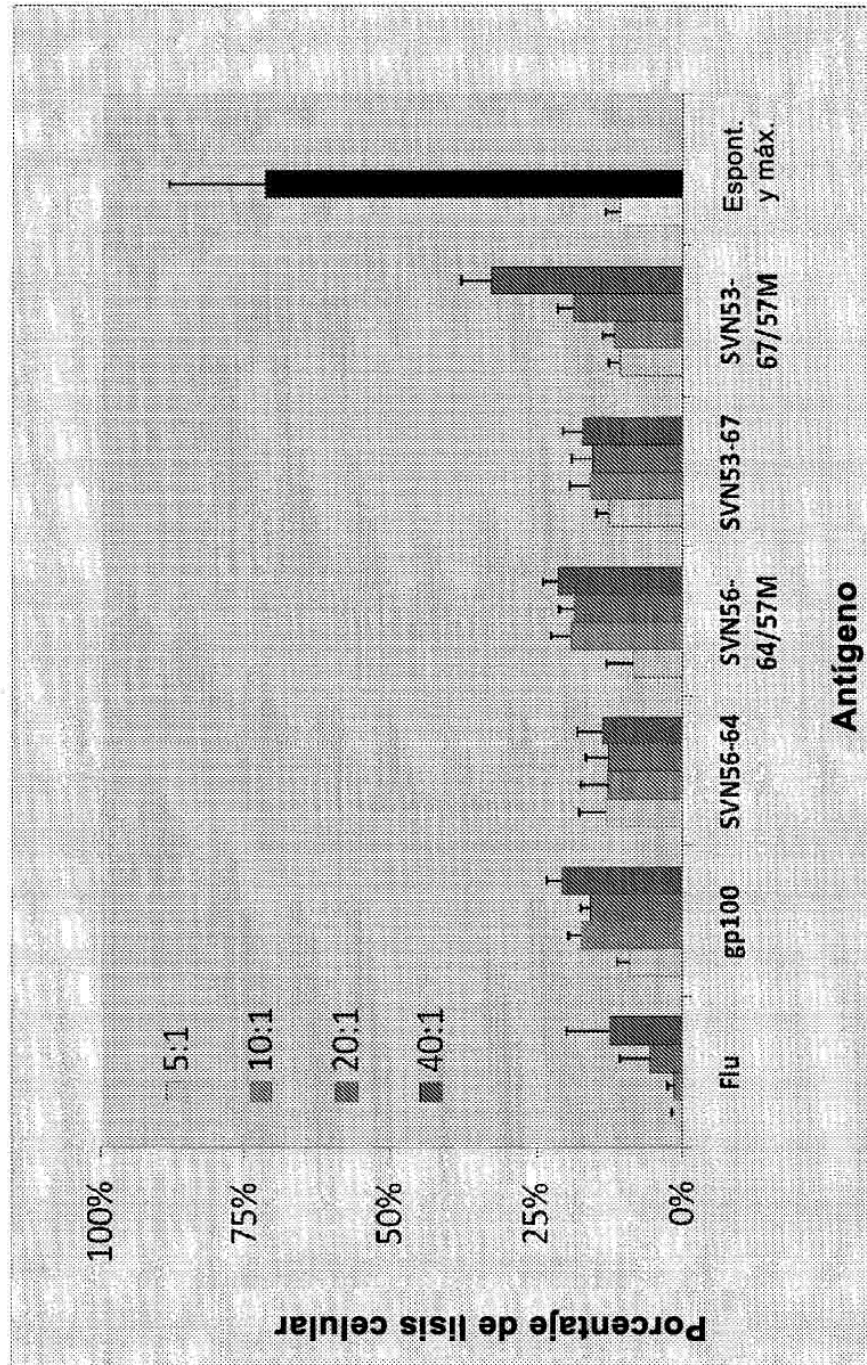


Figura 11

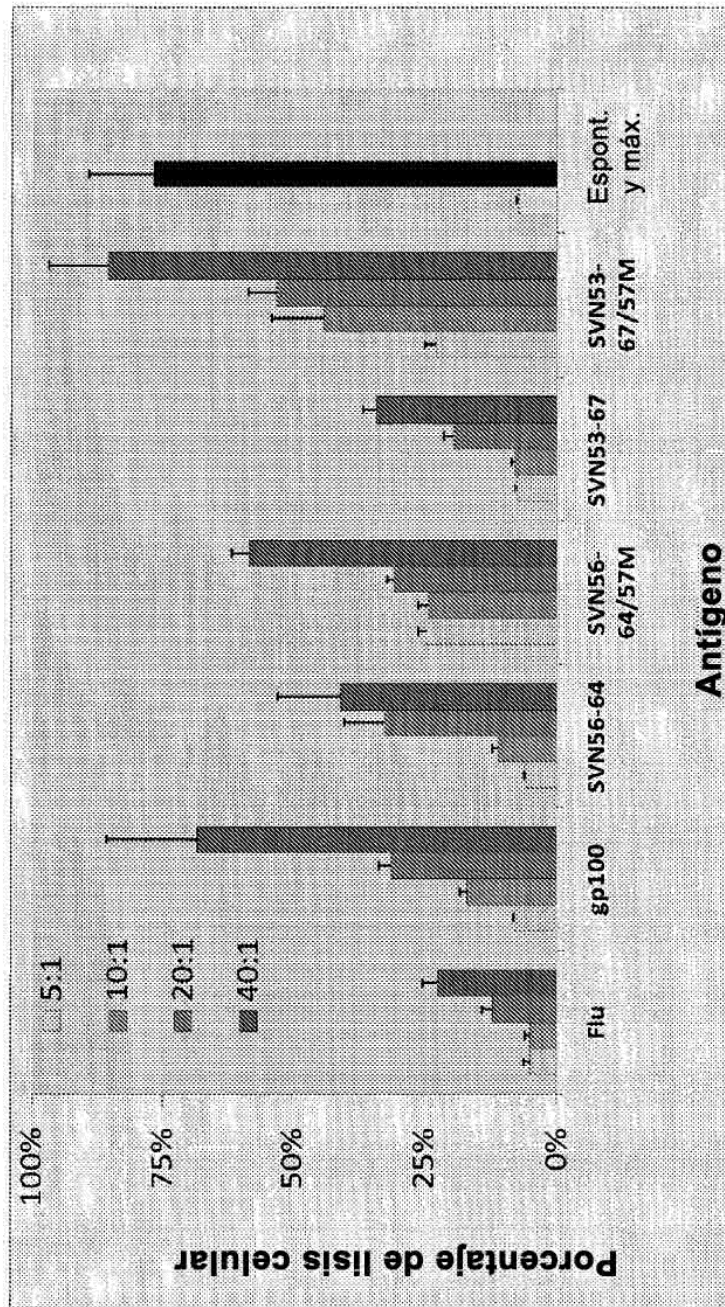


Figura 12

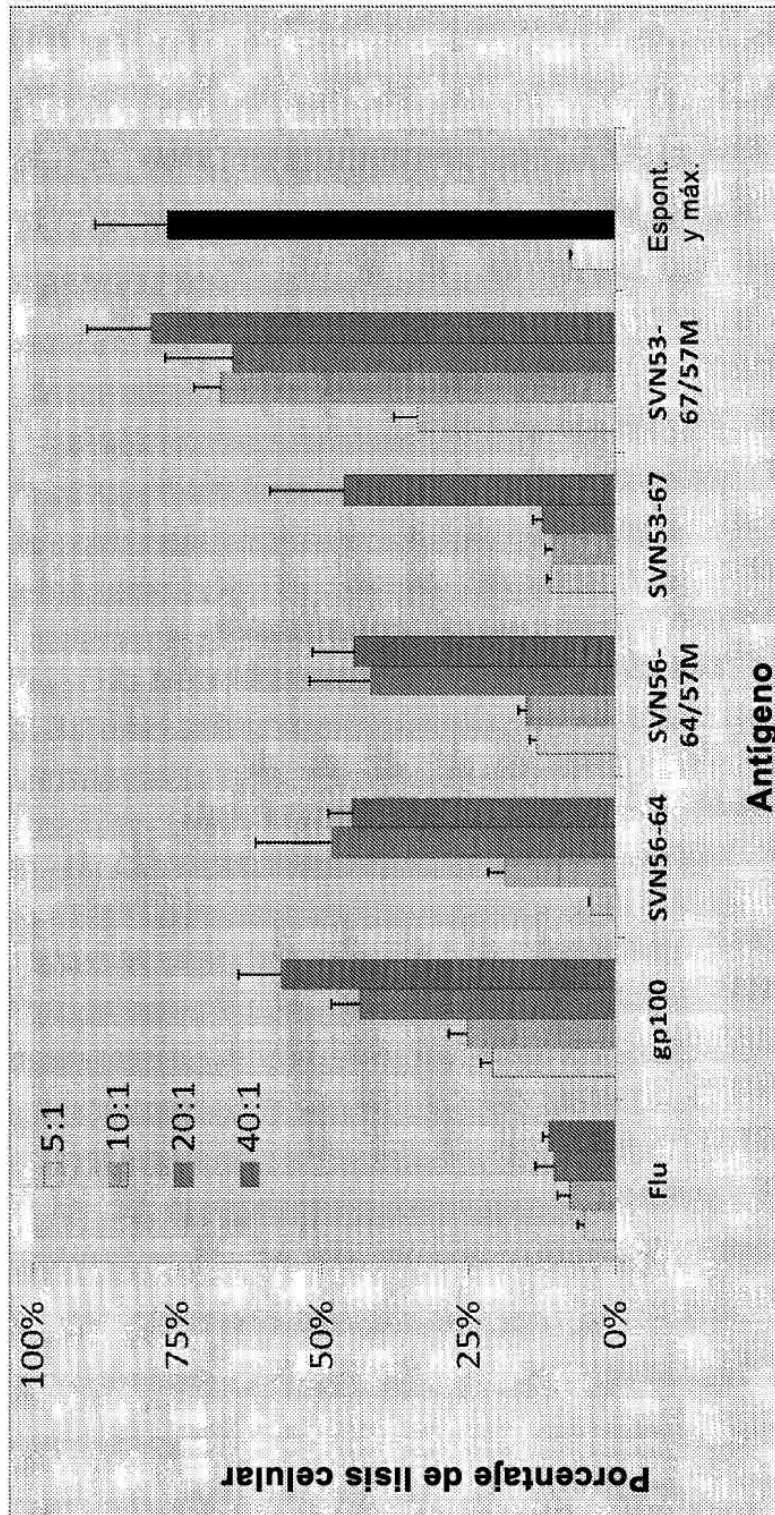


Figura 13

