

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 203**

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: **30.01.2004 E 10180878 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2359841**

54 Título: **Péptidos derivados de survivina y uso de los mismos**

30 Prioridad:

30.01.2003 US 354090
19.11.2003 US 715417

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2015

73 Titular/es:

SURVAC APS (100.0%)
Alhambravej 3
1826 Frederiksberg, DK

72 Inventor/es:

STRATEN, EIVIND PER THOR y
ANDERSEN, MADS HALD

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 529 203 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 derivados de survivina y uso de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un nuevo péptido derivado de survivina que tiene la secuencia RISTFKNWPK para su uso en medicina y en particular para su uso en el tratamiento del cáncer. En particular, el nuevo péptido es un epítipo de células T restringido a CMH de clase I que es capaz de provocar respuestas de células T citotóxicas en pacientes de cáncer, incluyendo respuestas *in situ* y *ex vivo*.

Antecedentes técnicos y técnica anterior

10 El proceso mediante el cual el sistema inmune de mamíferos reconoce y reacciona a los 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 denominados antígenos leucocitarios humanos (HLA), que constituyen el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) humano, y péptidos. Los péptidos derivan de moléculas más grandes, que son procesadas por las células, que también presentan la molécula de HLA/CMH. La interacción de las células T y complejos HLA/péptido está restringida, requiriendo una
15 célula T que sea específica para una combinación particular de una molécula de HLA y un péptido. Si no está presente una célula T específica, no hay respuesta de células T, incluso si está presente su complejo asociado. De una manera similar, no hay respuesta si el complejo específico está ausente, pero la célula T está presente.

20 El mecanismo mediante el cual las células T reconocen las anomalías celulares también se ha implicado en cáncer. Por ejemplo, en el documento WO 92/20356, se da a conocer una familia de genes que se procesan a péptidos, que a su vez se expresan en las superficies celulares, y pueden producir lisis de las células tumorales por CTL específicos. Estos genes se denominan la familia MAGE, y se dice que codifican para "precursores de antígeno de rechazo tumoral" o moléculas "TRAP", y los péptidos derivados de los mismos se denominan "antígenos de rechazo tumoral" o moléculas "TRA".

25 En el documento WO 94/05304, se dan a conocer nonapéptidos que se unen a la molécula de HLA-A1. La referencia da a conocer que dada la especificidad conocida de péptidos particulares para moléculas de HLA particulares, se debe esperar que un péptido particular se una a una molécula de HLA, pero no a otras. Esto es significativo, porque diferentes individuos poseen diferentes fenotipos de HLA. Como resultado, aunque la identificación de un péptido particular como que es un asociado para una molécula de HLA específica tiene ramificaciones diagnósticas y terapéuticas, estas solamente son pertinentes para los individuos con ese fenotipo de HLA particular.

30 Se han caracterizado varios péptidos presentados por las moléculas de CMH, y se ha encontrado que algunos de estos pueden llevar modificaciones postraduccionales que posiblemente tengan un impacto sobre la funcionalidad del complejo HLA-péptido. De esta manera, un número de estudios han asociado las alteraciones en el patrón de fosforilación con la transformación maligna. Además, se ha mostrado que la fosforilación podría tener un efecto neutro, negativo, o incluso positivo, sobre la unión del péptido al CMH de clase I, y que se podrían generar CTL
35 específicos de fosfopéptido, que discriminarían entre las versiones fosforilada y no fosforilada del péptido, mostrando que tales CTL lo más probablemente sean parte del repertorio de CTL restringidos a CMH de clase I. Recientemente, se ha mostrado que los péptidos fosforilados realmente son procesados de una forma natural y presentados por las moléculas de CMH de clase I *in vivo*. Adicionalmente, se ha establecido la presencia de péptidos fosforilados en extractos de moléculas de clase I aisladas de varias células B transformadas por diferentes EBV.

40 De esta manera, está bien establecido que los epítipos peptídicos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) pueden ser reconocidos como antígenos por los linfocitos T citotóxicos (CTL) en el contexto de las moléculas de CMH (1). Sin embargo, aunque en general se acepta que la mayoría de, si no todos, los tumores son antigénicos, solamente unos cuantos son en realidad inmunogénicos en el sentido de que la evolución del tumor la controla fácilmente el sistema inmune.

45 Para superar esta limitación, se han iniciado varios ensayos inmunoterapéuticos, por ejemplo vacunaciones con péptidos derivados de TAA. Para melanoma, el tumor para el que se ha caracterizado el mayor número de TAA definidos por CTL, se han inducido poderosas respuestas de CTL contra los antígenos mediante vacunación y algunos pacientes experimentaron una remisión completa de su enfermedad (2,3). Sin embargo, la mayoría de los epítipos peptídicos utilizados en estos ensayos de vacunación son específicos del melanocito, y estos péptidos no
50 se pueden aplicar para tumores de origen no melanocítico. Además, la expresión de estos TAA es heterogénea entre tumores de diferentes pacientes, e incluso puede variar entre las metástasis obtenidas de un paciente. Sin embargo, durante el último par de años, se han identificado un número de antígenos peptídicos específicos de tumores, que se expresan en un número de cánceres diferentes, es decir, HER-2 (4), Muc-1 (5) y telomerasa (6).

55 También se ha mostrado que mediante la manipulación apropiada los antígenos tumorales presentes en los tumores se pueden exponer al sistema inmune. Hay estudios que han mostrado que el brazo CTL CD8+ de la respuesta inmune, solo o en combinación con células T_h CD4+, constituye el brazo efector anti-tumoral primario de la respuesta inmune adaptativa. Hasta ahora, el enfoque ha estado principalmente sobre el brazo CTL de la respuesta inmune.

Sin embargo, cada vez está más claro que la respuesta de células T CD4 desempeña un papel esencial en el rechazo del tumor, en especial en la fase de inducción o en la extensión de una respuesta de CTL *in vivo*. Por consiguiente, la incorporación de antígenos tumorales restringidos a la clase II en protocolos de vacunación de tumores eficaces, podría aumentar la eficacia de las vacunas.

5 La apoptosis es un programa genético de suicidio celular, y se ha sugerido que la inhibición de la apoptosis es un mecanismo importante involucrado en la formación de cáncer mediante la extensión del lapso de vida de las células, que favorece la acumulación de mutaciones transformantes (7). La survivina es un miembro recientemente identificado de la familia de inhibidores de las proteínas de apoptosis (IAP). En un análisis de expresión genética global de aproximadamente 4 millones de transcritos, se identificó la survivina como uno de los genes principales invariablemente aumentados en muchos tipos de cáncer, pero no en tejido normal (8). Los tumores malignos sólidos que sobreexpresan survivina incluyen cáncer de pulmón, colon, mama, páncreas y próstata, así como tumores malignos hematopoyéticos (9). Adicionalmente, se han descrito series de melanomas y cánceres de piel no melanoma como invariablemente positivos para survivina (10, 11). La sobreexpresión de survivina en la mayoría de los cánceres humanos sugiere un papel general de inhibición de la apoptosis en la evolución del tumor, una noción sustanciada por la observación de que en el caso del cáncer colorrectal y de vejiga, así como en neuroblastoma, la expresión de survivina estaba asociada con un pronóstico desfavorable. Por el contrario, la survivina es indetectable en tejidos adultos normales. Estas características califican a la survivina como un TAA adecuado tanto para fines diagnósticos como terapéuticos.

Por consiguiente, durante la última década se han identificado un gran número de TAA que son reconocidos por los CTL de una forma restringida al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Debido a que la survivina se sobreexpresa en la mayoría de los cánceres humanos y la inhibición de su función produce un aumento de la apoptosis, esta proteína puede servir como una diana para las respuestas terapéuticas de CTL. La proteína survivina y el potencial uso diagnóstico y terapéutico de la misma se dan a conocer en (8) y en el documento US 6.245.523. La survivina es una proteína citoplásmica de 16,5 kDa que contiene un único BIR y una región carboxi-terminal enrollada altamente cargada en lugar de un dedo RING, que inhibe la apoptosis inducida por la retirada de factor de crecimiento (IL-3) cuando se transfiere a precursores de células B. El gen que codifica la survivina es casi idéntico a la secuencia del receptor de proteasa de células efectoras-1 (EPR-1), pero está orientado en la dirección opuesta, lo que sugiere de esta manera la existencia de dos genes separados duplicados en una configuración cabeza con cabeza. Según esto, la survivina se puede describir como un producto anti-sentido de EPR-1. Funcionalmente, la inhibición de la expresión de survivina mediante el aumento de su transcrito anti-sentido natural EPR-1, produce apoptosis masiva y crecimiento celular reducido.

El documento US 6.245.523 da a conocer el aislamiento de la survivina purificada y proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican la proteína survivina, y anticuerpos y otras moléculas que se unen a survivina. El documento US 6.245.523 también da a conocer fragmentos anti-apoptóticamente activos de la proteína survivina y variantes de los mismos en donde se ha insertado un residuo de aminoácido N- o C-terminal a, o dentro de, la secuencia de survivina divulgada. Se da a conocer específicamente que tales péptidos deben contener residuos funcionales claves para la apoptosis, es decir, Trp en la posición 67, Pro en la posición 73 y Cys en la posición 84.

Andersen et al. CANCER RESEARCH, Vol. 61, no. 3 (2001) 869-872 divulgan péptidos de survivina específicos de HLA-A2: Sur1-Sur10, Sur1L2 y Sur1M2. Andersen et al. también divulgan respuestas de CTL específicas contra dichos péptidos, valores de afinidad para la unión de dichos péptidos a moléculas de HLA de clase I y sugiere el uso de los péptidos en vacunación, terapia contra el cáncer y diagnóstico de cáncer.

Andersen et al. CANCER RESEARCH, Vol. 61, no. 16 (2001) 5964-68 divulgan péptidos de survivina que se unen a HLA: Sur1 (LTLGEFLKL), Sur9 (ELTLGEFLKL) y Sur1M2 y la generación de respuestas de CTL por dichos péptidos. El documento también divulga complejos CMH de clase I/péptidos que se multimerizaron, y su uso en la detección de células reactivas a survivina en tejido tumoral. Andersen y col. sugieren usos de tales péptidos de survivina para vacunas anticáncer basadas en péptidos en combinación con terapia convencional contra el cáncer.

Schmitz et al. CANCER RESEARCH, Vol. 60, no. 17 (2000) 4845-49 divulga el péptido de unión a HLA ELTLGEFLKL. El artículo demuestra la generación de respuestas de CTL por dicho péptido y sugiere el uso del péptido en vacunas anticáncer.

50 Hirohashi et al. CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, Vol. 8, no. 6 (2002) 1731-39 divulga un epítipo CTL restringido a HLA-A24 de survivina-2B (variante de ajuste encontrada en tumores). El artículo también divulga otros péptidos de survivina, por ejemplo, AFLSVKQF y QFEELTGEF.

Fortugno et al. JOURNAL OF CELL SCIENCE, Vol. 115, no. 3 (2002) 575-85 divulga anticuerpos policlonales contra epítipos de survivina Ala3-Ile19, Met38-Thr48, Pro47-Phe58 y Cys57-Trp67.

El documento WO 2005/049073 proporciona proteínas reguladoras de apoptosis aisladas o fragmentos peptídicos de las mismas que son capaces de provocar respuestas inmunes anticancerosas. Proporciona el uso de tales proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2 y fragmentos peptídicos inmunogenéticos de las mismas en el tratamiento, diagnóstico y pronóstico de cáncer.

5 El documento US 6 245 523 divulga survivina como una proteína que inhibe la apoptosis celular, y su modulación. Se divulgan péptidos derivados de survivina; en particular SEQ ID NO: 3 es un péptido que tiene 17 aminoácidos correspondientes a los residuos 3-19 de survivina, que tiene la secuencia APTLPPAWQPFLKRDHRI. Este péptido comprende el péptido mostrado en SEQ ID NO: 18 de la presente solicitud. Se preparó un antisuero policlonal de conejo designado JC700 contra los residuos APTLPPAWQPFLKRDHRI. Sin embargo, el documento US 6 245 523 no divulga péptidos más cortos, tales como nonapéptidos, que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 18 de la presente solicitud. Además no hay referencia en el documento US 6 245 523 a epítomos de unión a HLA o CMH, células T citotóxicas que reconozcan tales epítomos o usos en cáncer.

10 El documento WO/102023 proporciona proteínas asociadas a tumor capaces de unirse al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I, una composición que comprende los péptidos y el uso de estos péptidos para producir un medicamento y para tratar enfermedades tumorosas.

Schmitz et al., BLOOD, Vol. 102 no. 2 (2003) 571-576 demuestra que los epítomos de survivina están presentes en una amplia variedad de tumores malignos y se pueden usar en terapias de vacunación.

15 El documento US 6 346 389 proporciona procedimientos y composiciones para su uso en la identificación de agentes que modulan la interacción entre survivina y tubulina polimerizada o los husos mitóticos. También se proporcionan procedimientos y composiciones que se pueden usar para modular las interacciones entre survivina y tubulina polimerizada o los husos mitóticos, modulando así la apoptosis regulada por survivina.

20 Base de datos del EMBL, 30 mayo de 2000, XP002392545, no. de acceso O70201 de la base de datos del EBI, Conway et al., BLOOD, Vol. 95, no. 4 (2000) 1435-1442, y Muchmore et al., Molecular Cell, Cell Press Cambridge, MA US, Vol. 6, no. 1 (2000) 173-182 proporcionan distintas isoformas de survivina expresadas de modo diferente con distintas propiedades anti-apoptóticas

Reker et al., Cáncer Biology and Therapy, Vol. 3, no. 2 (2004) 180-183 caracteriza nuevos epítomos de survivina restringidos a HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3 y HLA-A11 sobre la base de respuestas espontáneas de CTL en pacientes de cáncer.

25 Reker et al., Journal of Immunotherapy, Vol. 72, no. 6 (2004) S29-S30 analiza el uso de inhibidores de apoptosis (IAP) como dianas para respuestas de células T espontáneas en pacientes de cáncer.

Ninguno de los documentos de la técnica anterior divulga el epítomo restringido a CMH de clase I que tiene la secuencia RISTFKNWPK, o el uso de dicho péptido en medicina.

30 La presente invención se basa en el descubrimiento de que se pueden derivar péptidos restringidos a CMH de clase I de la proteína survivina, que son capaces de unirse a las moléculas de HLA de CMH de clase I y de esta manera provocar respuestas inmunes de CTL tanto *ex vivo* como *in situ* en los pacientes que padecen una amplia variedad de enfermedades cancerosas. Estos hallazgos sugieren fuertemente que la survivina actúa como una molécula TRAP, que es procesada por las células a péptidos que tienen funcionalidad TRA. Evidentemente, estos hallazgos abren el camino para planteamientos terapéuticos y diagnósticos nuevos que, debido al hecho de que la survivina parece estar expresada universalmente por las células tumorales, en general son aplicables en el control de enfermedades cancerosas.

Sumario de la invención

40 Según esto, la invención se refiere a un péptido epítomo restringido a CMH de clase I derivado de survivina, teniendo dicho epítomo la secuencia RISTFKNWPK como se especifica en SEQ ID NO: 58 y al menos una de las siguientes características:

(i) es capaz de unirse a HLA-A3 de clase I con una afinidad medida por la cantidad del péptido que es capaz de tener una recuperación semi-máxima de la molécula de HLA de clase I (valor C_{50}) que es como máximo de 50 μ M, como se determina mediante un ensayo de unión de ensamblaje como se describe en el presente documento,

45 (ii) es capaz de inducir células productoras de IFN- γ en una población de linfocitos de sangre periférica (PBL) de un paciente de cáncer a una frecuencia de al menos 1 por 10^4 PBL como se determina mediante un ensayo ELISPOT, y/o

(iii) es capaz de la detección *in situ* en un tejido tumoral de CTL que son reactivos con el péptido epítomo.

para su uso en medicina.

Descripción detallada de la invención

50 El nuevo péptido restringido a CMH de clase I de la invención es un péptido que tiene la secuencia RISTFKNWPK y está caracterizado por tener al menos una de varias características, una de las cuales es la capacidad para unirse a la molécula de HLA de clase I a la cual está restringido con una afinidad, que cuando se mide por la cantidad de péptido que es capaz de una recuperación semi-máxima de la molécula de HLA de clase I (valor C_{50}) en un ensayo

de estabilización de HLA como se describe en el presente documento, es como máximo de 50 μM . Este ensayo de estabilización de HLA se lleva a cabo como se ha descrito previamente (12, 13), y se basa en la estabilización de la molécula de HLA después de cargar el péptido en la línea celular deficiente en transportador de péptidos T2. Posteriormente, se inmunoprecipitan las cadenas pesadas de HLA estables correctamente plegadas utilizando anticuerpos dependientes de la conformación, y se cuantifica la unión del péptido.

Este ensayo proporciona un medio sencillo para cribar péptidos candidatos por su capacidad para unirse a una molécula determinada de un alelo de HLA con la afinidad anterior. En formas de realización preferidas, el péptido de la invención es uno que tiene un valor C_{50} , que es como máximo de 30 μM , tal como un valor C_{50} , que es como máximo de 20 μM .

Como se mencionó anteriormente, el sistema de HLA representa el sistema mayor de histocompatibilidad (CMH) humano. En general, los sistemas de CMH controlan una gama de características: antígenos de trasplante, respuestas inmunes dependientes del timo, ciertos factores del complemento y predisposición para ciertas enfermedades. Más específicamente, el CMH codifica 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 se denominan moléculas de HLA-A, HLA-B y HLA-C que se presentan en la superficie de la mayoría de las células nucleadas y de los trombocitos.

Los péptidos de la invención derivan de la secuencia conocida de survivina, por ejemplo, la secuencia divulgada en el documento US 6.245.523.

De esta manera, un planteamiento sencillo para identificar los péptidos de la invención incluye los siguientes pasos: seleccionar una molécula de HLA particular, por ejemplo una que se da con un alto índice en una población determinada, llevar a cabo un análisis de alineamiento como se describe anteriormente para identificar los "motivos de residuos de anclaje" en la proteína survivina, aislar o construir péptidos de un tamaño adecuado que comprendan uno o más de los residuos de anclaje identificados, y probar los péptidos resultantes para determinar (i) su capacidad para unirse a la molécula de HLA particular utilizando el ensayo de estabilización de HLA descrito en el presente documento, (ii) la capacidad de los péptidos para inducir células productoras de IFN- γ en una población de PBL de un paciente de cáncer a una frecuencia de al menos 1 por 10^4 PBL determinado mediante un ensayo ELISPOT como se describe en el presente documento, y/o (iii) la capacidad de los péptidos para detectar *in situ* en un tejido tumoral los CTL que reaccionan con los péptidos epítomos que se están probando.

El péptido de la invención, como se mencionó anteriormente, deriva de una proteína survivina o de un fragmento de la misma. La proteína survivina de la que puede derivar el péptido, es la proteína survivina de cualquier especie animal en la se expresa la proteína. En formas de realización preferidas, la proteína de partida survivina 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 survivina seleccionada, el péptido de la invención se deriva mediante cualquier tratamiento químico o enzimático apropiado del material de partida de survivina que produzca un péptido de un tamaño adecuado como se indica anteriormente, o se puede sintetizar mediante cualquier procedimiento convencional de síntesis de péptidos con los que esté familiarizado el experto en la materia.

Una característica significativa del péptido de la invención es su capacidad para reconocer o inducir células T respondedoras productoras de IFN- γ , es decir, células T citotóxicas (CTL) que reconocen de una manera específica el péptido particular en una población de PBL o células tumorales de un paciente de cáncer (células diana). Esta actividad se determina fácilmente sometiendo los PBL o células tumorales de un paciente a un ensayo ELISPOT como se describe en la referencia (16) y en los ejemplos siguientes. Antes del ensayo, puede ser conveniente estimular la población de PBL o las células tumorales que se vayan a ensayar poniendo en contacto las células con el péptido que se va a probar. Preferiblemente, el péptido es capaz de inducir o reconocer células T productoras de IFN- γ a una frecuencia de al menos 1 por 10^4 PBL como se determina mediante un ensayo ELISPOT como se utiliza en el presente documento. Más preferiblemente la frecuencia es de al menos 1 por 10^3 PBL.

El ensayo ELISPOT representa una herramienta consistente para seguir las respuestas de células T específicas del péptido de survivina. Sin embargo, aunque se ha demostrado que la reactividad de ELISPOT en la mayoría de los casos se correlaciona con la capacidad de los CLL para lisar células diana, la evidencia conclusiva para esta noción solamente se puede dar de una manera directa. Tal evidencia directa se proporciona en el presente documento, ya que se demostró (véase el ejemplo 2) que las células que reaccionan con survivina aisladas por medio de complejos HLA/péptido poseen la capacidad funcional para lisar células diana. Además, se demostró que los CTL aislados que reconocen específicamente un péptido de la invención, eran capaces de lisar las células tumorales con HLA coincidente de diferente origen, por ejemplo melanomas y cáncer de mama. Este descubrimiento sugiere fuertemente que las células cancerosas en general procesan y presentan el mismo péptido de survivina endógeno. Por consiguiente, una implicación principal de los descubrimientos del presente documento es que los péptidos de la invención se expresan y forman complejos con las moléculas de HLA en una variedad de células cancerosas de diferentes orígenes histológicos. Esto hace que estas células de cáncer sean susceptibles a la destrucción por los CTL y enfatiza la utilidad potencial de la inmunización con survivina para controlar el crecimiento de diferentes neoplasias. La presencia de respuestas espontáneas de CTL en PBL y células tumorales a epítomos peptídicos derivados de survivina restringidos a HLA de los pacientes que padecen tres tipos de cáncer no relacionados, es

decir, cáncer de mama, melanoma y LLC, sustancia además el potencial inmunoterapéutico universal de este antígeno tumoral.

Según esto, en otra forma de realización preferida el péptido de la invención es capaz de inducir células productoras de IFN- γ en una población de PBL de un paciente que tiene una enfermedad cancerosa donde se expresa la survivina incluyendo un tumor maligno hematopoyético, incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mieloide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas, y cáncer de próstata. De una manera específica, el péptido de la invención es capaz de provocar una respuesta inmune en forma de células T que tienen un efecto citotóxico contra las células que expresan survivina de una línea celular de cáncer, incluyendo una línea celular seleccionada de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y la línea celular de melanoma FM3.

Además de la capacidad para provocar respuestas inmunes en poblaciones de PBL y en líneas celulares de cáncer, se demostró que los péptidos de la invención también son capaces de provocar respuestas inmunes citolíticas *in situ*, es decir, en tejidos tumorales sólidos. Esto se demostró al suministrar complejos HLA-péptido, por ejemplo, que se multimerizan y que están provistos de un marcador detectable, y utilizando estos complejos para tinciones inmunohistoquímicas para detectar en un tejido tumoral CTL que reaccionan con el péptido epítipo de la invención. Según esto, una característica significativa adicional del péptido de la invención es que es capaz de detectar *in situ* en un tejido tumoral los CTL que son reactivos con el péptido epítipo.

Se contempla que los péptidos de la invención, además de su capacidad para unirse a moléculas de HLA que produce la presentación de complejos de HLA y péptidos en las superficies celulares, complejos que a su vez actúan como epítopos o dianas para células T citolíticas, pueden provocar otros tipos de respuestas inmunes, tales como respuestas de células B que den como resultado la producción de anticuerpos contra los complejos y/o una reacción de hipersensibilidad de tipo retrasado (DTH). El último tipo de respuesta inmune se define como un enrojecimiento y endurecimiento palpable en el sitio de la inyección del péptido de la invención.

Se sabe bien que las diferentes moléculas de HLA son de una prevalencia diferente en las poblaciones humanas principales. Según esto, existe un requerimiento para identificar los epítopos peptídicos restringidos a varias moléculas de HLA de clase I para extender la cohorte de pacientes que se puedan tratar según los métodos de la presente invención. La caracterización de múltiples epítopos de survivina con diferentes elementos de restricción de HLA amplía el potencial clínico de este antígeno diana de dos maneras importantes: (i) aumenta el número de pacientes elegibles para inmunoterapia basada en los péptidos derivados de survivina. El antígeno HLA-A2 se expresa en alrededor del 50 % de las poblaciones blanca y asiática, los antígenos HLA-A1 y HLA-A3 se expresan ambos en alrededor del 25 % de blancos y el 5 % de asiáticos, mientras que el antígeno HLA-A11 se expresa en alrededor del 15 % de blancos y el 30 % de asiáticos. Aún cuando estos números no se puedan sumar debido a la coexpresión, una combinación de péptidos restringidos por una multiplicidad de estos ciertamente abarcaría a la mayoría de los pacientes de cáncer, (ii) el direccionamiento colectivo de varios elementos de restricción en cada paciente probablemente reduzca el riesgo del escape inmune por la pérdida del alelo de HLA. La pérdida de un solo alelo de HLA es un componente significativo de las alteraciones del CMH descritas para las células cancerosas, mientras que la pérdida total de la expresión de la clase I es un suceso bastante infrecuente. Por consiguiente, con la identificación de los epítopos de survivina restringidos a diferentes alelos de HLA, ahora es posible atacar más de una molécula de HLA simultáneamente en pacientes con solapamiento alélico.

Según esto, basado en la divulgación de la presente invención, el experto en la materia sería capaz de desarrollar vacunas multiepítipo muy inmunogénicas. Preferiblemente, tales vacunas se deben diseñar para facilitar una administración simultánea de los péptidos derivados de survivina más adecuados opcionalmente en combinación con otros péptidos y/o adyuvantes adecuados como se describen posteriormente en el presente documento.

Además, como se ha descrito anteriormente, ha habido un enfoque aumentado sobre la provocación de la inmunidad de células T auxiliares específicas de tumor, es decir, vacunar con epítopos restringidos a CMH de clase II a pesar del hecho de que los tumores en general no expresan CMH de clase II. Esto se basa en el descubrimiento reciente de que la inducción y la eficacia de la respuesta antitumoral inducida por vacunas en muchos casos requieren la cooperación de células T_h CD4 positivas específicas de tumor. Por tanto, un factor importante que impulsa el desarrollo de vacunas que tengan una composición más compleja es el deseo de atacar múltiples antígenos tumorales, por ejemplo mediante el diseño de vacunas que comprendan o codifiquen una colección de epítopos de células CTL y T_h cuidadosamente seleccionados.

Obviamente, las vacunas multiepítipo constituyen una manera eficiente de inducir la inmunidad contra los epítopos derivados de varios antígenos diferentes sin la necesidad de introducir (genes que codifiquen) proteínas potencialmente peligrosas, tales como oncoproteínas. Tales vacunas también permiten la inducción selectiva de inmunidad contra los epítopos de células T subdominantes y crípticos, que pueden ser especialmente importantes en el caso de los autoantígenos asociados a tumor, para los que puede existir tolerancia para los epítopos que se presentan prominentemente en tejidos normales. Además, las células presentadoras de antígeno pueden fracasar al presentar ciertos epítopos que se expresan en células tumorales debido a diferencias funcionales entre los inmunoproteasomas de las células presentadoras de antígeno y los proteasomas 'constitutivos' presentes en la mayoría de las células tumorales. En el caso de vacunas basadas en péptidos, tales epítopos se pueden administrar

en una forma 'lista para CMH', que permite la presentación a través de una carga exógena independientemente de la captación y el procesamiento del antígeno por las células presentadoras de antígeno del huésped.

5 En otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido como se define anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender dos o más péptidos derivados de survivina, interaccionando cada uno específicamente con una molécula de HLA diferente para cubrir así una gran proporción de la población diana. Por consiguiente, como ejemplos, la composición farmacéutica puede contener una combinación de un péptido restringido a una molécula de HLA-A y un péptido restringido a una molécula de HLA-B, por ejemplo, incluyendo aquellas moléculas de HLA-A y HLA-B que se corresponden con la prevalencia de fenotipos de HLA en la población diana, tales como HLA-A2 y HLA-B35. Adicionalmente, la
10 composición puede comprender un péptido restringido a una molécula de HLA-C.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un péptido como se define anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso como medicamento.

Adicionalmente, la composición farmacéutica de la invención puede comprender ventajosamente al menos una proteína inmunogénica adicional o un fragmento peptídico de la misma seleccionada de una proteína o fragmento peptídico que no pertenezca a, ni derive de, la proteína survivina.
15

Como el péptido de la invención es una molécula relativamente pequeña se puede requerir en tales composiciones combinar los péptidos con varios materiales tales como adyuvantes, para producir vacunas, composiciones inmunogénicas, etc. Los adyuvantes, ampliamente definidos, son sustancias que fomentan las respuestas inmunes. Con frecuencia, el adyuvante de elección es un adyuvante completo o incompleto de Freund, u organismos muertos de *B. pertussis*, utilizados por ejemplo en combinación con un antígeno precipitado en alumbre. Se proporciona un análisis general de los adyuvantes en Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (2ª Edición, 1986) en las páginas 61-63. Sin embargo, Goding observa que, cuando el antígeno de interés es de bajo peso molecular o es poco inmunogénico, se recomienda el acoplamiento con un soporte inmunogénico. Los ejemplos de tales moléculas soporte incluyen hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina e inmunoglobulina de aves.
20 También se ha sugerido que diferentes extractos de saponina son útiles como adyuvantes en las composiciones inmunogénicas. Recientemente, se ha propuesto utilizar el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), una citoquina bien conocida, como un adyuvante (documento WO 97/28816).
25

Según esto, se puede usar el péptido de acuerdo con la invención en una composición terapéutica que además comprende cualquier sustancia adyuvante incluyendo cualquiera de las anteriores o combinaciones de las mismas.
30 También se contempla que el péptido y el adyuvante se puedan administrar por separado en cualquier secuencia apropiada.

La cantidad del péptido inmunogénico usado de acuerdo con la invención puede variar, dependiendo de la aplicación particular. Sin embargo, una dosis individual del inmunógeno está preferiblemente en cualquier zona 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 la administración intradérmica, subcutánea e intravenosa, implantación en forma de una formulación de liberación con el tiempo, etc. En el presente documento se abarcan cualquiera y todas las formas de administración conocidas en la técnica. También se abarcan cualquiera y todas las formas de dosificación convencionales que se conozcan en la técnica como apropiadas para formular composiciones peptídicas inmunogénicas inyectables, tales como formas liofilizadas y formas en solución, suspensión o emulsión que contengan, si se requiere, vehículos, diluyentes, conservantes, adyuvantes, amortiguadores del pH, etc., convencionales farmacéuticamente aceptables.
35
40

El efecto inmunoprotector del péptido usado de acuerdo con la invención se puede determinar empleando varios planteamientos. En los siguientes ejemplos se proporcionan ejemplos de los mismos. Un ejemplo adicional sobre cómo determinar una respuesta de CTL provocada por la composición inmunogénica se proporciona en el documento WO 97/28816, *supra*. También se puede determinar una respuesta inmune de éxito por la presencia de reacciones de DTH después de la inmunización y/o la detección de anticuerpos que reconozcan específicamente el/los péptido(s) de la composición de vacuna.
45

El péptido puede usarse de acuerdo con la invención en una composición inmunogénica o vacuna capaz de inducir una respuesta inmune a una enfermedad cancerosa. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "composición inmunogénica o vacuna" se refiere a una composición que induce al menos un tipo de respuesta inmune dirigida contra las células cancerosas. Por consiguiente, tal respuesta inmune puede ser cualquiera de los tipos mencionados anteriormente: una respuesta de CTL donde se generan CTL que son capaces de reconocer el complejo HLA/péptido presentado en las superficies celulares que produce la lisis celular, es decir, la vacuna induce la producción en el sujeto vacunado de células T efectoras que tienen un efecto citotóxico contra las células cancerosas; una respuesta de células B que da lugar a la producción de anticuerpos anticancerosos; y/o una respuesta inmune de tipo DHT.
50
55

Se puede inducir una respuesta inmunogénica dirigida contra una enfermedad cancerosa mediante la administración del péptido de la invención ya sea mediante la carga de moléculas de CMH de clase I en células presentadoras de

antígeno (CPA) del paciente, mediante el aislamiento de PBL del paciente e incubación de las células con el péptido antes de inyectar las células de nuevo al paciente o mediante el aislamiento de CPA precursoras del paciente y la diferenciación de las células a CPA profesionales utilizando citoquinas y antígeno antes de inyectar las células de nuevo al paciente. Por lo tanto, cuando se usa de acuerdo con la invención, se puede administrar el péptido mediante la presentación del péptido a células presentadoras de antígeno (CPA) del paciente *ex vivo* seguido por inyección de las CPA así tratadas de nuevo al paciente. Existen al menos dos maneras alternativas de llevar esto a cabo. Una alternativa es aislar las CPA del paciente de cáncer e incubar (cargar) las moléculas de CMH de clase I con el péptido. La carga de las moléculas de CMH de clase I significa incubar las CPA con el péptido de tal manera que las CPA con las moléculas de CMH de clase I específicas para el péptido se unirán al péptido y por consiguiente serán capaces de presentarlo ante las células T. Posteriormente, las CPA se vuelven a inyectar en el paciente. Otra manera alternativa se apoya en los descubrimientos recientes hechos en el campo de la biología celular dendrítica. En este caso, se aíslan monocitos (que son precursores de células dendríticas) del paciente y se diferencian *in vitro* a CPA profesionales (o células dendríticas) mediante el uso de citoquinas y antígeno. Esto se describe en los ejemplos 3 y 5, donde se cultivan PBL adherentes (que son principalmente monocitos) *in vitro*, junto con GM-CSF, IL-4 y TNF- α . Posteriormente, se pulsan las CD generadas *in vitro* con el péptido y se inyectan en el paciente.

Debido al hecho de que parece que la survivina se expresa en la mayoría de las formas de cáncer, es muy probable que se pueda usar el péptido de acuerdo con la invención para controlar cualquier tipo de enfermedad cancerosa donde se exprese survivina. Por consiguiente, como ejemplos, se puede usar el péptido en composiciones de vacuna que son inmunológicamente activas contra un tumor maligno hematopoyético, incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mielóide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas, y cáncer de próstata.

De esta manera, la presente invención proporciona el medio para aliviar o curar una enfermedad cancerosa. Según esto, es un objeto adicional de la invención proporcionar una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente en el presente documento para su uso como un medicamento, tal como para el tratamiento del cáncer. En formas de realización aún adicionales, la presente invención se refiere al uso del péptido para el tratamiento de una enfermedad cancerosa asociada con la expresión de survivina, incluyendo como ejemplos: un tumor maligno hematopoyético, incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mielóide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata. El uso comprende administrar a un paciente que padece la enfermedad, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica según la invención, una molécula que es capaz de unirse de forma específica a un péptido de la invención y/o una molécula que es capaz de bloquear la unión de tal molécula.

En algunos casos, será apropiado combinar el uso de la invención con un tratamiento contra el cáncer convencional tal como radioterapia o quimioterapia.

Ahora se describirá la invención con mayor detalle en los siguientes ejemplos no limitantes y en las figuras, en las cuales:

La figura 1 ilustra la respuesta de células T medida en un ELISPOT en el paciente LLC1 a sin péptido, al péptido Sur1 (LTLGEFLKL, SEQ ID NO: 10) y al péptido Sur9 (ELTLGEFLKL, SEQ ID NO: 3). Los PBL se estimularon una vez con el péptido antes de sembrarse a 6×10^5 células por pocillo en duplicado. Se calculó el número medio de manchas por péptido utilizando un dispositivo de barrido CCD y un sistema de ordenador,

La figura 2 ilustra la respuesta de células T medida en un ELISPOT en el paciente LLC1 a sin péptido, al análogo de péptido Sur1L2 (LLLGEFLKL, SEQ ID NO: 4) y al análogo de péptido Sur1M2 (LMLGEFLKL, SEQ ID NO: 5). Los PBL se estimularon una vez con el péptido antes de sembrarse a 10^4 células por pocillo en duplicado. Se calculó el número medio de manchas por péptido utilizando un dispositivo de barrido CCD y un sistema de ordenador,

La figura 3 muestra las respuestas medidas en un ELISPOT en los pacientes LLC2 y LLC3 a ningún péptido (barra negra), al péptido Sur1 (LTLGEFLKL, SEQ ID NO: 10) (barra gris), al péptido Sur9 (ELTLGEFLKL, SEQ ID NO: 3) (barra blanca), al análogo de péptido Sur1L2 (LLLGEFLKL, SEQ ID NO: 4) (barra gris clara) y al análogo de péptido Sur1M2 (LMLGEFLKL, SEQ ID NO: 5) (barra gris oscura). Cada experimento se llevó a cabo con 10^5 células por pocillo en duplicado, y se calculó el número medio de manchas,

La figura 4 representa células T que se aislaron de los ganglios linfáticos infiltrados por el tumor de los pacientes Mel1, Mel2 y Mel3, estimulados una vez *in vitro* y analizados en un ensayo ELISPOT para determinar la respuesta a sin péptido (barra negra), los péptidos Sur1 (LTLGEFLKL, SEQ ID NO: 10) (barra gris) y Sur9 (ELTLGEFLKL, SEQ ID NO: 3) (barra blanca). Cada experimento se llevó a cabo por duplicado con 10^5 células por pocillo. En cada experimento también se incluyeron dos pocillos sin adición de péptido. Se calculó el número medio de manchas por péptido para cada paciente,

La figura 5 muestra la actividad funcional de CTL específicos de survivina. Los CTL se aislaron de un ganglio linfático infiltrado por melanoma usando bolas magnéticas recubiertas con survivina. (A) Lisis específica de líneas celulares de melanoma: FM3 positiva para HLA-A2 (triángulo) y FM45 negativa para HLA-A2 (cuadrado). (B) Lisis específica de líneas celulares de cáncer de mama: MCF-7 positiva para HLA-A2 (triángulo) y BT-20 negativa para HLA-A2 (cuadrado),

- 5 La figura 6 muestra la frecuencia de CTL que reaccionan con survivina en PBL de pacientes de cáncer de mama. La reactividad se examinó en tres pacientes de cáncer de mama (superior, media e inferior, respectivamente) mediante ELISPOT. Para cada paciente los ensayos se llevaron a cabo en ausencia de péptido, en presencia de péptido sur1, en presencia de péptido sur9 y en presencia del péptido modificado sur1M2. Se utilizaron 1×10^4 células efectoras por pocillo. La gráfica representa la cuantificación de células reactivas; las columnas grises representan el número promedio de células productoras de IFN- γ ,
- 10 La figura 7 ilustra la unión a HLA-B35 de péptidos derivados de survivina y el análisis de la recuperación mediada por péptido de las moléculas de HLA-B35 por los péptidos derivados de survivina. Se incubaron lisados de células T2-B35 metabólicamente marcadas a 4 °C en presencia de péptido 50, 5, 0,5, 0,05, y 0,005 mM. La recuperación de HLA-B35 se analizó en un ensayo de ensamblaje y se cuantificó posteriormente a electroforesis IEF en gel, usando el software de Phosphorimager ImageGauge (FUJI photo film Co., LTD., Japón). El valor C_{50} es la concentración del péptido requerida para la unión semi-máxima a HLA-B35,
- 15 La figura 8 muestra respuestas espontáneas de células T observadas en PBL de pacientes de cáncer. A) El número de células formadoras de mancha de IFN γ medidas en el ensayo ELISPOT sin péptido (barras blancas), con sur51-59 (barras negras) o sur46-54 (barras grises), entre PBL estimulados *in vitro* de los pacientes LLC5 (10^5 células/pocillo), HEM12 (10^5 células/pocillo) y HEM8 (5×10^4 células/pocillo). B) El número de células formadoras de mancha entre $1,7 \times 10^5$ PBL de HEM12, cultivadas durante 10 días con células dendríticas autólogas maduras por pulsos con péptidos. Las columnas representan la media de dos medidas,
- 20 La figura 9 demuestra las respuestas espontáneas de células T contra péptidos de survivina nativos y modificados en pacientes de melanoma. A) El número de células formadoras de manchas medidas en el ensayo ELISPOT contra sur51-59 y sur51Y9 del paciente FM25 en PBL (4×10^3 células/pocillo) y TIL (7×10^4 células/pocillo), así como TIL de FM45 (10^5 células/pocillo). B) El número de células formadoras de manchas medidas en el ensayo ELISPOT contra sur46 y sur46Y9 medidas en TIL de FM74 (5×10^3 células/pocillo). Las columnas representan la media de dos medidas con la liberación no específica de IFN γ restada,
- 25 La figura 10 ilustra la afinidad de unión de los péptidos derivados de survivina a HLA-A1. Se cuantificaron las bandas de cadena pesada de CMH de clase I en un Phosphorimager. La cantidad de cadena pesada de HLA-A1 estabilizada está directamente relacionada con la afinidad de unión del péptido añadido. La recuperación de HLA-A1 mediada por péptido (unidades arbitrarias) inducida por 40, 4, 0,4, 0,04 μ M de Sur93-101 (*línea*), Sur93T2 (*cuadrado*), Sur49-58 (*círculo*) o virus de la gripe A, PB1 591-599 (*triángulo*),
- 30 La figura 11 muestra las respuestas espontáneas contra los péptidos restringidos a HLA-A1. Respuestas espontáneas de células T contra péptidos derivados de survivina medidas mediante el ensayo ELISPOT. El número medio de manchas de IFN γ específicas del péptido formadas en respuesta a Sur92-101, Sur38Y9, Sur47Y10 y Sur93T2 entre 5×10^4 PBL o TIL de pacientes de melanoma estimulados *in vitro*. Las respuestas específicas de péptidos mostradas se observaron entre los análisis de seis muestras de PBL y tres muestras de TIL de pacientes de melanoma (Mel). Se restan las manchas de IFN γ no específicas. *Barras*: rango de duplicados,
- 35 La figura 12 muestra las respuestas espontáneas contra los péptidos restringidos a HLA-A11. Respuestas espontáneas de células T contra los péptidos derivados de survivina medidas mediante el ensayo ELISPOT. El número medio de manchas de IFN γ específicas de péptidos formadas en respuesta a Sur53-62 entre 5×10^4 PBL o TIL de pacientes de cáncer estimulados *in vitro*. Las respuestas específicas de péptidos mostradas se observaron entre los análisis de cinco pacientes de melanoma (Mel) (5 PBL, 1 TIL), y dos pacientes de LLC (LLC) (PBL). Se restan las manchas no específicas de IFN γ . *Barras*: rango de duplicados,
- 40 La figura 13 ilustra las respuestas espontáneas contra los péptidos restringidos a HLA-A3. Respuestas espontáneas de células T contra los péptidos derivados de survivina medidos mediante el ensayo ELISPOT. El número medio de manchas de IFN γ específicas de péptidos formadas en respuesta a Sur18K10 entre 5×10^4 PBL o TIL de pacientes de melanoma estimulados *in vitro*. Las respuestas específicas de péptidos mostradas se observaron entre los análisis de 23 muestras de PBL y cuatro muestras de TIL de pacientes de melanoma (Mel). Se sustraen las manchas no específicas de IFN γ . *Barras*: rango de duplicados,
- 45 La figura 14 ilustra las respuestas espontáneas contra los péptidos restringidos a HLA-A2. Respuestas espontáneas de células T contra los péptidos derivados de survivina medidos mediante el ensayo ELISPOT. El número medio de manchas de IFN γ específicas de péptidos formados en respuesta al péptido 11-mero, Sur18-28, entre 5×10^4 PBL de pacientes de cáncer estimulados *in vitro*. Las respuestas específicas de péptidos mostradas se observaron entre los análisis de 10 muestras de PBL de 2 pacientes de melanoma (Mel), 6 de LLC (LLC) y 2 de carcinoma de mama (CM). Se restan las manchas no específicas de IFN γ . *Barras*: rango de duplicados,
- 50 La figura 15 ilustra las respuestas espontáneas de células T contra los péptidos derivados de survivina medidos mediante el ensayo ELISPOT. El número medio de manchas de IFN γ específicas de péptidos formadas en respuesta a sur6-14 (LPPAWQPFL) entre 10^5 PBL estimulados *in vitro* de 5 pacientes de melanoma (mel25, mel26, mel3, mel6, mel39), dos pacientes de LLC (LLC1, LLC54) y 2 pacientes de cáncer de mama (mama11, mama15). Se restan las manchas no específicas de IFN γ ,
- 55

ES 2 529 203 T3

La figura 16 ilustra los valores analíticos de la detección estable de LDH, colinesterasa, creatinina, hemoglobina, leucocitos, y trombocitos tras la terapia de vacunación de cuatro pacientes (▲ RW, ● KN, — WWE, ■ GB), y

5 La figura 17 demuestra el análisis cinético de la inmunidad a péptidos de survivina evaluado mediante ELISPOT de IFN γ . Se obtuvieron PBMC antes de la primera vacunación con CD y tres meses después de la misma. Se muestran los números de células formadoras de manchas de IFN γ por encima del fondo.

En la siguiente tabla, se enumeran las secuencias de aminoácidos para los péptidos utilizados en el presente documento y sus respectivas SEQ ID NOs:

SEQ ID NO:	DESIGNACIÓN	SECUENCIA
1	Sur6	FLKLDRERA
2	Sur8	TLPPAWQPFL
3	Sur9	ELTLGEFLKL
4	Sur1L2	LLLGEFLKL
5	Sur1M2	LMLGEFLKL
6	Sur 46-54	CPTENEPDL
7	Sur51-59	EPDLAQCF
8	Sur46Y9	CPTENEPDY
9	sur51Y9	EPDLAQCFY
10	Sur1	LTLGEFLKL
11	C1	ILKEPVHGV
12	Sur2	RAIEQLAAM
13	Sur3	KVRRRAIEQL
14	Sur4	STFKNWPFL
15	Sur5	SVKKQFEEL
16	Sur7	TAKKVRRAI
17	Sur10	ETAKKVRRAI
18	Sur 6-14	LPPAWQPFL
19	Sur 11-19	QPFLKDHR
20	Sur 34-43	TPERMAEAGF
21	C24	YPLHEQHQM
22	Sur14-22	LKDHRISTF
23	Sur38-46	MAEAGFIHC
24	Sur93-101	FEELTLGEF
25	Sur47-56	PTENEPDLAQ
26	Sur49-58	ENEPDLAQCF
27	Sur92-101	QFEELTLGEF
28	C1	VSDGGPNLY
29	Sur14Y9	LKDHRISTY

ES 2 529 203 T3

30	sur93Y9	FEELTLGEY
31	sur92Y9	QFEELTLGEY
32	sur34Y9	TPERMAEAGY
33	sur49Y9	ENEPDLAQCY
34	Sur92T2	QTEELTLGEF
35	Sur92S2	QSEELTLGEF
36	Sur93T2	FTEELTLGEF
37	Sur93S2	FSEELTLGEF
38	Sur38Y9	MAEAGFIHY
39	Sur47Y10	PTENEPDLAY
40	Sur 5-13	TLPPAWQPF
41	Sur 53-61	DLAQCFCK
42	Sur 54-62	LAQCFFCFK
43	Sur 95-103	ELTLGEFLK
44	Sur 112-120	KIAKETNNK
45	Sur 13-22	FLKDHRISTF
47	Sur 53-62	DLAQCFCK
50	Sur 103-112	KLDREERAKNK
51	Sur 112-121	KIAKETNNKK
52	Sur 113-122	IAKETNNKKK
53	C3	ILRGVAHK
54	Sur5K9	TLPPAWQPK
55	Sur53K9	DLAQCFCK
56	Sur54L2	LLQCFFCFK
57	Sur13K9	FLKDHRISTK
58	Sur18K10	RISTFKNWPK
59	Sur113L2	ILKETNNKKK
60	SurEx3-A3-1	TIRRKNLRK
61	SurEx3-A3-2	PTIRRKNLRK
62	Sur2b-A3-1	RITREEHKK
63	C4	AVFDRKSDAK
64	C6	QPRAPIRPI
65	C7	RPPIFIRRL
66	Sur4-14	PTLPPAWQPFL
67	Sur18-28	RISTFKNWPFL

68	Sur54-64	LAQCFFCFKEL
69	Sur86-96	FLSVKKQFEEL
70	Sur88-98	SVKKQFEELTL
71	Sur103-113	KLDREERAKNKI
72	Ebv, BMLF1	GLCTLVAML
73	Hiv, Pol	ILKEPVHGV
74	Gripe A, nucleoproteína 265-273	ILRGVVAHK

Ejemplo 1

Identificación de una respuesta de linfocitos T citotóxicos a la proteína inhibidora de apoptosis survivina en pacientes de cáncer

5 Sumario

Utilizando epítomos de CTL derivados de survivina, se ha estudiado la reactividad de células T específicas contra tales antígenos en sangre periférica de pacientes de leucemia linfática crónica (LLC) y en los ganglios linfáticos infiltrados por el tumor de pacientes de melanoma, mediante análisis ELISPOT. Las respuestas de CTL a los epítomos de péptidos derivados de survivina se detectaron en tres de seis pacientes de melanoma y en tres de cuatro pacientes de LLC. No se detectó reactividad de células T en PBL de seis controles sanos. Por consiguiente, los péptidos derivados de survivina pueden servir como dianas importantes y ampliamente aplicables para las estrategias inmunoterapéuticas contra el cáncer.

Introducción

La proteína survivina se barrió para determinar la presencia de motivos de péptido de unión a HLA-A*0201 (HLA-A2) y después de una identificación con éxito, los péptidos se utilizaron para probar la reactividad de células T específicas en pacientes de leucemia y melanoma mediante ensayo ELISPOT. En ambas cohortes de pacientes se detectaron respuestas de CTL a dos epítomos de péptidos derivados de survivina, mientras que no se pudo detectar reactividad alguna de células T en los controles sanos. Estos datos sugieren que la survivina representa un antígeno tumoral ampliamente expresado reconocido por las células T autólogas.

20 Materiales y Métodos

Pacientes y controles normales

Se recogieron muestras de sangre de vena periférica de 4 pacientes diagnosticados con LLC (designados como LLC1-4) y muestras de sangre de 6 individuos normales en tubos heparinizados. Se aislaron los PBL utilizando separación por Lymphoprep y se congelaron en suero fetal de ternera (SFT) con dimetilsulfóxido al 10 %. Además, se obtuvieron linfocitos T de los ganglios linfáticos infiltrados por el tumor de 6 pacientes de melanoma (designados como mel1-6). Los ganglios linfáticos recién cortados se trocearon en fragmentos pequeños, se trituraron para liberar las células al cultivo y se crioconservaron. Estuvieron disponibles PBL de 4 pacientes de melanoma. Todos los individuos incluidos eran positivos para HLA-A2 determinado mediante análisis por FACS utilizando el anticuerpo BB7.2 específico de HLA-A2. El anticuerpo se purificó a partir del sobrenadante del hibridoma. Las muestras de los pacientes se obtuvieron del Hospital de la Universidad del Estado, Herlev, Dinamarca. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes antes de cualquiera de estas medidas.

Péptidos derivados de survivina

Todos los péptidos se obtuvieron de Research Genetics (Huntsville, AL, EE UU) y se suministraron a una pureza >90 % verificado mediante análisis por HPLC y EM. Los péptidos utilizados se enumeran en la Tabla 1.

35

Tabla 1. Péptidos examinados en este estudio y su afinidad de unión a HLA-A2

Nombre	Proteína ^a	Secuencia	SEQ ID NO:	C ₅₀ (μM) ^b
C1	VIH-1 Pol ₄₇₆₋₄₈₄	ILKEPVHGV	11	0,7

Sur1	Survivina ₉₆₋₁₀₄	LTLGEFLKL	10	>100
Sur2	Survivina ₁₃₃₋₁₄₁	RAIEQLAAM	12	Sin unión
Sur3	Survivina ₁₃₀₋₁₃₈	KVRRRAIEQL	13	>100
Sur4	Survivina ₂₀₋₂₈	STFKNWPFL	14	Sin unión
Sur5	Survivina ₈₈₋₉₆	SVKKQFEEL	15	Sin unión
Sur6	Survivina ₁₀₁₋₁₀₉	FLKLDREERA	1	30
Sur7	Survivina ₁₂₇₋₁₃₅	TAKKVRRAI	16	Sin unión
Sur8	Survivina ₅₋₁₄	TLPPAWQPFL	2	30
Sur9	Survivina ₉₅₋₁₀₄	ELTLGEFLKL	3	10
Sur10	Survivina ₁₂₆₋₁₃₅	ETAKKVRRAI	17	Sin unión
Sur1L2		LLLGEFLKL	4	1
Sur1M2		LMLGEFLKL	5	1

^a El intervalo de valores enumerado en los subíndices indica la posición del péptido en la secuencia de survivina como se divulga en el documento US 6.245.523.

^b El valor C₅₀ es la concentración del péptido requerida para una unión semi-máxima a HLA-A2 determinado como se describe a continuación.

Ensayo de ensamblaje para unión del péptido a las moléculas de CMH de clase I.

Se llevaron a cabo los ensayos de ensamblaje para la unión de los péptidos sintéticos a las moléculas de CMH de clase I metabólicamente marcadas con [35S]-metionina, como se ha descrito (12, 13). El ensayo de ensamblaje se basa en la estabilización de las moléculas de clase I después de cargar el péptido en la línea celular deficiente en transportador peptídico T2. Posteriormente, se inmunoprecipitan las cadenas pesadas de CMH estables correctamente plegadas utilizando anticuerpos dependientes de la conformación. Después de la electroforesis IEF, los geles se expusieron a pantallas de phosphorimager, y se cuantificó la unión del péptido utilizando el programa Imagequant PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Estimulación de PBL por antígeno

Con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo ELISPOT, se estimularon los PBL una vez in vitro antes del análisis (14, 15). Los PBL recientes y los previamente congelados dieron resultados similares en el ensayo ELISPOT. El día 0, se descongelaron los PBL o ganglios linfáticos triturados y se sembraron a 2 ml/pocillo a una concentración de 2x10⁶ células, en placas de 24 pocillos (Nunc, Dinamarca), en medio AIM V (Life Technologies, Roskilde, Dinamarca), suero humano inactivado por calor al 5 % y L-glutamina 2 mM en presencia de péptido 10 µM. En cada experimento, se incluyó un pocillo sin péptido. Dos días después, se añadió interleuquina-2 recombinante (IL-2) 300 UI/ml (Chiron, Ratingen, Alemania) a los cultivos. Se probó la reactividad de las células cultivadas en el ensayo ELISPOT el día 12.

Ensayo ELISPOT

El ensayo ELISPOT utilizado para cuantificar las células efectoras liberadoras de interferón-γ específicas del epítipo del péptido se llevó a cabo como en (16). Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos de fondo de nitrocelulosa (MultiScreen MAIP N45, Millipore, Hedehusene, Dinamarca) con anticuerpo anti-IFN-γ (1-D1K, Mabtech, Nacka, Suecia). Los pocillos se lavaron, se bloquearon con medio AIM V, y se añadieron las células en duplicados a diferentes concentraciones celulares. Luego se añadieron los péptidos a cada pocillo y las placas se incubaron durante la noche. Al día siguiente, se desechó el medio y los pocillos se lavaron antes de añadir el anticuerpo secundario biotinilado (7-B6-1-Biotina Mabtech). Las placas se incubaron durante 2 horas, se lavaron y se añadió el conjugado avidina-enzima (AP-Avidina, Calbiochem, Life Technologies) a cada pocillo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se añadió el sustrato enzimático NBT/BCIP (Gibco, Life Technologies) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. La reacción se terminó lavando con agua del grifo hasta que surgieron manchas púrpura oscuro. Las manchas se contaron utilizando un Sistema Alphamager (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EE. UU.) y se pudo calcular la frecuencia de CTL específica del péptido a partir de los números de células formadoras de manchas. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado para cada antígeno peptídico.

Resultados

Unión de péptidos derivados de survivina a HLA-A2.

La secuencia de aminoácidos de la proteína survivina se rastreó para determinar los epítomos de péptidos nona- y decaméricos de HLA-A2 más probables, utilizando los principales residuos de anclaje específicos de HLA-A2 (17). Se sintetizaron diez péptidos derivados de survivina y se examinó su unión a HLA-A2. Se utilizó un epítomo de VIH-1 pol476-484 (ILKEPVHGV, SEQ ID NO: 11) (Tabla 1) como control positivo. La concentración de péptido requerida para la recuperación semi-máxima de CMH de clase I (valor C_{50}) fue de 0,7 μM para el control positivo. En comparación, el péptido designado Sur9 (ELTLGEFLKL, SEQ ID NO: 3) se unió con una afinidad de $C_{50} = 10 \mu\text{M}$. Los péptidos designados Sur6 (FLKDRERA, SEQ ID NO: 1) y Sur8 (TLPPAWQPFL, SEQ ID NO: 2) se unieron respectivamente a HLA-A2 a $C_{50} = 30 \mu\text{M}$, mientras que Sur1 (LTLGEFLKL, SEQ ID NO: 10) y Sur3 (KVRRAIEQL, SEQ ID NO: 13) se unieron más débilmente ($C_{50} > 100 \mu\text{M}$). Cinco de los péptidos examinados (Sur2, Sur4, Sur5, Sur7, y Sur10) no se unieron a HLA-A2.

Puesto que Sur1 se une de forma débil a HLA-A2, se sintetizaron dos péptidos análogos designados Sur1L2 y Sur1M2, respectivamente, en los que un residuo de anclaje mejor (leucina o metionina) reemplazó a la treonina nativa en la posición 2. Ambos péptidos se unen a HLA-A2 con alta afinidad casi similar a la del control positivo ($C_{50} = 1 \mu\text{M}$).

Respuesta de CTL a survivina en pacientes de LLC.

Los PBL de cuatro pacientes de LLC positivos para HLA-A2 se estimularon una vez *in vitro* antes de examinarse en el ensayo ELISPOT. Este procedimiento se seleccionó para aumentar la sensibilidad del ELISPOT. Se incluyeron los 10 péptidos derivados de survivina anteriores en la primera línea de experimentos. Se detectaron respuestas a Sur1 y Sur9 y en las figuras solamente se dan los datos para estos péptidos. La figura 1 muestra la reactividad de CTL a Sur1 y Sur9 determinada en el paciente LLC1. Cada mancha representa una célula productora de IFN- γ que reacciona con el péptido. El número medio de manchas por péptido se calculó utilizando un dispositivo de barrido CCD y un sistema de ordenador. Se detectaron 52 manchas específicas del péptido Sur9 (después de la sustracción de las manchas sin el péptido añadido) por 6×10^5 en el paciente LLC1 (Fig. 1). No se detectó respuesta alguna al péptido Sur1 de unión débil a HLA-A2, sin embargo el paciente respondió fuertemente al análogo de péptido Sur1M2 de unión fuerte a HLA-A2 (35 manchas específicas del péptido por 10^4 células) (Fig. 2). No se detectó respuesta alguna al otro análogo de péptido Sur1L2 de fuerte unión a HLA-A2 en este paciente (Fig. 2). El paciente LLC2 respondió fuertemente a Sur9 (128 manchas específicas del péptido por 10^5 células) y débilmente a Sur1 (22 manchas específicas del péptido por 10^5 células) (Fig. 3). La respuesta al análogo Sur1L2 se incrementó sólo ligeramente en relación con el epítomo natural, mientras que el paciente respondió fuertemente de una manera similar al péptido Sur1M2 que al péptido decamérico Sur9. En el paciente LLC3 se observó una respuesta débil a Sur9 (Fig. 3). No se observó respuesta alguna a Sur1 o a los péptidos modificados de Sur1 en el paciente. No se detectaron respuestas de survivina en el último paciente CLL4 (datos no mostrados). Se analizaron los PBL de seis controles positivos sanos para HLA-A2 con el fin de investigar si se podría detectar una respuesta a la survivina en los individuos sanos. No se observó respuesta alguna en ninguno de los controles a ninguno de los péptidos derivados de survivina.

Respuesta de CTL a survivina en pacientes de melanoma.

Se examinaron linfocitos T aislados de ganglios linfáticos infiltrados por tumor de pacientes de melanoma positivos para HLA-A2. El ganglio linfático recién cortado se troceó en fragmentos pequeños y se aplastó para liberar las células al cultivo. Las células se estimularon una vez con el péptido *in vitro* antes de examinarse en el ensayo ELISPOT. Se detectaron células T específicas de survivina en tres de los seis pacientes analizados. Se detectó una fuerte respuesta a Sur9 en los pacientes Mel2 y Mel3. También se detectó una respuesta más débil al péptido Sur1 en estos pacientes (Fig. 4). En Mel1 la respuesta al péptido de unión débil Sur1 fue más fuerte que la respuesta a Sur9 de unión más fuerte a HLA-A2 (Fig. 4). No se detectó respuesta alguna en los ganglios linfáticos infiltrados por tumor de los últimos tres pacientes de melanoma (Mel4-6). Se examinaron los PBL de dos de los pacientes que reaccionaron a survivina, Mel1 y Mel2, y de dos de los pacientes que no reaccionaron, Mel4 y Mel5. No se pudo detectar respuesta alguna a Sur9 o Sur1 en los PBL de ninguno de estos pacientes (datos no mostrados).

Ejemplo 2

Respuestas espontáneas de células T citotóxicas a los epítomos de células T restringidos a CMH de clase I derivados de survivina *in situ* y *ex vivo* en pacientes de cáncer

Sumario

Se demostraron respuestas espontáneas de células T citotóxicas a los epítomos de células T restringidos a CMH de clase I derivados de survivina *in situ* así como *ex vivo* en pacientes de cáncer de mama, leucemia y melanoma. Además, las células T que reaccionan con survivina aisladas mediante bolas magnéticas recubiertas con complejos CMH/péptido eran citotóxicas a tumores con HLA coincidente de diferentes tipos de tejido. Al ser un antígeno tumoral universal, la survivina puede servir como diana ampliamente aplicable para la inmunoterapia contra el cáncer.

Materiales y Métodos

Construcción de complejos HLA-péptido para tinción de células T y separación de células T.

5 Se expresó un sitio de reconocimiento para la biotilización enzimática utilizando la proteína ligasa de biotina (BirA) en fusión con el extremo 5' de los dominios extracelulares de HLA A*0201 (residuos 1-275) en *E. coli* BL21 (DE3). La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía por tamaño (Sephadex G25, Pharmacia) y de intercambio iónico (mono-Q, Pharmacia) a partir de cuerpos de inclusión solubilizados en urea 8 M. HLA A*0201 se plegó *in vitro* mediante dilución en presencia del péptido modificado de survivina Sur1M2 (LMLGEFLKL, SEQ ID NO: 5) o del péptido MAA gp100154-163, y posteriormente se biotiló como se ha descrito anteriormente (35, 36).

10 Después de la filtración en gel en una columna de Sephadex G25 de Pharmacia para eliminar la biotina no unida, la proteína se multimerizó con moléculas de dextrano conjugadas con estreptavidina-FITC (amablemente proporcionado por L. Winther, DAKO, Dinamarca) con el fin de generar compuestos multivalentes HLA-dextrano para la inmunohistoquímica. La construcción HLA A*0201 fue un amable obsequio del Dr. Mark M. Davis (Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Stanford, Palo Alto, CA). La separación celular se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (37). Brevemente, se lavaron 5×10^6 bolas magnéticas conjugadas con estreptavidina (Dyna, Oslo, Noruega) dos veces en 200 μ l de PBS frío, se añadieron 0,5 μ g de monómeros de péptido/A*0201 y la mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados estas bolas se mezclaron con PBL en una proporción de 1:10 y posteriormente se incubaron durante 1 hora seguido por una precipitación de las células unidas a las bolas en un campo magnético. El paso de precipitación se repitió una vez.

20 *Tinciones inmunohistoquímicas*

Para la tinción con los complejos péptido/CMH multiméricos conjugados con FITC, las secciones de tejido se secan durante la noche y posteriormente se fijaron en acetona fría durante 5 minutos. Todos los pasos de incubación se llevaron a cabo a temperatura ambiente y en la oscuridad: (i) 45 minutos del anticuerpo primario (diluido 1:100), (ii) anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Cy 3 (diluido 1:500; código 115-165-100, Jackson ImmunoResearch, obtenido de Dianova, Hamburgo, Alemania) durante 45 minutos, y finalmente (iii) los multímeros durante 75 minutos. Entre cada paso los portaobjetos se lavaron dos veces durante 10 minutos en PBS/BSA al 0,1 %. Los portaobjetos se montaron en Vectashield y se mantuvieron en la nevera hasta que se observaron con el microscopio confocal.

Ensayo de citotoxicidad

30 Se llevaron a cabo ensayos convencionales de liberación de $[^{51}\text{Cr}]$ para determinar la citotoxicidad mediada por CTL como se describe en (13). Las células diana eran líneas de células B autólogas transformadas por EBV, la línea celular de cáncer de mama MCF-7 positiva para HLA-A2 (disponible en ATCC), la línea celular de melanoma FM3 positiva para HLA-A2 (38), la línea celular de cáncer de mama BT-20 negativa para HLA-A2 (disponible en ATCC) y la línea celular de melanoma FM45 negativa para HLA-A2 (38). Todas las líneas celulares de cáncer expresaban survivina examinadas por RT-PCR (datos no mostrados).

Ensayo ELISPOT

40 Se utilizó el ensayo ELISPOT para cuantificar las células efectoras liberadoras de IFN- γ específicas del epítipo del péptido y se ha descrito anteriormente (39). Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (MultiScreen MAIP N45, Millipore) con un anticuerpo anti-IFN- γ (1-D1K, Mabtech, Suecia) y se bloqueó la unión no específica utilizando AIM V (GibcoBRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EE.UU.). Se añadieron linfocitos a diferentes concentraciones celulares junto con los péptidos específicos y células T2 y se incubaron durante la noche a 37 °C. Tras dos lavados, se añadió el anticuerpo de detección biotilado (7-B6-1-Biotina Mabtech). La unión específica se visualizó utilizando fosfatasa alcalina-avidina junto con el sustrato respectivo (GibcoBRL). La reacción se terminó tras la aparición de manchas púrpura oscuro, que se cuantificaron utilizando el Sistema AlphaMager (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EE. UU.). Los péptidos utilizados para el ELISPOT fueron Sur1, Sur9 y el péptido análogo de Sur1 Sur1M2, como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados

Tinción in situ de células T que reaccionan con HLA-A2/survivina

50 En el Ejemplo 1 se identificaron dos epítopos peptídicos derivados de survivina reconocidos por las células T en leucemia y melanoma, es decir, Sur1. La débil afinidad de unión de Sur1 a HLA-A2 mejoró sustancialmente mediante el reemplazo de la treonina en la posición 2 con un residuo de anclaje mejor (metionina; Sur1M2). Esta medida permitió la construcción de complejos HLA-A2/péptido estables. Estos complejos se multimerizaron utilizando moléculas de dextrano, que se conjugaron con estreptavidina y FITC. Se utilizaron complejos de CMH multimerizados para teñir material congelado fijado con acetona. Utilizando un microscopio láser confocal se pudieron detectar fácilmente los CTL que reaccionan con Sur1M2/HLA-A*0201 *in situ* en el microentorno tumoral. Se

representan estas células en el tumor primario y en el ganglio linfático centinela de un paciente de melanoma en etapa III así como en una lesión de cáncer de mama primario. Con el fin de asegurar la especificidad de la tinción, se llevaron a cabo una serie de controles negativos. Ni el uso de los multímeros péptido/HLA-dextrano con péptidos derivados del antígeno de diferenciación de melanoma gp100 en el mismo tumor, ni los multímeros Sur1M2/HLA-dextrano en el caso de una muestra tumoral obtenida de un donante negativo para HLA-A2, produjeron una tinción positiva.

Los CTL aislados que reaccionan con survivina lisan líneas celulares tumorales de diferente origen

Con el fin de caracterizar la capacidad funcional de los CTL que reaccionan con survivina, estas células se aislaron por medio de bolas magnéticas recubiertas con complejos HLA-A2/Sur1M2 (36). Un ganglio linfático infiltrado por melanoma recién cortado se troceó en fragmentos pequeños y se aplastó para liberar las células al cultivo. Las células se estimularon una vez con el péptido *in vitro* antes del aislamiento. Un día después del aislamiento se añadió IL-2 y el día 5 se probó la capacidad de estas células para aniquilar células tumorales, ya sea mediante ELISPOT o en un ensayo estándar de liberación de 51Cr. Primero, por medio del análisis ELISPOT fue posible establecer que los CTL aislados utilizando el complejo modificado Sur1M2/HLA-A2 también respondían al péptido Sur1 nativo (datos no mostrados). Segundo, se probó la citotoxicidad de los CTL que reaccionan con survivina contra la línea celular de melanoma FM3 positiva para HLA-A2 (Fig. 5A) y la línea celular de cáncer de mama MCF-7 positiva para HLA-A2 (Fig. 5B). Las células T aisladas lisaron de una manera eficaz ambas líneas celulares de HLA-A*0201. En contraste, no se observó citotoxicidad alguna contra la línea celular de melanoma FM45 negativa para HLA-A2 (Fig. 5A) o la línea celular de cáncer de mama BT-20 negativa para HLA-A2 (Fig. 5B).

Reactividad a survivina medida en PBL mediante ELISPOT

Se examinó la presencia de células T que reaccionan con survivina en PBL de diez pacientes de cáncer de mama positivos para HLA-A2 mediante el ELISPOT. Antes del análisis, los PBL se estimularon una vez *in vitro* para aumentar la sensibilidad del ensayo. Se examinó la reactividad a los siguientes péptidos de survivina: Sur1, Sur9 y Sur1M2. Se detectaron células T específicas de survivina en seis de los diez pacientes de cáncer de mama positivos para HLA-A2. Se dan ejemplos representativos en la Figura 6. En los PBL de dos pacientes se detectó una respuesta contra Sur1 y el análogo modificado Sur1M2, pero no contra Sur9 (Fig. 6, parte superior, media), en tres pacientes se detectó una respuesta a Sur9, pero no a Sur1 o Sur1M2 (Fig. 6, parte inferior) y un paciente respondió solamente a Sur1M2. En contraste, no se detectaron respuestas a survivina en los PBL de 20 donantes sanos positivos para HLA-A2. De una manera similar, se examinaron los PBL de catorce pacientes de melanoma positivos para HLA-A2. Hubo respuestas a survivina presentes en siete de estos pacientes (Tabla 2). Dos pacientes respondieron al péptido Sur9, tres al péptido Sur1M2, uno tanto a Sur1 como a SurM2 y uno a los tres péptidos. En el ejemplo 1, se probó la respuesta de células T a survivina en tres pacientes de leucemia linfática crónica (LLC) (Tabla 2; LLC1, LLC2, LLC3). Estos estudios se extendieron utilizando PBL de tres pacientes adicionales de LLC. Notablemente, todos los pacientes produjeron una respuesta de células T a al menos un epítipo de survivina (Tabla 2; LLC5, LLC6, LLC7). Además, se examinaron los PBL de un paciente que padecía leucemia mieloide crónica (LMC). En este paciente, se identificó una respuesta a los tres péptidos (datos no mostrados). Los datos se sumario en la Tabla 2.

Tabla 2. Pacientes con linfocitos T específicos del péptido survivina en PBL medido mediante ELISPOT

Melanoma a)			
Paciente	Sur1	Sur9	Sur1M2
P4	-	-	97
P11	-	-	112
P13	-	-	71
P15	61	-	101
P17	-	172	-
P39	-	127	-
P64	112	70	128
Cáncer de Mama b)			
Paciente	Sur1	Sur9	Sur1M2
B1	122	-	208

B2	67	-	72
B3	-	54	-
B4	-	45	-
B5	-	19	-
B6	-	-	24
LLC c)			
Paciente	Sur1	Sur9	Sur1M2
LLC1	-	27	320
LLC2	-	39	-
CLL3	23	127	122
LLC5	-	100	124
LLC6	-	121	360
LLC7	68	132	174

- a) Frecuencia de células reactivas por 10^4 ; 14 pacientes examinados.
 b) Frecuencia de células reactivas por 10^4 ; 10 pacientes examinados.
 c) Frecuencia de células reactivas por 10^5 ; 7 pacientes examinados.

Ejemplo 3

5 Respuestas inmunes restringidas a HLA-B35 a péptidos derivados de survivina en pacientes de cáncer

Sumario

En este estudio, se identificaron y caracterizaron dos epítomos derivados de survivina, que están restringidos a HLA-B35. La reactividad de células T específica contra ambos epítomos estaba presente en la sangre periférica de los pacientes con diferentes tumores malignos hematopoyéticos y melanoma. Las sustituciones del residuo de anclaje C-terminal mejoraron el reconocimiento por parte de los linfocitos infiltrantes en el tumor de los pacientes de melanoma. Además, se demostraron respuestas espontáneas de células T citotóxicas a survivina *in situ* en una lesión de melanoma primario. Estos epítomos extienden la aplicabilidad de futuras estrategias de vacuna basada en los péptidos de survivina en relación con los tumores malignos así como el perfil de HLA de los pacientes involucrados.

En los ejemplos 1 y 2, se estudiaron los epítomos de células T derivados de survivina restringidos a HLA-A2. Debido a que HLA-A2 solamente se expresa en aproximadamente el 30 % de la población blanca (63), se necesita identificar los epítomos de péptidos restringidos a otras moléculas de HLA de clase I para extender la fracción de pacientes que se podrían tratar. En este estudio, se identificaron dos epítomos nuevos de células T de survivina restringidos a HLA-B35, que se expresa en el 9 % de la población blanca (63), y se detectaron respuestas inmunes espontáneas a estos péptidos de survivina en pacientes con diferentes tumores malignos hematopoyéticos y melanoma.

Materiales y Métodos

Pacientes

Se recogieron muestras de sangre de vena periférica de pacientes de cáncer, se aislaron los PBL utilizando separación por Lymphoprep, se tipificó el HLA (Departamento de Inmunología Clínica, Hospital de la Universidad, Copenhague) y se congelaron en SFT con DMSO al 10 %. Se seleccionaron diez pacientes positivos para HLA-B35 para un análisis adicional. Estos pacientes padecían melanoma, LLC, linfoma folicular (LF), linfomas difusos de células B grandes (DLBCL) y mieloma múltiple (MM), respectivamente. En el momento en que se recogieron las muestras de sangre los pacientes no habían sido tratados médicamente en los cuatro meses anteriores. Adicionalmente, se recogieron linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) aislados de ganglios linfáticos de tres de los pacientes de melanoma, y se congelaron en SFT con DMSO al 10 %.

Péptidos

Se utilizaron siete péptidos sintéticos derivados de survivina en este estudio: Sur6-14, Sur11-19, Sur34-43, Sur46-54, Sur51-59, Sur46Y9, Sur51Y9 y un péptido derivado de EBV, EBNA3A 457-466 (63). Todos los péptidos se obtuvieron de Research Genetics (Huntsville, AL) y se suministraron a una pureza >90 %, verificado mediante análisis de HPLC y MC. Los péptidos se enumeran en la tabla 3 a continuación.

5 Tabla 3. Unión de los péptidos derivados de survivina a HLA-B35

Nombre	Proteína y posición	Secuencia	SEQ ID NO:	C ₅₀ (µM)
Sur6-14	Survivina ₆₋₁₄	LPPAWQPFL	18	>100
Sur11-19	Survivina ₁₁₋₁₉	QPFLKDHRI	19	Sin unión
Sur34-43	Survivina ₃₄₋₄₃	TPERMAEAGF	20	>100
Sur46-54	Survivina ₄₆₋₅₄	CPTENEPDL	6	20
Sur51-59	Survivina ₅₁₋₅₉	EPDLAQCFE	7	13
Sur46Y9	Péptido modificado	CPTENEPDY	8	4
Sur51Y9	Péptido modificado	EPDLAQCFY	9	1,5
C24	EBNA3A ₄₅₈₋₄₆₆	YPLHEQHQM	21	0,8

Ensayo de ensamblaje para la unión del péptido a moléculas de CMH de clase I.

Se utilizó el ensayo de ensamblaje descrito en los ejemplos 1 y 2 para medir la afinidad de unión de los péptidos sintéticos a las moléculas HLA-B35 metabólicamente marcadas con [S35]metionina. Brevemente, el ensayo se basa en la estabilización mediada por el péptido de las moléculas de HLA vacías liberadas, después de la lisis celular, de la línea celular T2 deficiente en TAP, establemente transfectada con HLA-B35 (amablemente proporcionada por el Dr. J. Haurum, Symphogen ApS, Lyngby, Dinamarca). Las moléculas de HLA establemente plegadas se inmunoprecipitaron utilizando el Acm W6/32 dependiente de conformación. Las moléculas de HLA se separaron mediante electroforesis IEF, los geles se expusieron a pantallas de phosphorimager (Imaging plate, FUJI film Co., LTD., Japón), se analizaron y se cuantificó la cantidad de moléculas de HLA correctamente plegadas, utilizando el software de phosphorimager ImageGauge (FUJI photo film Co., LTD., Japón).

Estimulación de PBL por antígeno

Con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo ELISPOT, los linfocitos se estimularon una vez in vitro con el péptido antes del análisis (14, 15). Los PBL o TIL se descongelaron y se estimularon con los epítopos péptidos individuales 50 µM en placas de 96 pocillos durante 2 horas a 26 °C (5×10^5 - 10^6 células por péptido) y se juntaron durante 10 días adicionales de cultivo a 37 °C en x-vivo con suero humano (SH) al 5 %, en placas de 24 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), con 2×10^6 células por pocillo. El segundo día de la incubación se añadió IL-2 40 µg/ml (Apodan A/S, Dinamarca). El día 10, se probó la reactividad de las células cultivadas en el ensayo ELISPOT.

El ensayo ELISPOT

El ensayo ELISPOT utilizado para cuantificar las células efectoras liberadoras de IFN-γ específicas del péptido en PBL o TIL recogidos de pacientes de cáncer se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (MultiScreen MAIP N45; Millipore, Hedehusene, Dinamarca) con el Acm contra IFN-γ humano, 7,5 µg/ml (1-D1K; Mabtech, Nacka, Suecia). Los pocillos se lavaron y se bloquearon con x-vivo (x-vivo 15TM BioWhittacker, Molecular Applications Aps, Dinamarca) y las células se añadieron en duplicados a diferentes concentraciones. Para la presentación del antígeno, se añadieron 10^4 células T2-B35, con y sin el péptido 10 µM, por pocillo. Las placas se incubaron durante la noche, las células se desecharon y los pocillos se lavaron antes de añadir el anticuerpo secundario biotinilado (7-B6-1-Biotina; Mabtech). Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se añadió el conjugado avidina-fosfatasa alcalina (AP-Avidina; Calbiochem, Life Technologies, Inc.). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se añadió el sustrato enzimático nitroazul de tetrazolio/fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (Código No. K0598, DakoCytomation Norden A/S) y surgieron manchas púrpura oscuro en 3-7 minutos. La reacción se terminó lavando con agua del grifo. Las manchas se contaron utilizando el Sistema Alpha Imager (Alpha Innotech, San Leandro, CA) y se calculó la frecuencia de células T específicas del péptido a partir del número de células formadoras de manchas.

Todos los ensayos se llevaron a cabo en duplicado para cada antígeno peptídico y los linfocitos cultivados en el mismo pocillo se probaron en números iguales de células con y sin péptido, para medir el número de células específicas del péptido en el cultivo.

Maduración de células dendríticas (CD)

Se aislaron células adherentes a partir de PBL después de 2 horas de cultivo. Estas se cultivaron durante 10 días adicionales en RPMI 1640 (Gibco™ Invitrogen Corporation, UK) con SFT al 10 %. Se añadieron GM-CSF 800 ng/ml (PreproTech, Londres, UK) e IL-4 40 ng/ml (PreproTech) cada tres días. El día 10, las CD se hicieron madurar durante 24 horas mediante la adición de TNF- α 50 ng/ml (PreproTech). Después de la maduración, las CD se liberaron y se pulsaron con el péptido 20 μ M en presencia de β 2-microglobulina 3 μ g/ml durante 2 horas a 26 °C.

Aislamiento de células T específicas de péptido

Se aislaron células específicas de antígeno utilizando bolas magnéticas recubiertas con sur51Y9/HLA-B35, como se describe en el ejemplo 2. Los monómeros biotinilados de HLA-B35 con sur51Y9 (obtenidos de ProImmune, Oxford, UK) se acoplaron a bolas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynabeads M-280, Dynal A/S, Oslo, Noruega), mediante incubación de 2,5 μ g de monómeros con 5×10^6 bolas en 40 μ l de PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los complejos magnéticos se lavaron tres veces en PBS, utilizando un dispositivo magnético (Dynal A/S, Oslo, Noruega) y posteriormente se mezclaron con los PBL en una proporción de 1:10 en PBS con BSA al 5 % y se rotaron muy suavemente durante 1 hora. Las células T CD8⁺ específicas del antígeno que se asociaron con los complejos magnéticos, se lavaron suavemente dos o tres veces. Las células aisladas se resuspendieron varias veces en x-vivo suplementado con suero humano al 5 % y se incubaron durante 2 horas antes de que se liberaran las bolas magnéticas y se eliminaran de la suspensión celular. Las células T CD8⁺ específicas del antígeno aisladas se utilizaron en el ensayo ELISPOT, para analizar la reactividad cruzada entre el péptido nativo y modificado.

Mapeo de clonotipo de TCR mediante electroforesis en gel en gradiente desnaturizante (DGGE).

El mapeo del clonotipo por DGGE de las regiones 1-24 de TCR BV humanas se ha descrito con detalle (66). Brevemente, se aisló el ARN utilizando el kit de Aislamiento Purescript (Gentra Systems Inc. MN) y se amplificó el ADNc transcrito mediante PCR utilizando cebadores para las regiones variables de las cadenas beta de TCR junto con un cebador común de la región constante. Se utilizó el programa de ordenador MELT87 para asegurar que las moléculas de ADN amplificadas fueran adecuadas para el análisis por DGGE, siempre que se uniera una secuencia rica en GC de 50 pb (pinza-GC) al extremo 5' del cebador de la región constante. El análisis por DGGE se hizo en geles de poliacrilamida al 6 % que contenían un gradiente de urea y formamida del 20 % al 80 %. La electroforesis se llevó a cabo a 160 V durante 4,5 horas en tampón TAE 1x a una temperatura constante de 54 °C.

Tinciones inmunohistoquímicas

Se utilizaron complejos péptido/HLA multimerizados para identificar las células T específicas del antígeno *in situ* en lesiones tumorales de pacientes de cáncer empleando el procedimiento descrito en el ejemplo 2. El monómero sur51Y9/HLA-B35 biotinilado fue suministrado por ProImmune Limited, Oxford, UK. Los monómeros biotinilados de sur51Y9/HLA-B35 se multimerizaron con moléculas de dextrano conjugadas con estreptavidina-FITC (amablemente proporcionado por L. Winther, DAKO, Glostrup, Dinamarca), para generar compuestos multivalentes HLA-dextrano para la inmunohistoquímica. Las secciones de tejido se secaron durante la noche y posteriormente se fijaron en acetona fría durante 5 minutos. Todos los pasos de incubación se llevaron a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente: (a) 45 minutos del anticuerpo primario (diluido 1:100) (b) anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Cy 3 (diluido 1:500; código 115-165-100; Jackson ImmunoResearch, obtenido en Dianova, Hamburgo, Alemania) durante 45 minutos; y finalmente (c) los multímeros durante 75 minutos. Entre cada paso, los portaobjetos se lavaron dos veces durante 10 minutos en PBS/BSA al 0,1 %. Los portaobjetos se montaron en Vectashield y se mantuvieron en la nevera hasta que se observaron con el microscopio confocal (Leica).

Resultados*Identificación de los péptidos derivados de survivina que se unen a HLA-B35*

Se rastreó la secuencia de aminoácidos de survivina para determinar los péptidos nonaméricos y decaméricos con residuos de anclaje, según el motivo de unión a péptido de HLA-B35 (67). Se seleccionaron cinco péptidos que contenían prolina como el anclaje N-terminal en la posición 2, y fenilalanina, leucina, isoleucina o tirosina como residuos de anclaje C-terminales (Tabla 3). El ensayo de ensamblaje reveló que dos péptidos, sur51-59 (EPDLAQCF, SEQ ID NO: 7) y sur46-54 (CPTENEPDL, SEQ ID NO: 6) fueron capaces de estabilizar HLA-B35 de una manera eficaz. Además, dos péptidos, sur34-43 (TPERMAEAGF, SEQ ID NO: 20) y sur6-14 (LPPAWQPF, SEQ ID NO: 18) mostraron una estabilización débil, mientras que el péptido restante no estabilizó HLA-B35 en absoluto. La concentración del péptido requerida para la recuperación semi-máxima de HLA-B35 (C₅₀) se estimó en 13 μ M para sur51-59 y 20 μ M para sur46-54. En comparación, el epítipo del control positivo C24 de EBNA3A458-466 (YPLHEQHQM, SEQ ID NO: 21) tenía un valor estimado de C₅₀ de 0,8 μ M.

Con el fin de mejorar la afinidad de unión de sur46-54 y sur51-59 el aminoácido C-terminal se sustituyó con tirosina, un residuo de anclaje mejor (67). Se analizó la recuperación de HLA-B35 mediada por los péptidos modificados en el ensayo de ensamblaje, y se estimaron los valores C₅₀ en 1,5 μ M para sur51Y9 y en 4 μ M para sur46Y9 (Fig. 7).

Respuestas inmunes espontáneas contra los epítipos de péptidos nativos.

Inicialmente, se analizaron las respuestas inmunes espontáneas de cinco pacientes a los cuatro péptidos de unión a HLA-B35 nativos, sur51-59, sur46-54, sur34-43 y sur6-14. Estos cinco pacientes tenían diferentes tumores malignos hematopoyéticos: HEM8 y HEM18 padecían MM, HEM12 padecía LF, HEM9 tenía DLBCL y LLC5 tenía LLC.

5 Se llevaron a cabo los ensayos ELISPOT de IFN- γ sobre los PBL después de 10 días de estimulación *in vitro* para detectar los CTL precursores del péptido. Se detectaron respuestas inmunes espontáneas contra dos de los péptidos nativos de unión a HLA-B35, sur51-59 y sur46-54. Dos pacientes, HEM12 y LLC5 mostraron respuesta tanto a sur51-59 como a sur46-54, mientras que HEM8 solamente mostró respuesta a sur51-59 (Figura 8A y B). No se pudo detectar respuesta alguna en los dos pacientes restantes, HEM9 y HEM18, y no se pudo detectar respuesta alguna a los péptidos de unión mala sur34-46 y sur6-14 en ninguno de los pacientes.

10 Se utilizó un planteamiento alternativo a la estimulación *in vitro* en el paciente HEM12, es decir, los PBL se cocultivaron con células dendríticas autólogas maduras pulsadas con sur51-59 para estimular una respuesta de CTL *in vitro*. Los PBL de este cultivo mostraron una fuerte reactividad hacia sur51-59 en el ELISPOT (Figura 8B).

Reconocimiento aumentado de los péptidos modificados

15 Como se ha descrito anteriormente, las modificaciones de péptidos para mejorar la afinidad a HLA-B35 produjeron una afinidad 5-10 veces más alta para HLA-B35 en relación con los péptidos nativos. Se analizó un grupo de cinco pacientes de melanoma para determinar las respuestas inmunes espontáneas tanto a los péptidos nativos como modificados, por medio del ensayo ELISPOT. Las muestras de PBL se analizaron después de la estimulación *in vitro*, mientras que las muestras de TIL se analizaron directamente. Se observaron respuestas inmunes espontáneas ya sea en los PBL o en los TIL de tres de los cinco pacientes. FM25 mostró reactividad contra sur51-59 y sur51Y9 tanto en muestras de PBL como de TIL (Fig. 9A). FM45 respondió solamente al péptido modificado sur51Y9, con una fuerte respuesta detectable en los TIL. No hubo PBL disponibles de este paciente (Fig. 9A). FM74 mostró una fuerte respuesta a sur46Y9 en TIL, pero no fue detectable respuesta alguna al péptido nativo (Fig. 9B). También se observó una respuesta débil a sur46Y9 en los PBL de FM74 (datos no mostrados).

Reactividad cruzada entre el péptido nativo y el modificado

25 La alta afinidad de sur51Y9 por HLA-B35 hace posible la producción de monómeros estables de HLA-B35 con sur51Y9. Habiéndose establecido la presencia de linfocitos T que reaccionan con survivina en los ganglios linfáticos infiltrados por el tumor y los PBL de diferentes pacientes de cáncer, se recubrieron bolas magnéticas con tales complejos HLA-B35/sur51Y9 y estos se utilizaron para aislar linfocitos T que reaccionan con el péptido de survivina a partir de PBL del paciente LLC5. Este paciente mostró una fuerte respuesta a sur51-59. Las bolas estaban fuertemente unidas a la superficie celular de las células específicas, como se visualizó mediante microscopía (datos no mostrados), permitiendo la precipitación de células específicas de antígeno mediante un campo magnético. Las células específicas de sur51Y9 aisladas respondieron fuertemente a sur51-59 (Figura 9), mientras que no se pudo detectar respuesta alguna en los PBL restantes (datos no mostrados). El aislamiento se analizó mediante el mapeo de clonotipo de TCR basado en RT-PCR/DGGE. Esta técnica permite hacer el análisis de la clonalidad de células T en poblaciones celulares complejas, incluso cuando solamente están disponibles pequeños números de células. Estos análisis mostraron que se aislaron 8 clones distintos (datos no mostrados).

Células T específicas de antígeno presentes in situ en lesiones de melanoma

40 Los monómeros sur51Y9/HLA-B35 se multimerizaron utilizando moléculas de dextrano conjugadas con estreptavidina y FITC. Los complejos de CMH multimerizados se utilizaron para teñir material congelado y fijado con acetona, empleando el procedimiento descrito en el ejemplo 2. Las células específicas de antígeno se visualizaron utilizando un microscopio láser confocal. Se analizaron secciones de melanoma primario de tres pacientes y se pudieron detectar fácilmente los CTL que reaccionan con sur51Y9/HLA-B35 *in situ*, en el microentorno tumoral en uno de los pacientes. La cotinción con un Acm contra granzima B mostró que estos CTL específicos de survivina liberaban granzima B, ejerciendo una actividad citotóxica, se utilizaron pacientes de melanoma negativos para HLA-B35 como controles (datos no mostrados).

Ejemplo 4

Identificación de nuevos epítomos de CTL derivados de survivina con diferentes perfiles de restricción a HLA-A

Sumario

50 Se caracterizaron nuevos epítomos de survivina restringidos a HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3 y HLA-A11 en base en las respuestas de CTL en pacientes de cáncer. Estos epítomos aumentan de manera significativa el número de pacientes elegibles para la inmunoterapia basada en los péptidos derivados de survivina. Además, es probable que el direccionamiento colectivo a varios elementos de restricción reduzca el riesgo de escape inmune por pérdida del alelo HLA.

Materiales y Métodos

Pacientes

Las muestras de pacientes se recibieron de la Universidad de Würzburg, Alemania, y del Hospital de la Universidad en Herlev, Dinamarca. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes antes de cualquiera de estas medidas. La tipificación del tejido se realizó en el Departamento de Inmunología Clínica, Hospital de la Universidad, Copenhague, Dinamarca. Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBL) de los pacientes de cáncer con melanoma, carcinoma de mama y leucemia linfocítica crónica (LLC), utilizando separación por Lymphoprep y se congelaron en suero fetal de ternera (SFT) con dimetilsulfóxido al 10 %. Además, se obtuvieron linfocitos T de lesiones primarias y de ganglios linfáticos infiltrados por tumor de los pacientes de melanoma. El tejido tumoral recién cortado se troceó en fragmentos pequeños y se aplastó para liberar los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) para la crioconservación.

Péptidos

Todos los péptidos se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.) y se suministraron a una pureza de >80 % verificado mediante análisis por HPLC y MS. Todos los péptidos utilizados se enumeran en la Tabla 4, en el ejemplo 5 posteriormente.

Líneas celulares

La línea celular humana T2 es un híbrido deficiente en TAP1 y TAP2 de las células B-LCL.174 y T-LCL CEM, y por tanto, solamente expresa niveles bajos de moléculas de HLA de clase I (HLA-A*0201 y HLA-B*5101) en la superficie celular. Las células T2 transfectadas con HLAA*0301 fueron amablemente proporcionadas por el Dr. A. McMicheael, IMM, Hospital John Radcliffe, Oxford. Las células T2 transfectadas con HLA-A*1101 fueron amablemente proporcionadas por el Dr. M. Masucci, MTC, Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia. La línea celular BM36.1 también es deficiente para la función TAP y tiene un fenotipo similar a T2 con una baja expresión de HLA de clase I (HLA-A*0101, HLA-B*3501) en la superficie. Las células BM36.1 fueron amablemente proporcionadas por el Dr. A. Ziegler, Universidad Humboldt, Berlín, Alemania.

Ensayo de ensamblaje para la unión de péptido a moléculas de CMH de clase I

La afinidad de unión de los péptidos sintéticos (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) a las moléculas HLA-A1, -A2, -A3 o -A11 metabólicamente marcadas con [³⁵S]-metionina, se midió en el ensayo de ensamblaje, como se ha descrito anteriormente (12). El ensayo se basa en la estabilización mediada por péptido de las moléculas de HLA vacías liberadas después de la lisis celular, de las líneas celulares deficientes en TAP. Las moléculas de HLA establemente plegadas se inmunoprecipitaron utilizando el Acm W6/32 dependiente de conformación, específico de HLA de clase I y se separaron mediante electroforesis en gel por isoelectroenfoque (IEF). Las bandas de cadena pesada del CMH se cuantificaron utilizando el programa ImageGauge PhosphorImager (FUJI photo film Co., Carrollton, TX, EE. UU.). La intensidad de la banda es proporcional a la cantidad de complejo de CMH de clase I unido al péptido recuperado durante el ensayo. Posteriormente, el nivel de la estabilización de la molécula de HLA está directamente relacionado con la afinidad de unión del péptido añadido. La concentración del péptido utilizada para analizar la recuperación de las moléculas HLA fue de 40, 4, 0,4, 0,04 µM para HLA-A1 y HLA-A11, y de 100, 10, 1, 0,1, 0,01 µM para HLA-A2 y HLA-A3. Posteriormente se calculó el valor C₅₀ para cada péptido como la concentración de péptido suficiente para una estabilización semi-máxima.

Estimulación de PBL por antígeno

Con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo ELISPOT, los PBL se estimularon una vez *in vitro* antes del análisis. El día 0, se descongelaron los PBL o ganglios linfáticos aplastados y se sembraron como 2x10⁶ células en 2 ml/pocillo en placas de 24 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en medio x-vivo (BioWhittaker, Walkersville, Maryland), suero humano inactivado por calor al 5 % y L-glutamina 2 mM en presencia de péptido 10 µM. Dos días después, se añadió a los cultivos interleuquina-2 recombinante 20 UI/ml (IL-2) (Chiron, Ratingen, Alemania). Se probó la reactividad de las células cultivadas en el ELISPOT en el día 10.

Ensayo ELISPOT

El ensayo ELISPOT se utilizó para cuantificar las células efectoras liberadoras de interferón-γ específicas del epítipo peptídico, como se ha descrito anteriormente (16). Brevemente, 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). Los pocillos se lavaron, se bloquearon con medio x-vivo y las células se añadieron en duplicados a diferentes concentraciones celulares. Luego se añadieron los péptidos a cada pocillo y las placas se incubaron durante la noche. Al día siguiente, se eliminó el medio y los pocillos se lavaron antes de añadir el anticuerpo secundario biotinilado (7-B6-1-Biotina, Mabtech). Las placas se incubaron durante 2 horas, se lavaron y se añadió a cada pocillo el conjugado avidina-fosfatasa alcalina (Calbiochem, Life Technologies, Inc. San Diego, CA, EE. UU.). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, se lavaron y se añadió el sustrato enzimático NBT/BCIP (DakoCytomation Norden A/S, Glostrup, Dinamarca) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Tras el surgimiento de manchas púrpura oscuro, se terminó la reacción lavando con agua del grifo. Las manchas se contaron utilizando el Analizador ImmunoSpot® Serie 2.0 (CTL

Analyzers, LLC, Cleveland, EE. UU.) y se pudo calcular la frecuencia de CTL específicos de péptido a partir de los números de células formadoras de manchas. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado para cada antígeno peptídico.

Resultados

5 Identificación de epítomos de survivina restringidos a HLA-A1

Unión de péptidos derivados de survivina a HLA-A1

Se rastreó la secuencia de aminoácidos de la proteína survivina para los epítomos de péptidos nonaméricos o decaméricos de HLA-A1 más probables, utilizando los principales residuos de anclaje de HLA-A1, ácido aspártico (D), ácido glutámico (E) en la posición 3 y tirosina (Y), fenilalanina (F) en el extremo C. Según esto, se sintetizaron seis péptidos derivados de survivina y se examinó su unión a HLA-A1 (Tabla 4). Adicionalmente, se incluyeron los dos péptidos sur38-46 (MAEAGFIHC) (SEQ ID NO: 23) y Sur47-56 (PTENEPDLAQ) (SEQ ID NO: 25), a pesar de que solamente contenían uno de los anclajes principales, debido a que ambos se identificaron como posibles buenos unioneros mediante el algoritmo predictivo de Rammensee y col. disponible en <http://syfpeithi.bmiheidelberg.com/>. Se estimaron los valores C_{50} para cada péptido como la concentración de péptido necesaria para la estabilización semi-máxima de HLA-A1 (Tabla 4). Sin embargo, solamente uno de estos péptidos, sur92-101 (GFEELTLGEF) (SEQ ID NO: 27) se unió con una afinidad alta casi similar a la del epítomo del control positivo conocido de la proteína del virus de la gripe A, polimerasa básica 1 (PB1) (VSDGGPNLY), como se ejemplifica en la Figura 10. Sur93-101 (FEELTLGEF) (SEQ ID NO: 24) tuvo una baja afinidad de unión a HLA-A1, mientras que ninguno de los otros péptidos analizados se unió a HLA-A1 (Tabla 4). Por consiguiente, se sintetizaron un número de péptidos análogos en los que residuos de anclaje mejores reemplazaron a los aminoácidos naturales. Se modificaron los dos péptidos Sur38-46 (MAEAGFIHC) (SEQ ID NO: 23) y Sur47-56 (PTENEPDLAQ) (SEQ ID NO: 25), introduciendo tirosina (Y) en lugar de cisteína (C) o glutamina (Q), respectivamente, en el extremo C. Ambos péptidos modificados se unieron fuertemente a HLA-A1 (Tabla 4). Adicionalmente, se sustituyeron los aminoácidos en la posición 2 con los anclajes auxiliares de treonina (T) o serina (S) en los dos péptidos Sur92-101 y Sur93-101. Estas modificaciones no tuvieron un efecto positivo en la unión de Sur92-101 a HLA-A1. En contraste, Sur93T2 (FTEELTLGEF) (SEQ ID NO: 36) se unió con una alta afinidad a HLA-A1 (Tabla 4). La Figura 10 ilustra la unión del péptido nativo de baja afinidad Sur93-101, del péptido modificado de alta afinidad Sur93T2 y del péptido que no se une Sur49-58, comparados con el epítomo del control positivo del virus de la gripe. Finalmente, se modificaron Sur14-22, Sur34-43, Sur49-58, Sur51-59, Sur92-101 y Sur93-101 con tirosina (Y) en el extremo C, sin embargo esto no mejoró la afinidad de unión a HLA-A1 para ninguno de estos péptidos (datos no mostrados).

Respuestas de CTL restringidos a HLA-A1 contra péptidos derivados de survivina en pacientes de cáncer

Se analizaron los PBL de seis pacientes de melanoma, y los TIL de tres pacientes de melanoma, para determinar la presencia de CTL específicos contra cualquiera de los cuatro péptidos de alta afinidad deducidos de survivina Sur38Y9, Sur47Y10, Sur92-101 y Sur93T2 por medio de ELISPOT. Se observó reactividad de células T contra al menos uno de los péptidos derivados de survivina en tres muestras de PBL y una muestra de TIL del total de nueve pacientes analizados. Como se ve en la Figura 11, los PBL de un paciente, Mel.A1-3, alojaron una respuesta de células T contra los cuatro péptidos, Sur38Y9, Sur47Y10, Sur92-101 y Sur93T2. Mel.A1-2 mostró respuestas contra Sur47Y10, Sur92-10 y Sur93T2, mientras que en Mel.A1-1/TIL y Mel.A1-4/PBL, se observaron respuestas contra Sur47Y10 y Sur93T2, respectivamente (Figura 11).

Además, se probó la reactividad inmune de diez pacientes de melanoma contra los péptidos nativos Sur93-101, Sur38-46 y Sur47-56, por medio de ELISPOT; sin embargo, no se detectaron respuestas específicas de péptido en ninguno de estos pacientes (datos no mostrados).

Identificación de los epítomos de survivina restringidos a HLA-A11

Unión de péptidos derivados de survivina a HLA-A11

45 Se rastreó la secuencia de aminoácidos de la proteína survivina para determinar los péptidos nonaméricos o decaméricos con motivos de unión correspondientes al de la superfamilia de HLA-A3, incluyendo HLA-A3 y HLA-A11. Se seleccionaron las secuencias de péptidos con los residuos de anclaje principales, leucina (L) en la posición 2 y lisina (K) en el extremo C, junto a las secuencias peptídicas que tuvieran aminoácidos relacionados en estas posiciones, según el algoritmo predictivo de Rammensee y colaboradores (Tabla 4).

50 Se predijeron trece péptidos a partir de la secuencia de proteína de survivina y se analizó la unión a HLA-A11 y HLA-A3. Tres de estos péptidos, Sur53-62 (DLAQCFCK) (SEQ ID NO: 47), Sur54-62 (LAQCFCK) (SEQ ID NO: 42) y Sur112-120 (KIAKETNKK) (SEQ ID NO: 44) se unieron a HLA-A11 con alta afinidad, comparable con el epítomo vírico del antígeno nuclear 4 de EBV (AVFDRKSDAK) (SEQ ID NO: 63). Además, un péptido, Sur112-121 (KIAKETNKK) (SEQ ID NO: 51) se unió débilmente a HLA-A11 (Tabla 4).

55 *Respuestas de CTL restringidos a HLA-A11 contra péptidos derivados de survivina en pacientes de cáncer*

Se probaron los PBL de cinco pacientes de melanoma y dos pacientes de LLC, para determinar la reactividad de células T contra los cuatro péptidos de unión a HLA-A11, Sur53-62, Sur54-62, Sur112-120 y Sur112-121. Se pudieron detectar respuestas contra el péptido derivado de survivina Sur53-62 en los PBL de dos de los pacientes de melanoma, Mel.A11-1, Mel.A11-2, por medio de ELISPOT (Figura 12). Adicionalmente, se pudieron detectar células T específicas de Sur53-62 entre los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) de un ganglio linfático infiltrado por tumor en el paciente Mel.A11-2 (Figura 12). En el paciente Mel.A11-1 se observó una fuerte respuesta inmune contra el péptido de survivina Sur53-62 en cinco muestras diferentes de sangre tomadas durante un período de 2 años (datos no mostrados).

Identificación de los epítomos de survivina restringidos a HLA-A3

10 *Unión de péptidos derivados de survivina a HLA-A3*

Los péptidos derivados de survivina predichos para la unión a la superfamilia de HLA-A3 se analizaron adicionalmente para determinar la unión a HLA-A3. Solamente dos de los péptidos, Sur112-120 (KIAKETNNK) (SEQ ID NO: 44) y Sur112-121 (KIAKETNNKK) (SEQ ID NO: 57) se unieron a HLA-A3 con alta afinidad, similar a la del epítipo vírico, la nucleoproteína del virus de la gripe A 265-273 (ILRGSVAHK) (SEQ ID NO: 74) (Tabla 4). Además, dos péptidos, Sur53-62 (DLAQCFCK) (SEQ ID NO: 47) y Sur95-103 (ELTLGEFLK) (SEQ ID NO: 43), se unieron débilmente a HLA-A3.

Algunos de los péptidos sin unión detectable se modificaron en un intento por aumentar la afinidad de unión a HLA-A3. Por tanto, se sintetizaron dos péptidos análogos de Sur54-62 y Sur113-122, en los que un mejor residuo de anclaje, leucina (L), reemplazó a la alanina natural (A) en la posición 2. Sur54L2 (LLQCFFCFK) (SEQ ID NO: 56) se unió a HLA-A3 con alta afinidad, mientras que Sur113L2 (ILKETNNKKK) (SEQ ID NO: 59) solo se unió débilmente (Tabla 4). Además, se sintetizaron cuatro péptidos análogos de Sur5-13, Sur13-22, Sur18-27 y Sur53-61, en donde el residuo de anclaje mejor lisina (K) reemplazó a la fenilalanina natural (F) en el extremo C. Sur5K9 (TLPPAWQPK) (SEQ ID NO: 54) y Sur18K10 (RISTFKNWPK) (SEQ ID NO: 58) se unieron a HLA-A3 con alta afinidad, mientras que las sustituciones no tuvieron un efecto detectable sobre la unión a HLA-A3 de Sur13K9 (FLKDHRISTK) (SEQ ID NO: 57) y Sur53K9 (DLAQCFCK) (SEQ ID NO: 55), comparados con los análogos nativos.

Respuestas de CTL restringidos a HLA-A3 contra péptidos derivados de survivina en pacientes de cáncer

Se analizaron nueve muestras de pacientes de melanoma (cinco de PBL y cuatro de TIL) para determinar la reactividad inmune contra los dos péptidos nativos de unión a HLA-A3 de alta afinidad Sur112-120 y Sur112-121, así como contra los dos péptidos nativos de unión débil Sur53-62 y Sur95-103. Sin embargo, no se pudieron detectar respuestas inmunes contra estos péptidos mediante ELISPOT en ninguno de los pacientes. Posteriormente, los mismos pacientes se analizaron para determinar la reactividad inmune espontánea contra los tres péptidos modificados derivados de survivina, de alta afinidad, Sur5K9, Sur18K10 y Sur54L2. Se detectó reactividad de CTL contra Sur18K10 en muestras de TIL de tres pacientes, Mel.A3-1, Mel.A3-2, Mel.A3-3 (Figura 13). No se detectaron respuestas contra los otros dos péptidos, Sur5K9 y Sur54L2. Con el fin de verificar adicionalmente estas respuestas, se analizaron PBL de dieciocho pacientes adicionales de melanoma para determinar la reactividad de CTL contra Sur18K10. Entre estos, se encontraron tres pacientes que respondieron, Mel.A3-4, Mel.A3-5 y Mel.A3-6, produciendo un total de seis pacientes que respondieron, entre los veintisiete pacientes analizados (Figura 13).

Identificación de un epítipo nuevo de survivina restringido a HLA-A2

Unión de péptidos 11-meros derivados de survivina a HLA-A2

Se rastreó la secuencia de aminoácidos de la proteína survivina para detectar los epítomos peptídicos 11-meros de HLA-A2 más probables, utilizando los principales residuos de anclaje específicos de HLA-A2. Se sintetizaron seis péptidos deducidos de survivina, y se examinó su unión a HLA-A2. Ninguno de los péptidos examinados se unió con alta afinidad similar a la de un epítipo del control positivo conocido del péptido BMLF₂₈₀₋₂₈₈ del virus Epstein-Barr (GLCTLVAML) (SEQ ID NO: 72) (Tabla 4). La concentración de péptido requerida para la recuperación semi-máxima de HLA-A2 (valor C_{50}) fue de 0,9 μ M para el control positivo. En comparación, los péptidos Sur18-28 (RISTFKNWPFL) (SEQ ID NO: 67) y Sur86-96 (FLSVKKQFEEL) (SEQ ID NO: 69), se unieron débilmente a HLA-A2 (C_{50} = 69 μ M y 72 μ M, respectivamente). Sin embargo, los dos epítomos de survivina restringidos a HLA-A2 conocidos se unieron de manera similar débilmente a HLA-A2; Sur95-104 (ELTLGEFLKL) (SEQ ID NO: 43) se unió con una afinidad intermedia (C_{50} = 10 μ M), mientras que Sur96-104 (LTLGEFLKL) (SEQ ID NO: 10) se unió sólo débilmente (C_{50} >100 μ M). Los cuatro péptidos 11-meros restantes examinados (Sur4-14 (PTLPPAWQPFL) (SEQ ID NO: 66), Sur54-64 (LAQCFFCFKEL) (SEQ ID NO: 68), Sur88-98 (SVKKQFEELTL) (SEQ ID NO: 70), y Sur103-113 (KLDREKAKNKI) (SEQ ID NO: 74)), no se unieron a HLA-A2.

Respuestas de CTL restringidos a HLA-A2 contra péptidos derivados de survivina en pacientes de cáncer

Los PBL de diez pacientes de cáncer (dos pacientes de melanoma (Mel), seis de LLC (LLC), y dos de carcinoma de mama (CM)), se analizaron inicialmente para investigar si los dos péptidos 11-meros de unión débil, Sur18-28 y Sur86-96, eran presentados por HLA-A2 y reconocidos por el sistema inmune de los pacientes con cáncer. Se encontraron respuestas de CTL contra Sur18-28 en PBL de dos de los diez pacientes analizados (LLC-1, LLC-2,

figura 14), mientras que no se pudieron detectar respuestas contra Sur86-96 (datos no mostrados). Con el fin de verificar adicionalmente estas respuestas específicas de Sur18-28, se analizaron PBL de doce pacientes adicionales (siete pacientes de melanoma, uno de LLC y cuatro de carcinoma de mama) para determinar la reactividad de CTL contra este péptido. Entre estos, cuatro pacientes (LLC-3, CM-1, CM-2, Mel.A2-1) tenían una actividad inmune específica de Sur18-28 detectable mediante ELISPOT (Figura 14). Por consiguiente, en conjunto, los PBL de seis de veintidós pacientes analizados, alojaban una respuesta de CTL contra Sur18-28.

Identificación de epítomos de survivina restringidos a HLA-B7

Unión de péptidos derivados de survivina a HLA-B7

Se rastreó la secuencia de aminoácidos de la proteína survivina para determinar los péptidos de nueve a diez aminoácidos, con residuos de anclaje según el motivo de unión de péptido a HLA-B7. Se seleccionaron cinco péptidos y se analizó su capacidad para estabilizar HLA-B7 en el ensayo de ensamblaje. Se estimaron los valores C₅₀ para cada péptido como la concentración de péptido necesaria para la estabilización semi-máxima de HLA-B7 (Tabla 4). Dos péptidos derivados de survivina, sur6-14 (LPPAWQPFL) (SEQ ID NO: 18) y sur11-19 (QPFLKDHRI) (SEQ ID NO: 19) estabilizaron HLA-B7 débilmente, con valores C₅₀ por encima de 100 µM; mientras que sur46-54 (CPTENEPDL) (SEQ ID NO: 6), sur51-59 (EPDLAQCF) (SEQ ID NO: 7), y sur34-43 (TPERMAEAGF) (SEQ ID NO: 20), no se unieron a HLA-B7 (Tabla 4).

Respuestas de CTL restringidos a HLA-B7 contra péptidos derivados de survivina en pacientes de cáncer

Se probaron PBL positivos para HLA-B7 de cinco pacientes de melanoma (mel25, mel26, mel3, mel6, mel39), dos pacientes de LLC (LLC1, LLC54) y dos pacientes de cáncer de mama (mama11, mama15), para determinar la reactividad de células T contra los péptidos de unión débil a HLA-B7, sur6-14 (LPPAWQPFL) (SEQ ID NO: 18) y sur11-19 (QPFLKDHRI) (SEQ ID NO: 19). Se pudo detectar una fuerte respuesta espontánea de CTL contra el péptido derivado de survivina sur6-14 en PBL de un paciente de LLC y en un paciente de cáncer de mama (Figura 15). Adicionalmente, se pudo detectar una débil respuesta contra este péptido en el paciente de melanoma mel3 (Figura 15).

Sumario de las respuestas inmunes restringidas al alelo de HLA a péptidos derivados de survivina en pacientes de cáncer

Se probó la unión de una gama de péptidos derivados de survivina que comprendían de 9 a 11 residuos de aminoácidos, a los siguientes alelos de HLA: HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, y HLA-B7, utilizando el ensayo de ensamblaje para la unión del péptido a las moléculas de CMH de clase I descritas en los ejemplos anteriores. Además, se probó la capacidad de varios de los péptidos para provocar una respuesta inmune de CTL utilizando el ensayo ELISPOT, también como se describe en lo anterior.

En la siguiente Tabla 4, se da un sumario de los resultados, incluyendo los resultados obtenidos en los ejemplos anteriores:

Tabla 4. Datos de C₅₀ y ELISPOT para péptidos derivados de survivina seleccionados

35

Alelo HLA	Longitud del péptido	Posición	Secuencia	C ₅₀ (µM)	Comentarios	SEQ ID NO:	Notas
HLA-1	9mero	Sur14-22	LKDHRISTF	NB		22	
		Sur51-59	EPDLAQCF	NB		7	
		Sur38-46	MAEAGFIHC	NB		23	
		Sur93-101	FEELTLGEF	>100		24	
	10mero	Sur34-43	TPERMAEAGF	NB		20	
		Sur47-56	PTENEPDLAQ	NB		25	
		Sur49-58	ENEPDLAQCF	NB		26	
		Sur92-101	QFEELTLGEF	2		27	
		Péptido control	C1	VSDGGPNLY	0,8		28
	Péptidos	Sur14Y9	LKDHRISTY	NB		29	

ES 2 529 203 T3

	modificados						
		sur51Y9	EPDLAQCFY		Unión débil	9	
		sur93Y9	FEELTLGEY	NB		30	
		sur92Y9	QFEELTLGEY	NB		31	
		sur34Y9	TPERMAEAGY	NB		32	
		sur49Y9	ENEPDLAQCY	NB		33	
		Sur92T2	QTEELTLGEF	2		34	
		Sur92S2	QSEELTLGEF	100		35	
		Sur93T2	FTELTLGEF	1		36	
		Sur93S2	FSELTLGEF	30		37	
		Sur38Y9	MAEAGFIHY	0,8		38	
		Sur47Y10	PTENEPDLAY	0,4		39	
HLA-A2		Sur4-14	PTLPPAWQPFL	NB		66	
		Sur18-28	RISTFKNWPFL	69		67	
		Sur54-64	LAQCFFCFKEL	NB		68	
		Sur86-96	FLSVKKQFEEL	72		69	
		Sur88-98	SVKKQFEELTL	NB		70	
		Sur103-113	KLDRERAKNKI	NB		71	
	Péptido control	EBV,BMLF1	GLCTLVAML	3		72	
		VIH, Pol	ILKEPVHGV	0,2		73	
HLA-A3	9mero	Sur5-13	TLPPAWQPF	NB		40	
		Sur53-61	DLAQCFFCF	NB		41	
		Sur54-62	LAQCFFCFK	NB		42	
		Sur95-103	ELTLGEFLK	>100		43	
		Sur112-120	KIAKETNNK	2		44	i
	10mero	Sur13-22	FLKDHRISTF	NB		45	
		Sur18-27	RISTFKNWP	NB		46	
		Sur53-62	DLAQCFFCFK	100		47	ii
		Sur84-93	CAFLSVKKQF	NB		48	
		Sur101-110	FLKLDREKAK	NB		49	
		Sur103-112	KLDRERAKNK	NB		50	
		Sur112-121	KIAKETNNKK	1		51	
		Sur113-122	IAKETNNKKK	NB		52	
	Péptido control	C3	ILRGVAHK	0,1-0,3		53	
	Péptidos modificados	Sur5K9	TLPPAWQPK	2		54	

ES 2 529 203 T3

		Sur53K9	DLAQFFCK	NB		55	
		Sur54L2	LLQCFFCFK	1		56	
		Sur13K9	FLKDHRISTK	NB		57	
		Sur18K10	RISTFKNWPK	0,02		58	
		Sur113L2	ILKETNNKKK	>100		59	
		SurEx3-A3-1	TIRRKNLRK	0,5		60	iii
		SurEx3-A3-2	PTIRRKNLRK	NB		61	
		Sur2b-A3-1	RITREEHKK	NB		62	
	Péptido control	Gripe nucleoproteína 265-273	A ₁ ILRGSVAHK	0,1		74	
HLA-A11	9mero	Sur5-13	TLPPAWQPF	NB		40	
		Sur53-61	DLAQFFCF	NB		41	
		Sur54-62	LAQCFFCFK	0,4		42	
		Sur95-103	ELTLGEFLK	NB		43	
		Sur112-120	KIAKETNNK	1		44	
	10mero	Sur13-22	FLKDHRISTF	NB		45	
		Sur18-27	RISTFKNWPF	NB		46	
		Sur53-62	DLAQFFCFK	5		47	
		Sur84-93	CAFLSVKKQF	NB		48	
		Sur101-110	FLKLDREKAK	NB		49	
		Sur103-112	KLDREKAKNK	NB		50	
		Sur112-121	KIAKETNNKK	>100		51	iv
		Sur113-122	IAKETNNKKK	NB		52	
	Péptido control	C4	AVFDRKSDAK	0,2		63	
HLA-B7	9mero	Sur6-14	LPPAWQPFL	>100		18	v
		Sur11-19	QPFLKDHRI	>100		19	
		Sur46-54	CPTENEPDL	NB		6	
		Sur51-59	EPDLAQCF	NB		7	
	10mero	Sur34-43	TPERMAEAGF	NB		20	
	Péptidos control	C6	QPRAPIRPI	0,1		64	
		C7	RPPIFIRRL	0,5		65	

ⁱ Se observó una respuesta contra el péptido Sur112-120 en un paciente de linfoma (HEM34) por medio de ELISPOT. ⁱⁱ Se detectaron respuestas contra el péptido Sur53-62 en tres pacientes de linfoma (HEM9, 11, 34) por medio de ELISPOT. ^{iv} Se observó una respuesta débil en un paciente de melanoma (FM-TIL95) por medio de ELISPOT. ^{vii} Se observó una respuesta contra Sur112-121 en un paciente de melanoma (PM6), más evidente en suspensión de ganglio linfático metastásico, y más débil en los TIL del tumor primario y los PBL por medio de ELISPOT.

5

^{viii} Se observó una respuesta contra el péptido Sur6-14 en un paciente de LLC (LLC9) y se observó una respuesta

más débil en un paciente de linfoma por medio de ELISPOT (HEM21) (datos no mostrados).

Ejemplo 5

Procedimientos de ensayo terapéutico utilizando péptidos derivados de survivina como inmunógenos

Sumario

- 5 Se vacunaron cinco pacientes de melanoma en fase IV que habían sido previamente muy tratados, con el epítipo de survivina restringido a HLA-A2 modificado, es decir, el péptido sur1M2, presentado por células dendríticas autólogas en un marco de uso compasivo. Cuatro de los pacientes produjeron una respuesta fuerte de células T a este epítipo, medido mediante el ensayo ELISPOT. Además, la tinción *in situ* con multímero péptido/HLA-A2 reveló la infiltración de células que reaccionaban con survivina tanto en las metástasis viscerales como en las de tejido blando.
- 10 Notoriamente, no se observó toxicidad asociada con la vacunación. Los datos demuestran que es factible inducir una respuesta de células T contra survivina incluso en pacientes de melanoma en fase tardía, y que estas vacunaciones se toleran bien.

Materiales y Métodos

Criterios de elegibilidad de pacientes y pauta de tratamiento

- 15 Todos los procedimientos clínicos estuvieron de acuerdo con la Declaración de Helsinki y todos los pacientes proporcionaron el consentimiento informado antes de la terapia. Los pacientes de melanoma cutáneo o uveal en fase IV fueron elegibles cuando su enfermedad era progresiva a pesar de al menos dos ciclos de quimio-, inmuno-, o quimioinmuno-terapia diferentes. Además, los pacientes debían tener 18 años de edad o más, expresar HLA-A*0201 y padecer una enfermedad medible validada mediante exploraciones de tomografía computarizada craneal, torácica y abdominal. El índice de Karnofsky de los pacientes tenía que ser del 60 % o mejor. No se permitió quimio- y/o inmunoterapia sistémica en las 4 semanas antes de la vacunación. Los criterios de exclusión importantes fueron la evidencia de metástasis al SNC, enfermedades autoinmunes o infecciosas activas, embarazo y lactancia, así como anomalía psiquiátrica significativa. Se generaron células dendríticas pulsadas con péptidos como se ha descrito anteriormente (82). Brevemente, se aislaron PBMC por leucaféresis con Lymphoprep™ (Mycomed Pharma), se congelaron en alícuotas y se almacenaron en nitrógeno líquido. Una semana antes de la vacunación, las PBMC se descongelaron, se lavaron y se cultivaron en un medio que contenía gentamicina, glutamina y plasma autólogo inactivado por calor. Los días 1 y 5, se añadieron IL-4 y GM-CSF. Con el fin de diferenciar CD maduras, se añadieron TNF- γ y prostaglandina E2 el día 6. El día 7, las células que exhibían características fenotípicas y morfológicas de CD maduras, es decir, apariencia en velo y expresión de CD83 = 75 %, se pulsaron con un epítipo modificado derivado de survivina restringido a HLA-A2 de survivina₉₆₋₁₀₄, LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 10) (Clinalfa, Suiza) 14. Las células solamente se utilizaron para la vacunación si las pruebas microbiológicas de las muestras tomadas de los cultivos los días 1 y 5 demostraron que eran estériles.

- Los pacientes se vacunaron a intervalos de 7 días para las dos primeras vacunaciones, seguidos por intervalos de 28 días para las vacunaciones adicionales. Se resuspendieron un total de 10-20x10⁶ CD maduras, pulsadas con survivina₉₆₋₁₀₄ en PBS, que contenía seroalbúmina humana al 1 % y se inyectaron por vía intradérmica en alícuotas de 1,5x10⁶ CD por sitio de inyección en las regiones ventromediales de los muslos cerca de los ganglios linfáticos regionales. Se excluyeron los miembros donde se hubieran eliminado y/o irradiado los ganglios linfáticos de drenaje. Se repitió la leucaféresis después de 5 vacunaciones en ausencia de un deterioro grave del estado de salud del paciente o de la aparición de metástasis en el SNC.

Medida de las respuestas clínicas e inmunológicas

- Se llevaron a cabo exploraciones por TAC antes de la vacunación y cada tres meses posteriormente o en el caso de signos clínicos graves de evolución de la enfermedad. Las respuestas inmunológicas se siguieron mediante el ensayo ELISPOT, utilizando las PBMC obtenidas cada tres meses, para detectar la liberación de IFN- γ específico de survivina₉₆₋₁₀₄. Con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo ELISPOT, las PBMC se estimularon una vez *in vitro* a una concentración de 1x10⁶ células por ml en placas de 24 pocillos (Nunc, Dinamarca) en medio x-vivo (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland), suplementado con suero humano inactivado por calor al 5 % y L-glutamina 2 mM en presencia de péptido 10 μ M. Dos días después, se añadió interleuquina-2 recombinante (IL-2) 40 UI/ml (Chiron, Ratingen, Alemania). Después de 10 días se probó la reactividad de las células. Para este fin, se recubrieron placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (MultiScreen MAIP N45, Millipore, Glostrup, Dinamarca) con un anticuerpo anti-IFN- γ (1-D1K, Mabtech, Suecia). Se añadieron linfocitos a 10⁴-10⁵ células en 200 μ l de medio x-vivo por pocillo junto con 10⁴ células T2 y los péptidos relevantes a una concentración final de 2 μ M. Después de una incubación durante la noche a 37 °C y de dos lavados, se añadió el anticuerpo de detección biotinilado (7-B6-1-Biotina, Mabtech, Suecia); su unión específica se visualizó utilizando fosfatasa alcalina-avidina junto con el sustrato respectivo (GibcoBRL). La reacción se terminó tras la aparición de manchas púrpura oscuro, que se cuantificaron utilizando el Sistema AlphaMager (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EE. UU.).

También se siguieron *in situ* los linfocitos T CD8+ que reaccionan con survivina₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201, tanto en los sitios de vacunación como en las metástasis viscerales, de tejido blando o cutáneas, por medio de complejos multiméricos

survivina₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201. Los sitios de vacunación se cortaron 24 horas después de la inyección intradérmica en todos los pacientes, mientras que las lesiones metastásicas solamente se retiraron en pacientes seleccionados, si eran fácilmente accesibles (pacientes KN y GB) o se retiraron durante un intento curativo (paciente WW). El procedimiento de tinción para los complejos multiméricos péptido/CMH se ha descrito recientemente (68). Los complejos multiméricos survivina₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201 se generaron mediante la introducción de un sitio de reconocimiento para la biotinylación enzimática en el extremo 5' de los dominios extracelulares de HLA-A*0201 (residuos 1-275). La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G25, Pharmacia, Erlangen, Alemania) y de intercambio iónico (mono-Q, Pharmacia) y se plegó *in vitro* mediante dilución en presencia de los péptidos respectivos y β 2-microglobulina. Después de la filtración en gel en una columna de Sephadex G25, la proteína se multimerizó con estreptavidina-FITC conjugada con moléculas de dextrano (amablemente proporcionadas por L. Winther, DAKO, Copenhague, Dinamarca) para generar complejos multivalentes HLA-dextrano. Las secciones crioconservadas de las muestras respectivas se secaron durante la noche y posteriormente se fijaron en acetona fría durante 5 minutos. Todos los pasos de incubación se llevaron a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente como sigue: (i) 45 minutos de un anticuerpo anti-CD8 (1:100, clon HIT8a, Pharmingen, San Diego, CA), (ii) anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Cy 3 (diluido 1:500; código 115-165-100, Dianova, Hamburgo, Alemania) durante 45 minutos, y finalmente (iii) los multímeros durante 75 minutos. Entre cada paso los portaobjetos se lavaron dos veces durante 10 minutos en PBS/BSA al 0,1%. Finalmente, los portaobjetos se montaron en Vectashield y se observaron con un Microscopio Confocal Leica (TCS 4D, Leica, Mannheim, Alemania).

20 Resultados

Características de los pacientes, toxicidad y evolución clínica

Se inscribieron cinco pacientes de melanoma en fase IV muy avanzada, dos que padecían melanoma uveal, uno melanoma de tejido blando y los dos restantes melanoma cutáneo. Debido a la manifestación de metástasis cerebrales sintomáticas un paciente se retiró de la terapia después de solo dos vacunaciones. Los otros cuatro pacientes recibieron hasta 15 vacunaciones. Un paciente murió de paro cardíaco en un estado libre de tumor después de la resección quirúrgica de las metástasis restantes. Otro paciente se retiró de la terapia después de 10 vacunaciones debido a la aparición de metástasis viscerales (RW). Un paciente permaneció en el estudio después de 15 vacunaciones. Las características detalladas de los pacientes, la terapia previa, el número de vacunaciones y el estado de supervivencia, se sumario en la Tabla 5.

No se presentaron toxicidades importantes. Por tanto, la hemoglobina, leucocitos y trombocitos, así como lactato-deshidrogenasa, creatinina y colinesterasa, no estuvieron influenciados por la terapia de vacunación (Fig. 16). No se observaron signos de toxicidad sistémica o local en los sitios de inyección. Además, no hubo detección de deterioro en la cicatrización, trastornos hemorrágicos, disfunción cardíaca, vasculitis o enfermedad inflamatoria del intestino. En un paciente (WW), se pudieron estabilizar las metástasis de hígado previamente existentes con la terapia de vacunación, pero aún se presentó una nueva metástasis suprarrenal. Desafortunadamente, este paciente murió debido a paro cardíaco, incluso aunque estaba libre del tumor después de la cirugía curativa. Se detectó una metástasis de cerebro en el paciente PB solo cuatro semanas después de iniciarse la vacunación. Por consiguiente, este paciente se tuvo que excluir de vacunaciones adicionales después de solamente dos inyecciones con CD. Los otros tres pacientes demostraron una evolución lenta de la enfermedad metastásica sin un deterioro sustancial en su estado general de salud. Notoriamente, para el paciente KN se pudo alcanzar una supervivencia global de 13 meses (desde el inicio de la vacunación hasta el fallecimiento) a pesar de una pesada carga metastásica y una rápida evolución de la enfermedad al principio de la vacunación. El paciente GB permaneció en el protocolo 14 meses después de iniciarse la vacunación con CD pulsadas con el péptido de survivina. Sin embargo, se debe observar que ambos pacientes (RW y GB) recibieron un tratamiento localizado adicional para el control del tumor, ya sea radiación de tumores subcutáneos (RW) o quimioterapia local (GB).

Respuestas de células T CD8+ específicas de survivina

Con el fin de seguir la cinética de las respuestas de células T citotóxicas, se probaron PBMC obtenidas antes de y tres meses después de la vacunación para determinar su reactividad al epítipo modificado de survivina₉₆₋₁₀₄ mediante ELISPOT para IFN- γ . Antes del análisis, las PBMC se estimularon una vez *in vitro* para aumentar la sensibilidad de este ensayo. En los cuatro pacientes ensayados, fue evidente una inducción de células T reactivas con survivina₉₆₋₁₀₄ (Fig. 17). El análisis de la reactividad a otros péptidos de survivina restringidos a HLA-A*0201, es decir, survivina₉₆₋₁₀₄ no modificado y el epítipo adyacente Sur9, demostró una respuesta de células T contra estos péptidos en dos de los pacientes (KN y RW) (datos no mostrados).

Se ha cuestionado repetidamente el valor pronóstico y clínico de las mediciones de las respuestas de células T específicas de tumor en sangre periférica; por lo tanto, también se probó la presencia de linfocitos T CD8+ reactivos con survivina₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201 entre los linfocitos infiltrantes de tumor *in situ*, mediante tinción con multímero péptido/CMH. Con el fin de validar el método, primero se analizaron muestras de tejido de reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado que se presentaron en el sitio de la vacunación en 24 horas. Este análisis confirmó las observaciones anteriores de que las inyecciones intradérmicas de CD pulsadas con péptido inducen un fuerte infiltrado de células T inflamatorias específicas del péptido. Posteriormente, se aplicó el procedimiento de

tinción con multímero péptido/CMH en metástasis de tejido blando y viscerales, que reveló la presencia de células reactivas con survivina₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201 entre el infiltrado de CD8+. Esta observación sugiere que la vacunación no solo induce células T con la especificidad deseada, sino que también las dota con la capacidad necesaria de migración dirigida.

Tabla 5. Sumario de ensayos de vacunación: características de los pacientes

Paciente	Edad/sexo	Tiempo desde el tumor primario a fase IV	Terapia previa	Enfermedad medible	Desenlace clínico	No. de vacunaciones	Supervivencia tras la primera vacunación*
GB	40/mujer	4 años, 8 meses	LITT, fotemusina/IL-2IFN α , treosulfano/gemcitabina	hígado	PD (crecimiento lento de lesiones hepáticas previas y nuevas, nuevas metástasis a páncreas y pleurales)	15	+ 14 meses
KN	53/hombre	11 años	IL-2IFN α /histamina, fotemustina, treosulfano/gemcitabina	hígado, riñón, tejido blando, hueso	PD (crecimiento lento de lesiones previas, nuevas lesiones en ganglios linfáticos, pleurales y mediastinales)	13	13 meses
WW	73/hombre	14 meses	cirugía, vacunación con CD, decarbazina	hígado	PD (metástasis hepática estable, pero suprarrenales nuevas)	12	12 meses debido a embolia posquirúrgica
RW	72/hombre	16 años	cirugía, radioterapia, adriblastina/fosfamida, ixoteno, decarbazina, TNF/melfalán	tejido blando	PD (crecimiento de metástasis anteriores y nuevas en tejido blando; detección de metástasis de corazón, pulmón y músculo tras 12 vacunaciones)	12	+ 12 meses
PB	52/hombre	2 años, 3 meses	radioterapia	pulmón, riñón	PD (nuevas metástasis de piel y cerebro)	2	4 meses

Referencias

1. Van den Eynde, B. J. y Boon, T. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int.J.Clin.Lab.Res.*, 27: 81-86, 1997.
- 5 2. Rosenberg, S. A. Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. *J.Natl.Cancer Inst.*, 20; 88: 1635-1644, 1996.
3. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der Bruggen, P., y Boon, T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene
10 MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int.J.Cancer*, 80: 219-230, 1999.
4. Brossart, P., Stuhler, G., Flad, T., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., Kanz, L., y Brugger, W. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.*, 58: 732-736, 1998.
- 15 5. Brossart, P., Heinrich, K. S., Stuhler, G., Behnke, L., Reichardt, V. L., Stevanovic, S., Muhm, A., Rammensee, H. G., Kanz, L., y Brugger, W. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood*, 93: 4309-4317, 1999.
6. Vonderheide, R. H., Hahn, W. C., Schultze, J. L., y Nadler, L. M. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.*, 10: 673-679, 1999.
7. LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., y MacKenzie, A. E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their
20 emerging role in cancer. *Oncogene*, 17: 3247-3259, 1998.
8. Altieri, D. C., Marchisio, P. C., y Marchisio, C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest*, 79: 1327-1333, 1999.
9. Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G., y Altieri, D. C. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J.Biol.Chem.*, 273: 11177-11182, 1998.
- 25 10. Grossman, D., McNiff, J. M., Li, F., y Altieri, D. C. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J.Invest Dermatol.*, 113: 1076-1081, 1999.
11. Grossman, D., McNiff, J. M., Li, F., y Altieri, D. C. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab Invest*, 79: 1121-1126, 1999.
- 30 12. Andersen, M. H., Sondergaard, I., Zeuthen, J., Elliott, T., y Haurum, J. S. An assay for peptide binding to HLA-Cw*0102. *Tissue Antigens*, 54: 185-190, 1999.
13. Andersen, M. H., Bonfill, J. E., Neisig, A., Arsequell, G., ndergaard, I., Neefjes, J., Zeuthen, J., Elliott, T., y Haurum, J. S. Phosphorylated Peptides Can Be Transported by TAP Molecules, Presented by Class I MHC Molecules, and Recognized by Phosphopeptide-Specific CTL. *J.Immunol.*, 163: 3812-3818, 1999.
- 35 14. McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M., Doan, S., Hsiao, L., Calabresi, P., Ha, T., Tran, T. V., Tate, K. M., Winkelhake, J., y Spack, E. G. A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J.Immunol.Methods*, 210: 149-166, 1997.
15. Pass, H. A., Schwarz, S. L., Wunderlich, J. R., y Rosenberg, S. A. Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay. *Cancer J.Sci.Am.*, 4: 316-323, 1998.
- 40 16. Berke, Z., Andersen, M. H., Pedersen, M., Fugger, L., Zeuthen, J., y Haurum, J. S. Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules. *Leukemia*, 14: 419-426, 2000.
17. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., y Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351: 290-296, 1991.
- 45 18. Cornelison, T. L. Human papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment. *Curr.Opin.Oncol.*, 12: 466-473, 2000.
19. Lee, S. P., Chan, A. T., Cheung, S. T., Thomas, W. A., CroomCarter, D., Dawson, C. W., Tsai, C. H., Leung, S. F., Johnson, P. J., y Huang, D. P. CTL control of EBV in nasopharyngeal carcinoma (NPC): EBV-specific CTL responses in the blood and tumors of NPC patients and the antigen-processing function of the tumor cells. *J.Immunol.*, 165: 573-582, 2000.

20. Swana, H. S., Grossman, D., Anthony, J. N., Weiss, R. M., y Altieri, D. C. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N.Engl.J.Med.*, 341: 452-453, 1999.
21. Salgaller, M. L., Afshar, A., Marincola, F. M., Rivoltini, L., Kawakami, Y., y Rosenberg, S. A. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by peripheral blood lymphocytes stimulated in vitro with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 55: 4972-4979, 1995.
22. Salgaller, M. L., Marincola, F. M., Cormier, J. N., y Rosenberg, S. A. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 56: 4749-4757, 1996.
23. Valmori, D., Fonteneau, J. F., Lizana, C. M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C., y Romero, P. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J.Immunol.*, 160: 1750-1758, 1998.
24. Pardoll, D. M. Cancer vaccines. *Nat.Med.*, 4: 525-531, 1998.
25. Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zoller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Muller, C. A., Becker, V., Gross, A. J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Muller, G. A., y Ringert, R. H. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat.Med.*, 6: 332-336, 2000.
26. Becker, J. C., Guldberg, P., Zeuthen, J., Bröcker, E. B., y thor Straten, P. Accumulation of identical T cells in melanoma and vitiligo-like leukoderma. *J.Invest.Dermatol.*, 113: 1033-1038, 1999.
27. Rohayem, J., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Oehmichen, A., Schmitz, M., Mehlhorn, J., Conrad, K., y Rieber, E. P. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.* 1. Abr.2000; 60.(7.): 1815.-7., 60: 1815-1817.
28. Adida, C., Haioun, C., Gaulard, P., Lepage, E., Morel, P., Briere, J., Dombret, H., Reyes, F., Diebold, J., Gisselbrecht, C., Salles, G., Altieri, D. C., y Molina, T. J. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, 96: 1921-1925, 2000.
29. Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y., y Nakagawara, A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*, 19: 617-623, 2000.
30. Kawasaki, H., Altieri, D. C., Lu, C. D., Toyoda, M., Tenjo, T., y Tanigawa, N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58: 5071-5074, 1998.
31. Schmitz, M., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Schmachtenberg, F., Stevanovic, S., Ockert, D., Rammensee, H. G., y Rieber, E. P. Generation of survivin-specific CD8+ T_effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.*, 60: 4845-4849, 2000.
32. Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Becker, J. C., y thor Straten, P. Identification of a Cytotoxic T Lymphocyte Response to the Apoptose Inhibitor Protein Survivin in Cancer Patients. *Cancer Res.*, 61: 869-872, 2001.
33. Lee, K. H., Panelli, M. C., Kim, C. J., Riker, A. I., Bettinotti, M. P., Roden, M. M., Fetsch, P., Abati, A., Rosenberg, S. A., y Marincola, F. M. Functional dissociation between local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination. *J.Immunol.*, 161: 4183-4194, 1998.
34. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J. R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., y White, D. E. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat.Med.*, 4: 321-327, 1998.
35. Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J. R., Barouch, D. H., McHeyzer Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., y Davis, M. M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 274: 94-96, 1996.
36. Schrama, D., Andersen, M. H., Terheyden, P., Schroder, L., Pedersen, L. O., thor Straten, P., y Becker, J. C. Oligoclonal T-Cell Receptor Usage Of Melanocyte Differentiation Antigen-reactive T Cells in Stage IV Melanoma Patients. *Cancer Res.*, 61: 493-496, 2001.
37. Luxembourg, A. T., Borrow, P., Teyton, L., Brunmark, A. B., Peterson, P. A., y Jackson, M. R. Biomagnetic isolation of antigen-specific CD8+ T cells usable in immunotherapy. *Nat.Biotechnol.*, 16: 281-285, 1998.
38. Kirkin, A. F., Reichert Petersen, T., Olsen, A. C., Li, L., thor Straten, P., y Zeuthen, J. Generation of human-melanoma specific T lymphocyte clones defining novel cytolytic targets with panels of newly established melanoma cell lines. *Cancer Immunol.Immunother.*, 41: 71-81, 1995.

39. Scheibenbogen, C., Lee, K. H., Mayer, S., Stevanovic, S., Moebius, U., Herr, W., Rammensee, H. G., y Keilholz, U. A sensitive ELISPOT assay for detection of CD8+ T lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza proteins in the blood of healthy donors and melanoma patients. *Clin.Cancer Res.*, 3: 221-226, 1997.
- 5 40. Straten, P., Guldberg, P., Grønbæk, K., Zeuthen, J., y Becker, J. C. In Situ T-Cell Responses against Melanoma Comprise High Numbers of Locally Expanded T-Cell Clonotypes. *J.Immunol.*, 163: 443-447, 1999.
41. Kessler, J. H., Beekman, N. J., Bres-Vloemans, S. A., Verdijk, P., van Veelen, P. A., Kloosterman-Joosten, A. M., Vissers, D. C., ten Bosch, G. J., Kester, M. G., Sijts, A., Wouter, D. J., Ossendorp, F., Offringa, R., y Melief, C. J. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J.Exp.Med.*, 193: 73-88, 2001.
- 10 42. de Vries, T. J., Fourkour, A., Wobbes, T., Verkroost, G., Ruiter, D. J., y van Muijen, G. N. Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res.*, 57: 3223-3229, 1997.
43. Jager, E., Ringhoffer, M., Karbach, J., Arand, M., Oesch, F., y Knuth, A. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int.J.Cancer*, 66: 470-476, 1996.
- 15 44. Cormier, J. N., Abati, A., Fetsch, P., Hijazi, Y. M., Rosenberg, S. A., Marincola, F. M., y Topalian, S. L. Comparative analysis of the in vivo expression of tyrosinase, MART1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J.Immunother.*, 21: 27-31, 1998.
- 20 45. Riker, A., Cormier, J., Panelli, M., Kammula, U., Wang, E., Abati, A., Fetsch, P., Lee, K. H., Steinberg, S., Rosenberg, S., y Marincola, F. Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery*, 126: 112-120, 1999.
46. Maeurer, M. J., Gollin, S. M., Martin, D., Swaney, W., Bryant, J., Castelli, C., Robbins, P., Parmiani, G., Storkus, W. J., y Lotze, M. T. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J.Clin.Invest*, 98: 1633-1641, 1996.
- 25 47. Grossman, D., Kim, P. J., Schechner, J. S., y Altieri, D. C. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98: 635-640, 2001.
48. Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., y Reed, J. C. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.*, 58: 5315-5320, 1998.
- 30 49. Monzo, M., Rosell, R., Felip, E., Astudillo, J., Sanchez, J. J., Maestre, J., Martin, C., Font, A., Barnadas, A., y Abad, A. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J.Clin.Oncol.*, 17: 2100-2104, 1999.
- 35 50. Nakagawara, A. Molecular basis of spontaneous regression of neuroblastoma: role of neurotrophic signals and genetic abnormalities. *Hum.Cell*, 11: 115-124, 1998.
51. Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P. F., y Parmiani, G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother.*, 50: 3-15, 2001.
- 40 52. Melief, C. J., Toes, R. E., Medema, J. P., van der Burg, S. H., Ossendorp, F., y Offringa, R. Strategies for immunotherapy of cancer. *Adv.Immunol.*, 75:235-82.: 235-282, 2000.
53. Gilboa, E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity.*, 11: 263-270, 1999.
54. Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., y Altieri, D. C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 396: 580-584, 1998.
- 45 55. Zaffaroni, N. y Daidone, M. G. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. *Drug Resist.Updat.*, 5: 65-72, 2002.
56. Shinozawa, I., Inokuchi, K., Wakabayashi, I., y Dan, K. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, survivin, and EPR-1 in hematological malignancies. *Leuk.Res*, 24: 965-970, 2000.
57. Granziero, L., Ghia, P., Circosta, P., Gottardi, D., Strola, G., Geuna, M., Montagna, L., Piccoli, P., Chilosi, M., y Caligaris-Cappio, F. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 97: 2777-2783, 2001.
- 50

58. Ambrosini, G., Adida, C., y Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat.Med.*, 3: 917-921, 1997.
59. Altieri, D. C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat.Rev.Cancer*, 3: 46-54, 2003.
- 5 60. Olie, R. A., Simoes-Wust, A. P., Baumann, B., Leech, S. H., Fabbro, D., Stahel, R. A., y Zangemeister-Wittke, U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res*, 60: 2805-2809, 2000.
61. Andersen, M. H. y thor Straten, P. Survivin--a universal tumor antigen. *Histol.Histopathol.*, 17: 669-675, 2002.
62. Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Capeller, B., Bröcker, E. B., Becker, J. C., y thor, S. P. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res*, 61: 5964-5968, 2001.
- 10 63. Currier, J. R., Kuta, E. G., Turk, E., Earhart, L. B., Loomis-Price, L., Janetzki, S., Ferrari, G., Birx, D. L., y Cox, J. H. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *J.Immunol.Methods*, 260: 157-172, 2002.
64. Elvin, J., Potter, C., Elliott, T., Cerundolo, V., y Townsend, A. A method to quantify binding of unlabeled peptides to class I MHC molecules and detect their allele specificity. *J Immunol Methods*, 158: 161-171, 1993.
- 15 65. Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R. T., Grey, H. M., y Sette, A. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, 74: 929-937, 1993.
66. thor Straten, P., Barfoed, A., Seremet, T., Saeterdal, I., Zeuthen, J., y Guldberg, P. Detection and characterization of alpha-beta-T-cell clonality by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Biotechniques*, 25: 244-250, 1998.
- 20 67. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A., y Stevanovic, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50: 213-219, 1999.
68. Schrama, D., Pedersen Ls, L. O., Keikavoussi, P., Andersen, M. H., Straten, P. P., Brocker, E. B., Kampgen, E., y Becker, J. C. Aggregation of antigen-specific T cells at the inoculation site of mature dendritic cells. *J.Invest Dermatol.*, 119: 1443-1448, 2002.
- 25 69. Mahotka, C., Wenzel, M., Springer, E., Gabbert, H. E., y Gerharz, C. D. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res.*, 59: 6097-6102, 1999.
70. Hicklin, D. J., Marincola, F. M., y Ferrone, S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol.Med.Today*, 5: 178-186, 1999.
- 30 71. Seliger, B., Cabrera, T., Garrido, F., y Ferrone, S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin.Cancer Biol.*, 12: 3-13, 2002.
72. Sette, A., Vitiello, A., Reheman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W. M., Melief, C. J., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., y . The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J.Immunol.*, 153: 5586-5592, 1994.
- 35 73. Moudgil, K. D. y Sercarz, E. E. Can antitumor immune responses discriminate between self and nonself? *Immunol.Today*, 15: 353-355, 1994.
74. Parkhurst, M. R., Salgaller, M. L., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Rosenberg, S. A., y Kawakami, Y. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J.Immunol.*, 157: 2539-2548, 1996.
- 40 75. Guichard, G., Zerbib, A., Le Gal, F. A., Hoebeke, J., Connan, F., Choppin, J., Briand, J. P., y Guillet, J. G. Melanoma peptide MART-1(27-35) analogues with enhanced binding capacity to the human class I histocompatibility molecule HLA-A2 by introduction of a beta-amino acid residue: implications for recognition by tumor-infiltrating lymphocytes. *J.Med.Chem.*, 43: 3803-3808, 2000.
- 45 76. Clay, T. M., Custer, M. C., McKee, M. D., Parkhurst, M., Robbins, P. F., Kerstann, K., Wunderlich, J., Rosenberg, S. A., y Nishimura, M. I. Changes in the fine specificity of gp100(209-217)-reactive T cells in patients following vaccination with a peptide modified at an HLA-A2.1 anchor residue. *J.Immunol.*, 162: 1749-1755, 1999.
77. Melief, C. J., van der Burg, S. H., Toes, R. E., Ossendorp, F., y Offringa, R. Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes. *Immunol.Rev.*, 188: 177-182, 2002.
78. Jager, E., Ringhoffer, M., Altmannsberger, M., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Oesch, F., y Knuth, A.

- Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int.J.Cancer*, 71: 142-147, 1997.
- 5 79. Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den, D. P., Brocker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kämpgen, E., y Schuler, G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J.Exp.Med.*, 190: 1669-1678, 1999.
80. Yee, C., Thompson, J. A., Roche, P., Byrd, D. R., Lee, P. P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M. M., Riddell, S. R., y Greenberg, P. D. Melanocyte destruction after antigen- specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J.Exp.Med.*, 192: 1637-1644, 2000.
- 10 81. Simon, R. M., Steinberg, S. M., Hamilton, M., Hildesheim, A., Khleif, S., Kwak, L. W., Mackall, C. L., Schlom, J., Topalian, S. L., y Berzofsky, J. A. Clinical trial designs for the early clinical development of therapeutic cancer vaccines. *J.Clin.Oncol.*, 19: 1848-1854, 2001.
-
- Andersen et al. *CANCER RESEARCH*, Vol 61, no. 3 (2001) 869-872.
- 15 Andersen et al. *CANCER RESEARCH*, Vol. 61, no. 16 (2001) 5964-68.
- Schmitz et al. *CANCER RESEARCH*, Vol. 60, no. 17 (2000) 4845-49.
- Hirohashi et al. *CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH*, Vol. 8, no. 6 (2002) 1731-39.
- Fortugno et al. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, Vol. 115, no. 3 (2002) 575-85.
- 20 WO 2005/049073.
- US 6 245 523.
- WO 03/102023.
- Schmidt et al., *BLOOD*, Vol. 102, no.2 (2003) 571-576.
- US 6 346 389.
- 25 Base de datos del EMBL, 30 mayo de 2000, XP002392545, no. de accesoión O70201 de la base de datos del EBI.
- Conway et al., *BLOOD*, Vol. 95, no. 4 (2000) 1435-1442.
- Muchmore et al., *Molecular Cell*, Cell Press Cambridge, MA US, Vol. 6, no. 1 (2000) 173-182.
- Reker et al., *Cancer Biology and Therapy*, Vol. 3, no. 2 (2004) 180-183.
- Reker et al., *Journal of Immunotherapy*, Vol. 72, no. 6 (2004) S29-S30.
- 30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Straten, Eivind Per Thor

Andersen, Mads Hald

<120> PÉPTIDOS DERIVADOS DE SURVIVINA Y USO DE LOS MISMOS

5 <130> 31757EP01

<150> US 60/352.284

<151> 30-01-2003

<160> 85

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

10 <210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido Sur53K9

<400> 1

Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala
1 5

<210> 2

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 2

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

25 <210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 3

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

<210> 4

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 4
 Leu Leu Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
 1 5
 <210> 5
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 5
 Leu Met Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
 1 5
 15 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 6
 Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu
 1 5
 <210> 7
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 30 <400> 7
 Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe
 1 5
 <210> 8
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 5 <400> 8
 Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Tyr
 1 5
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 9
 Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Tyr
 1 5
 15 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 10
 Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
 1 5
 <210> 11
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 11
 Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
 1 5
 30 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 12
 Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met
 5 1 5
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 13
 Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu
 1 5
 <210> 14
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 20 <400> 14
 Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu
 1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 15
 Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
 1 5
 30 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 16

Thr Ala Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile
1 5

5 <210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido Sur53K9

<400> 17

Glu Thr Ala Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile
1 5 10

<210> 18

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 18

Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu
1 5

20 <210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 19

Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg Ile
1 5

<210> 20

30 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9
 <400> 20
 Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe
 1 5 10
 <210> 21
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 10 <400> 21
 Tyr Pro Leu His Glu Gln His Gln Met
 1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 22
 Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe
 1 5
 20 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 23
 Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys
 1 5
 <210> 24
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9

<400> 24

Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
 1 5

<210> 25

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 25

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

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 26

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

<210> 27

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

25 <400> 27

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

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 28

Val Ser Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr
 1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 29

Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Tyr
 1 5

10 <210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido Sur53K9

<400> 30

Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Tyr
 1 5

<210> 31

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 31

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

25 <210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 32

Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Tyr
 1 5 10

43

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 33
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Tyr
 1 5 10
 <210> 34
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 15 <400> 34
 Gln Thr Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 35
 Gln Ser Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
 1 5 10
 25 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 36
 Phe Thr Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
 1 5
 <210> 37

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 37
 Phe Ser Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
 1 5
 <210> 38
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 38
 Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Tyr
 15 1 5
 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 39
 Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 40
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 30 <400> 40
 Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe
 1 5
 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 41
 Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe
 5 1 5
 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 42
 Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys
 1 5
 <210> 43
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 20 <400> 43
 Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys
 1 5
 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 44
 Lys Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys
 30 1 5
 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 45
 Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe
 1 5 10
 5 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 46
 Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 47
 Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys
 1 5 10
 20 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 48
 Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe
 1 5 10
 <210> 49
 30 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9

<400> 49

Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys
 1 5 10

<210> 50

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 50

10 Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
 1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 51

Lys Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys
 1 5 10

<210> 52

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

25 <400> 52

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys
 1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 53

Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys
 1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 54

Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Lys
 1 5

10 <210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido Sur53K9

<400> 55

Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Lys
 1 5

<210> 56

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 56

Leu Leu Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys
 1 5

25 <210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 57

Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Lys
 1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 58

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

10 <210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido Sur53K9

<400> 59

Ile Leu Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys
 1 5 10

<210> 60

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 60

Thr Ile Arg Arg Lys Asn Leu Arg Lys
 1 5

25 <210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 61

Pro Thr Ile Arg Arg Lys Asn Leu Arg Lys
 1 5 10

<210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 62
 Arg Ile Thr Arg Glu Glu His Lys Lys
 1 5
 <210> 63
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 15 <400> 63
 Ala Val Phe Asp Arg Lys Ser Asp Ala Lys
 1 5 10
 <210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 64
 Gln Pro Arg Ala Pro Ile Arg Pro Ile
 1 5
 25 <210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 65
 Arg Pro Pro Ile Phe Ile Arg Arg Leu
 1 5
 <210> 66

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 66
 Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu
 1 5 10
 <210> 67
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 67
 Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu
 15 1 5 10
 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 68
 Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 1 5 10
 <210> 69
 25 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 30 <400> 69
 Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 529 203 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 70

5 Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu
 1 5 10

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 71

 Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile
 1 5 10

<210> 72

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

20 <400> 72

 Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu
 1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 73

 Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
 1 5

30 <210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9
 <400> 74
 Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys
 1 5
 <210> 75
 5 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 10 <400> 75
 Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val
 1 5 10
 <210> 76
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 76
 Gln Leu Cys Pro Ile Cys Arg Ala Pro Val
 1 5 10
 20 <210> 77
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 77
 Arg Leu Ala Ser Phe Tyr Asp Trp Pro Leu
 1 5 10
 <210> 78
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Sur53K9
 <400> 78

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

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 79

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

10 <210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido Sur53K9

<400> 80

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

<210> 81

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 81

Ser Leu Gly Ser Pro Val Leu Gly Leu
 1 5

25 <210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 82

Gln Ile Leu Gly Gln Leu Arg Pro Leu
 1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 83

Leu Thr Ala Glu Val Pro Pro Glu Leu
1 5

<210> 84

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

15 <400> 84

Gly Met Gly Ser Glu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Sur53K9

<400> 85

Glu Leu Pro Thr Pro Arg Arg Glu Val
1 5

25

REIVINDICACIONES

1. Un péptido epítipo restringido a CMH de clase I derivado de survivina, teniendo dicho epítipo la secuencia RISTFKNWPK como se especifica en SEQ ID NO: 58 y al menos una de las siguientes características:
 - (i) es capaz de unirse a la molécula de HLA-A3 de clase I con una afinidad medida por la cantidad del péptido que es capaz de tener la mitad de la recuperación máxima de la molécula de HLA de clase I (valor C_{50}) que es como máximo de 50 μ M como se determina mediante ensayo de estabilización de HLA,
 - (ii) es capaz de inducir células productoras de IFN- γ en una población de PBL de un paciente de cáncer a una frecuencia de al menos 1 por 10^4 PBL como se determina mediante un ensayo ELISPOT, y/o
 - (iii) es capaz de la detección *in situ* en un tejido tumoral de CTL que son reactivos con el péptido epítipo,
- para su uso como un medicamento.
2. Un péptido según la reivindicación 1 para su uso como un medicamento, teniendo dicho péptido un valor C_{50} que es como máximo de 30 μ M.
3. Un péptido según la reivindicación 1 o 2 para su uso como un medicamento, teniendo dicho péptido un valor C_{50} que es como máximo de 20 μ M.
4. Un péptido según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso como un medicamento, comprendiendo dicho péptido como máximo 20 residuos de aminoácidos.
5. Un péptido según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso como un medicamento, comprendiendo dicho péptido como máximo 10 residuos de aminoácidos.
6. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso como un medicamento, siendo dicho péptido capaz de
 - (i) inducir células productoras de IFN- γ en una población de PBL de un paciente de cáncer a una frecuencia de al menos 10 por 10^4 PBL; y/o
 - (ii) inducir células productoras de IFN- γ en una población de PBL de un paciente que tiene una enfermedad cancerosa donde se expresa survivina, tal como una enfermedad cancerosa seleccionada del grupo que consiste en un tumor maligno hematopoyético incluyendo leucemia linfática crónica y leucemia mieloide crónica, melanoma, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata.
7. Una composición farmacéutica que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7, siendo dicha composición una formulación de liberación con el tiempo.
9. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7, que adicionalmente comprende un péptido restringido a una molécula de HLA-A y un péptido restringido a una molécula de HLA-B, y opcionalmente un péptido restringido a una molécula de HLA-C.
10. Una composición farmacéutica que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso como un medicamento.
11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10 para su uso como un medicamento, siendo dicha composición una formulación de liberación con el tiempo.
12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10 para su uso como medicamento, comprendiendo dicha composición adicionalmente un péptido restringido a una molécula de HLA-A y un péptido restringido a una molécula de HLA-B, y opcionalmente un péptido restringido a una molécula de HLA-C.
13. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en el tratamiento de cáncer.
14. Un péptido según la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de cáncer, en el que dicho 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 cervical, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de próstata.

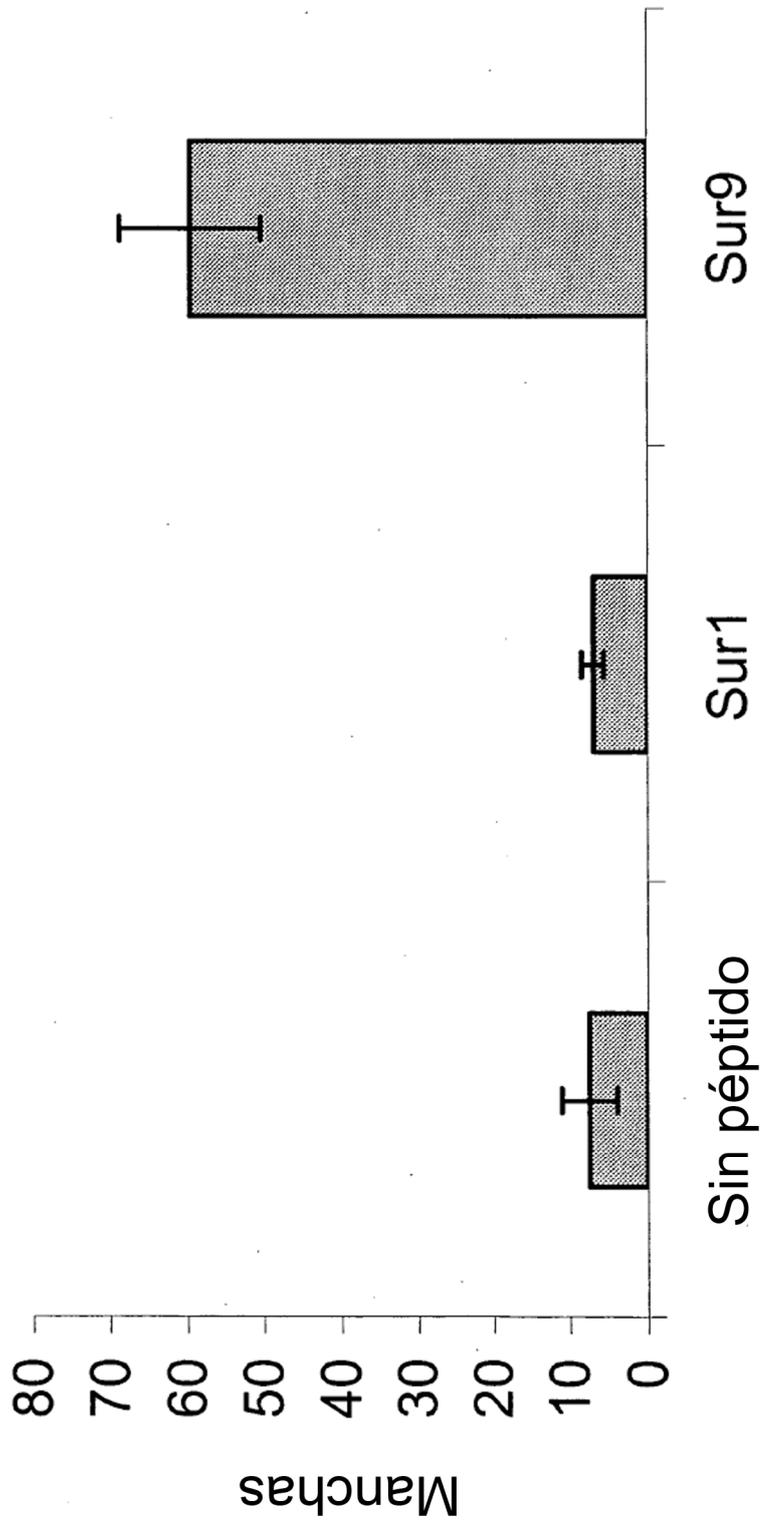


Fig. 1

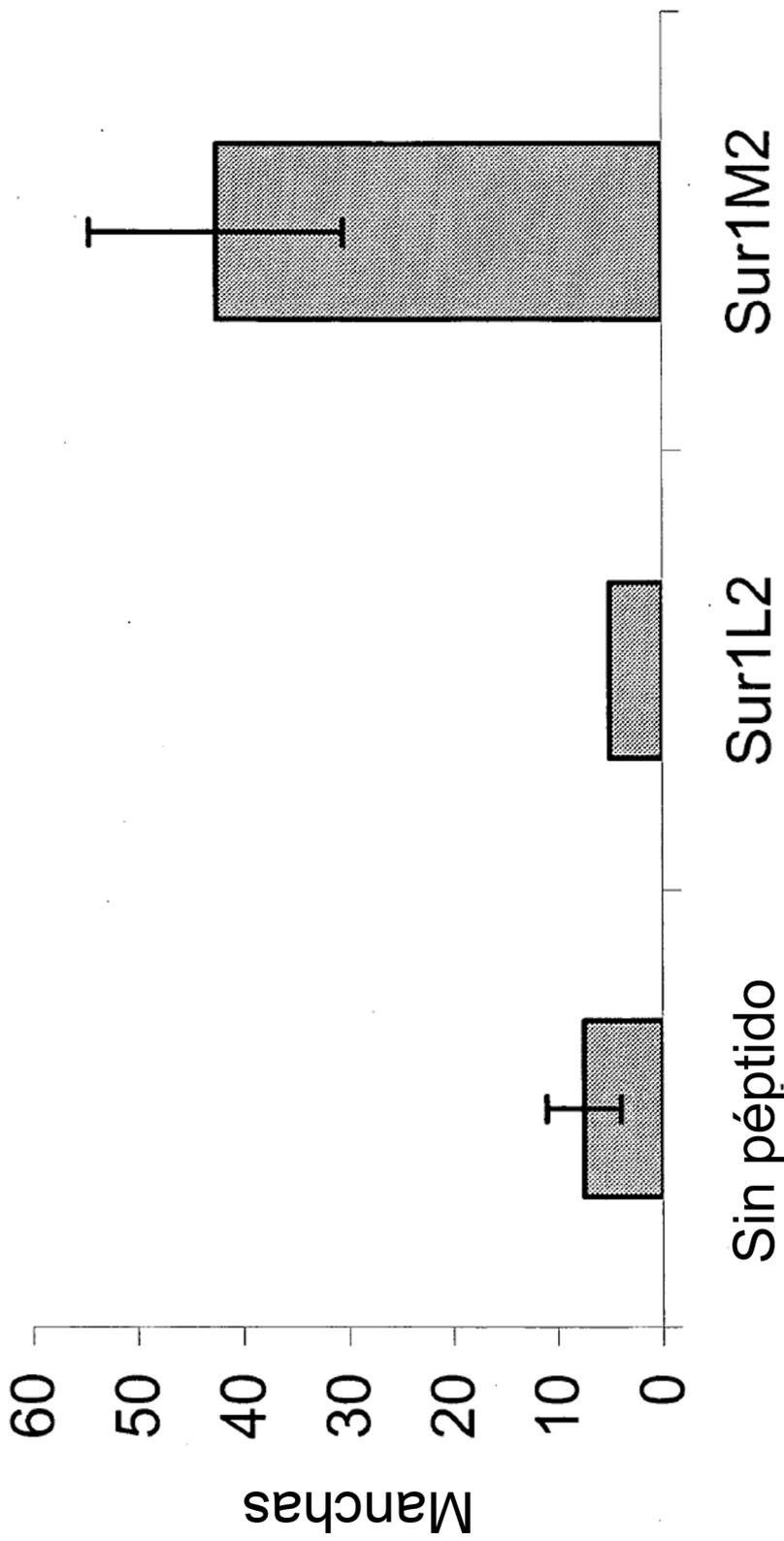


Fig. 2

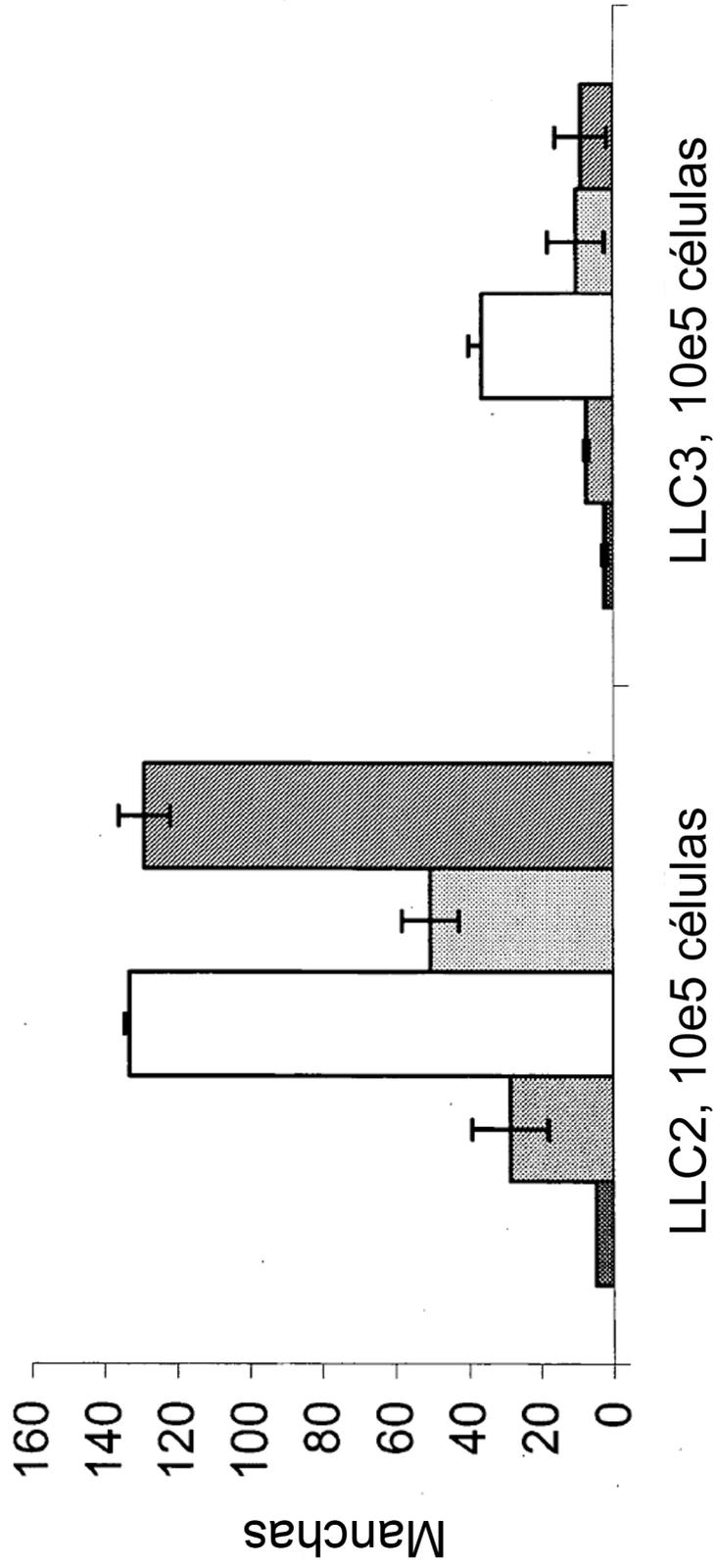


Fig. 3

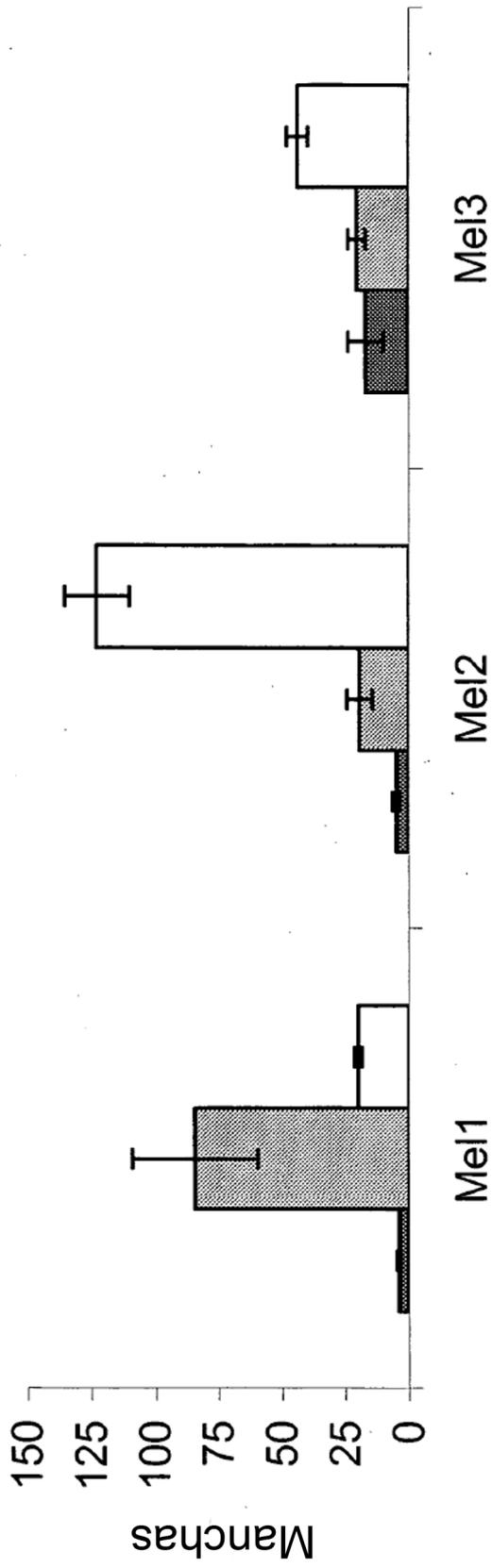


Fig. 4

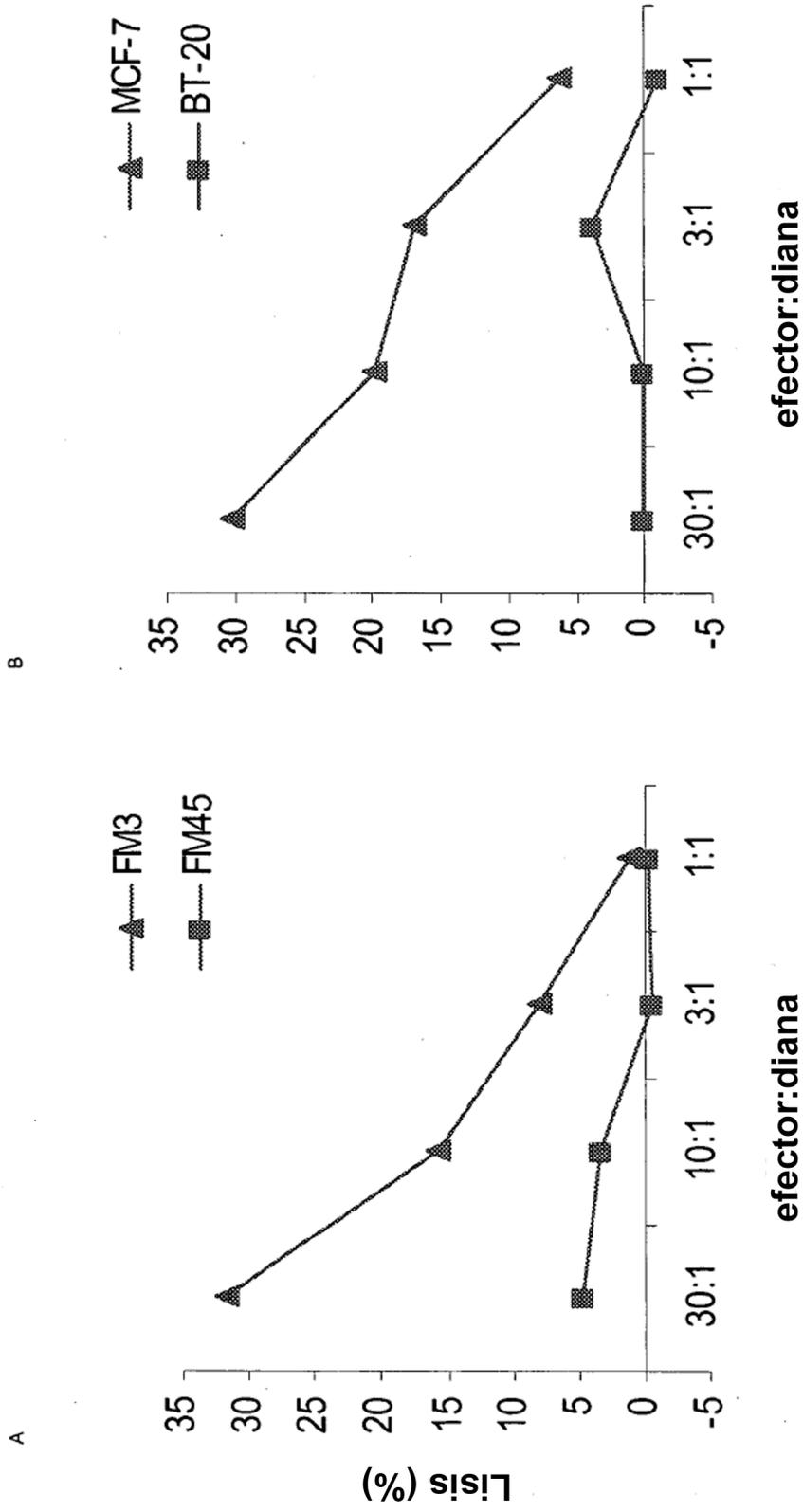


Fig. 5

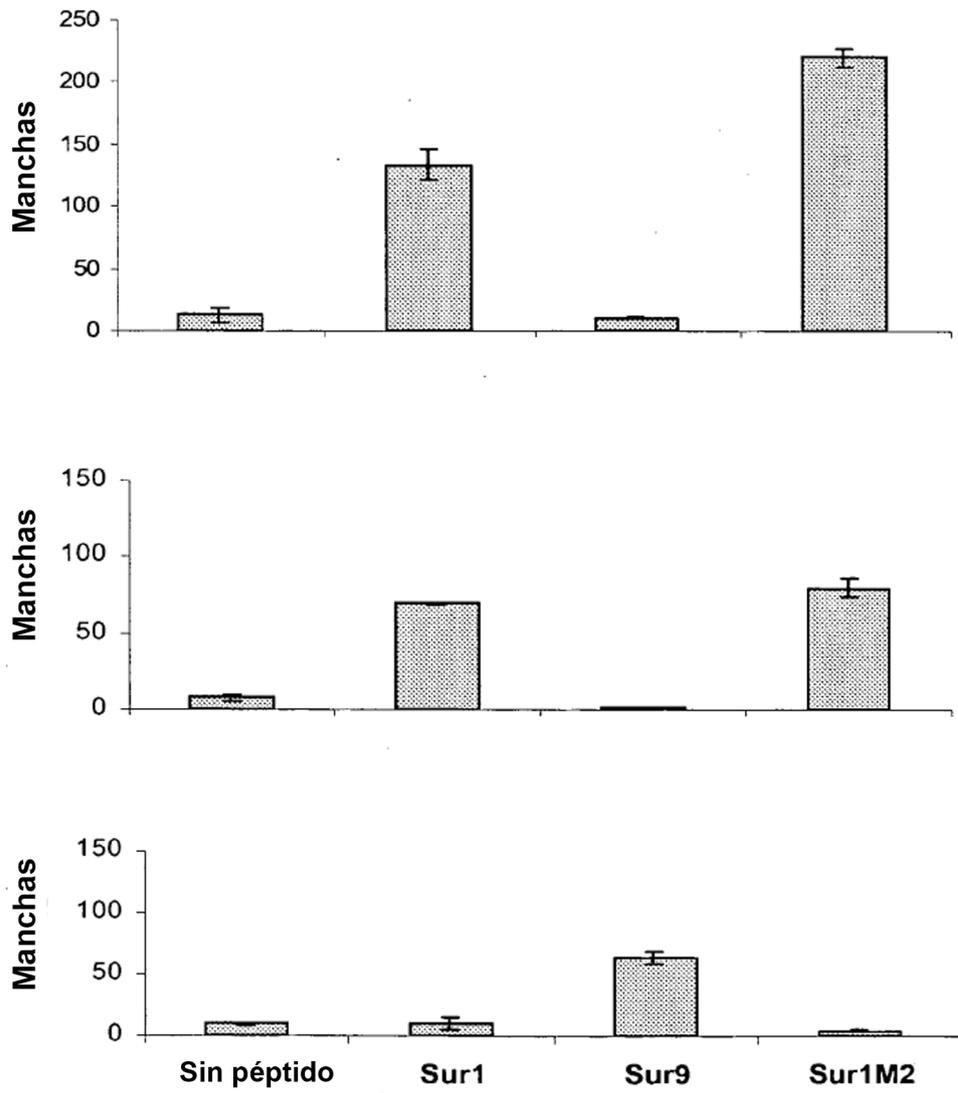


Fig.6

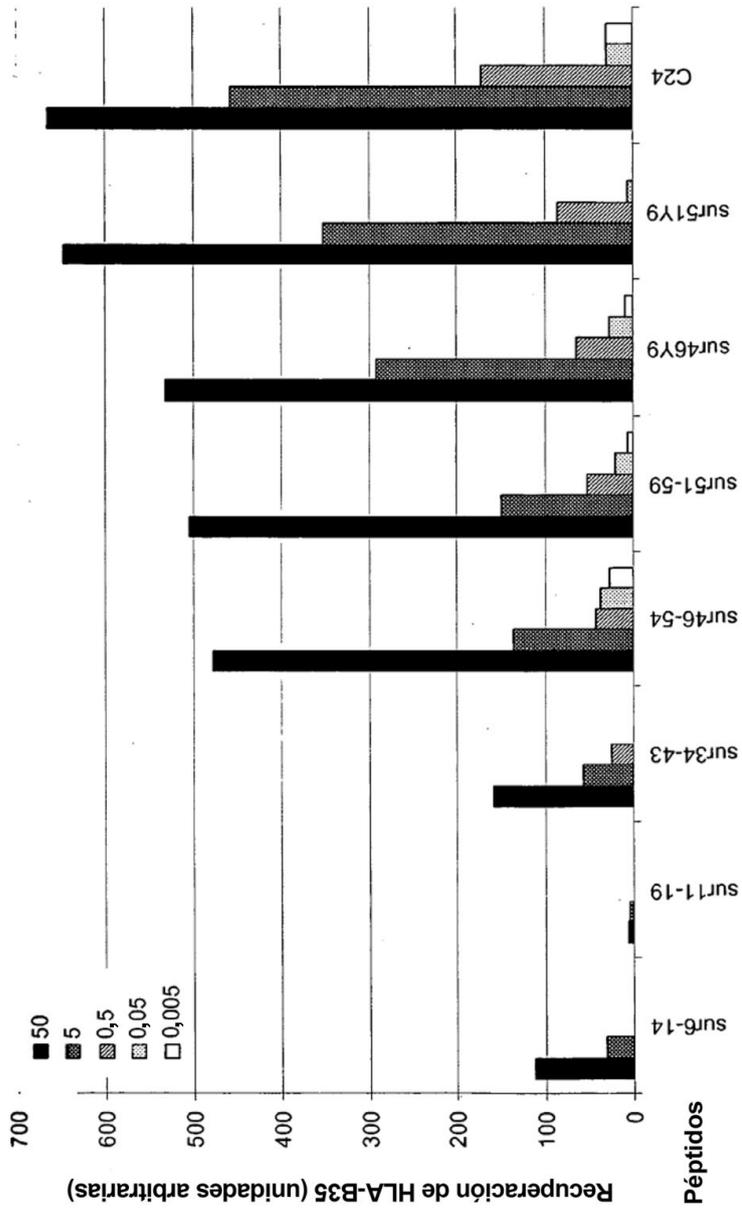


Fig. 7

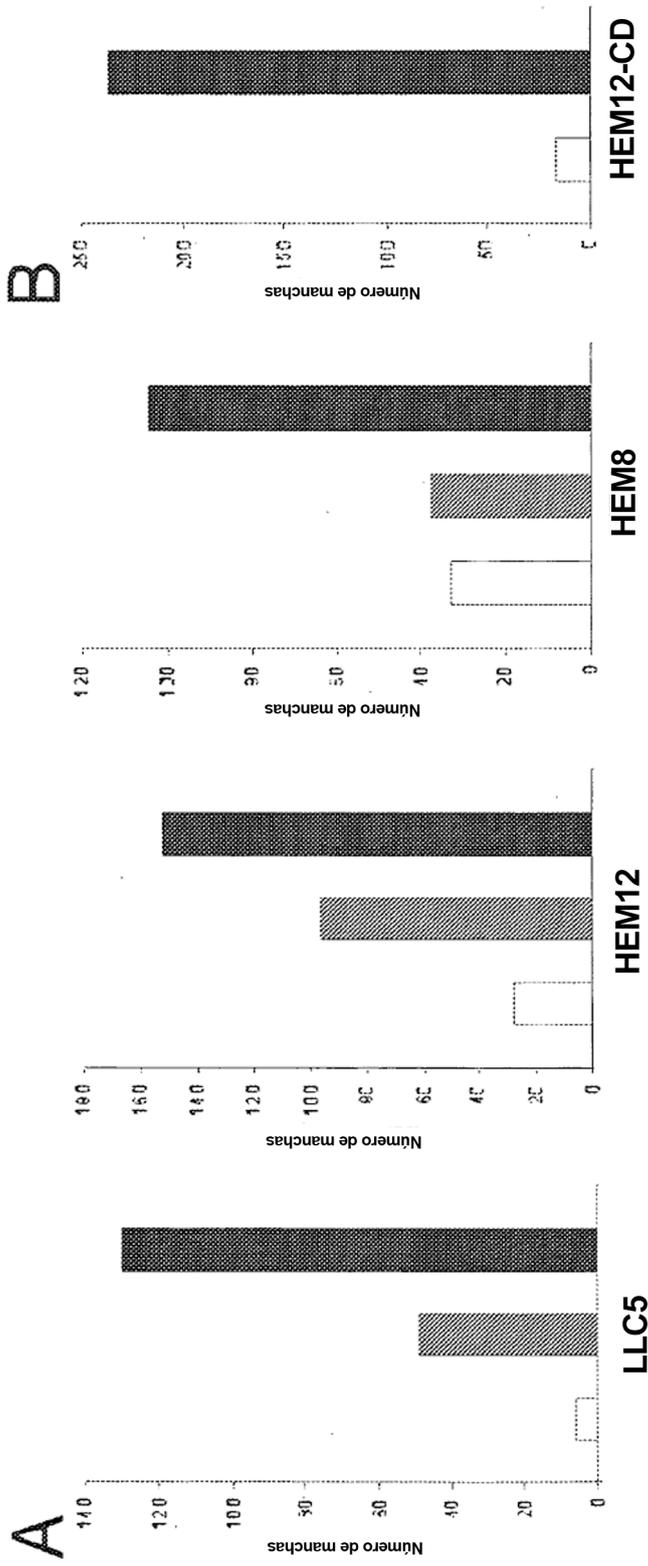


Fig. 8

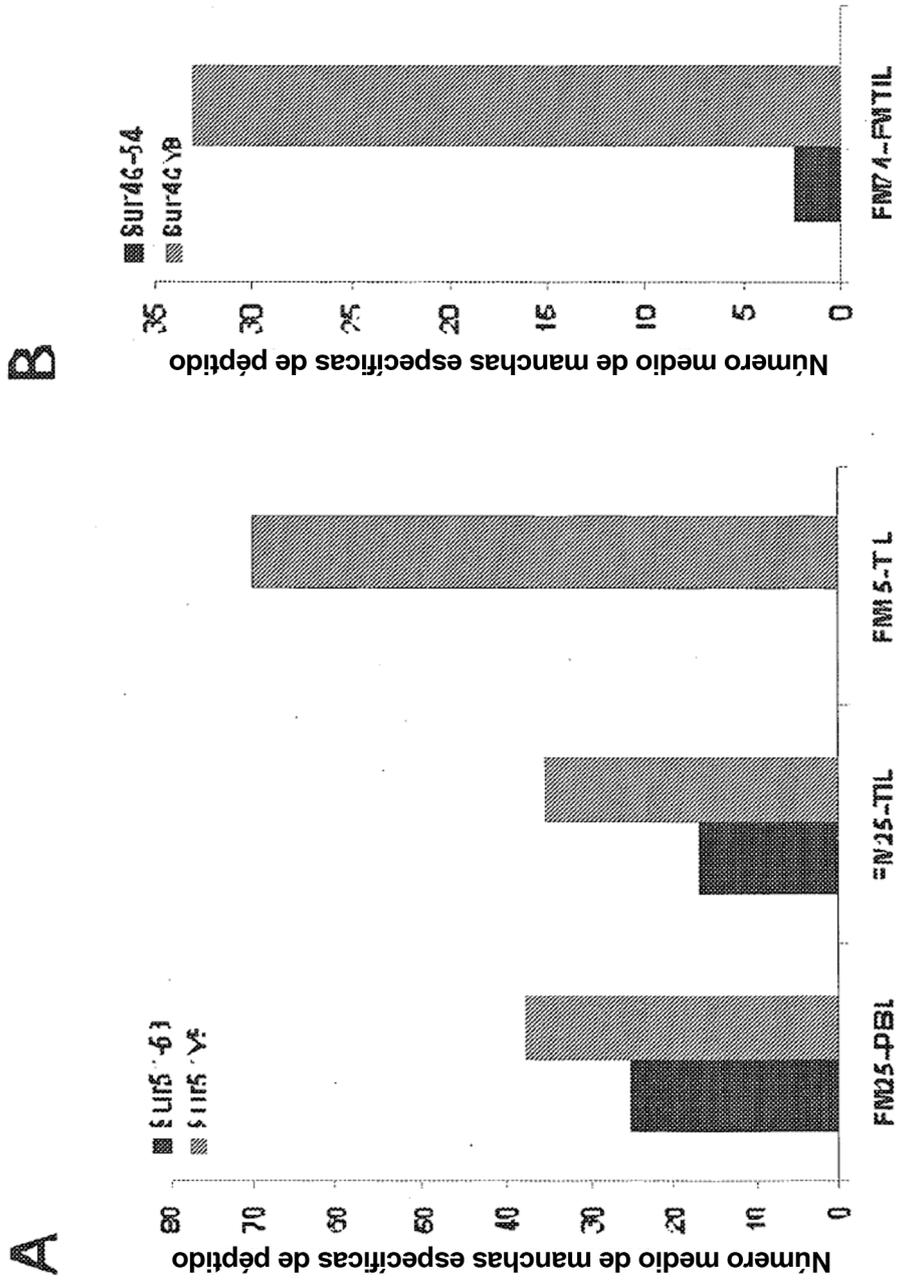


Fig. 9

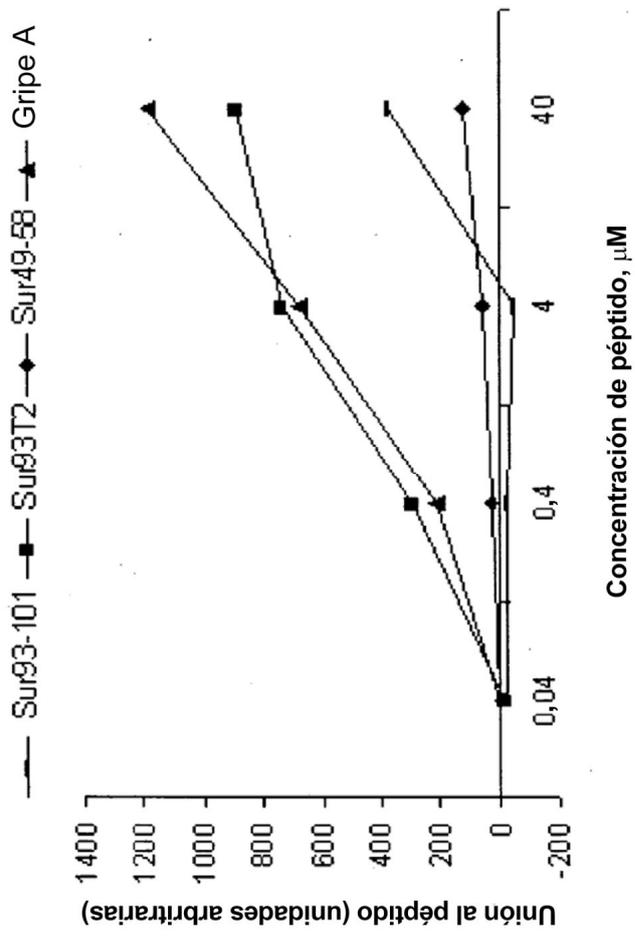


Fig. 10

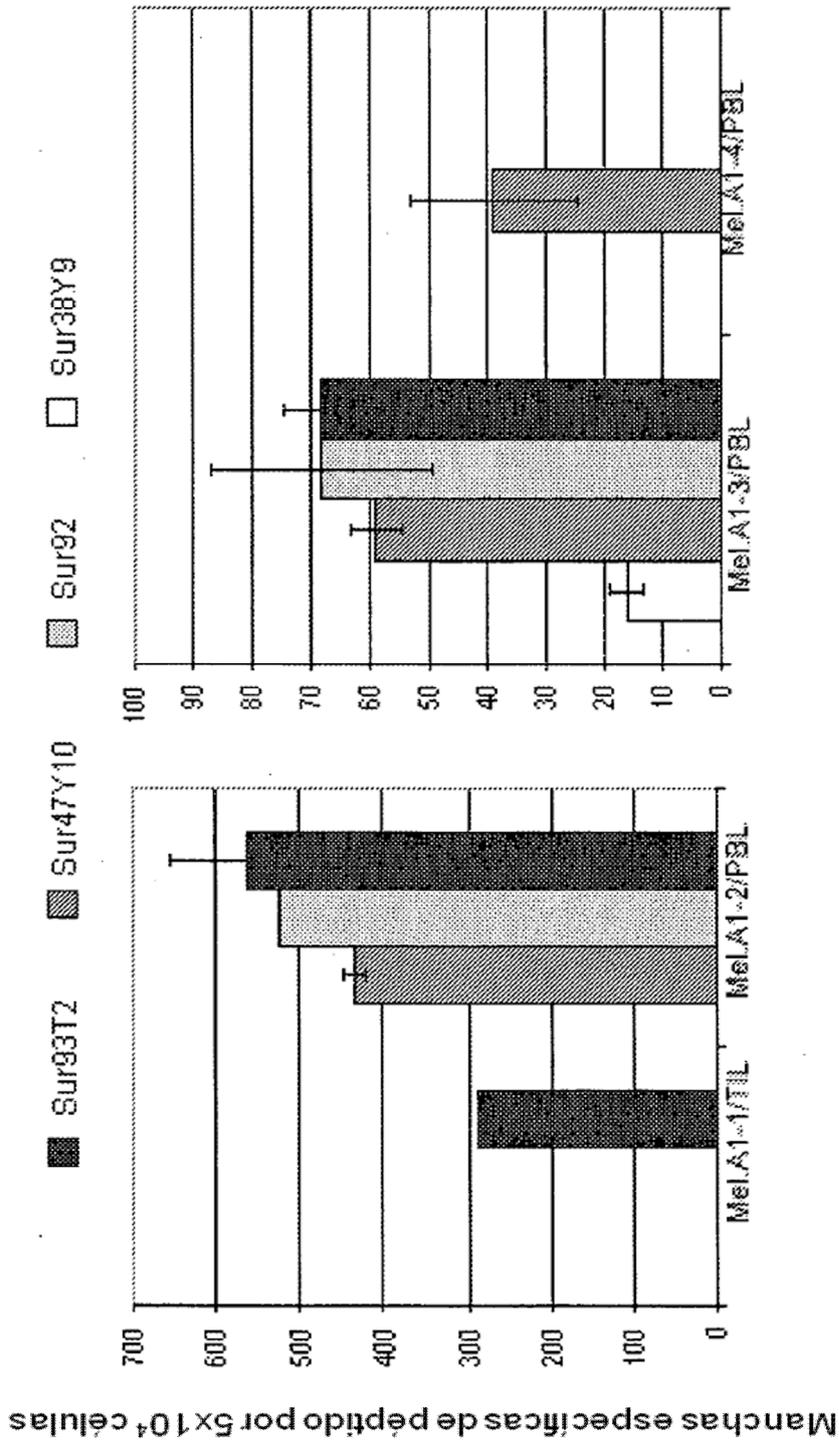


Fig. 11

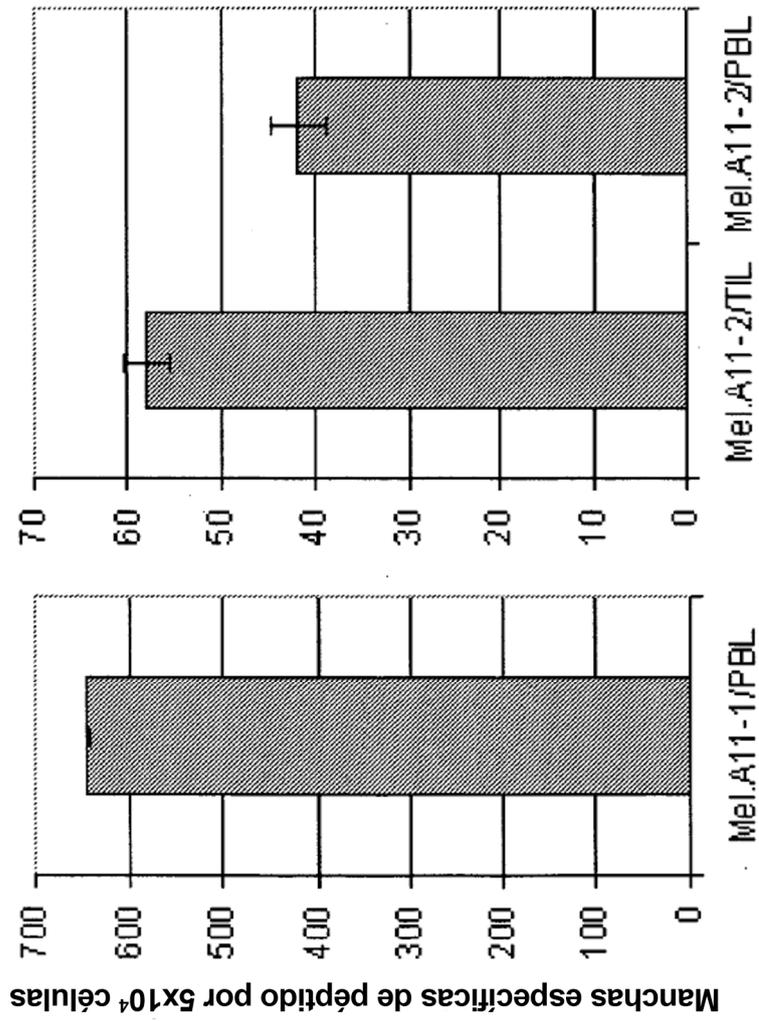


Fig. 12

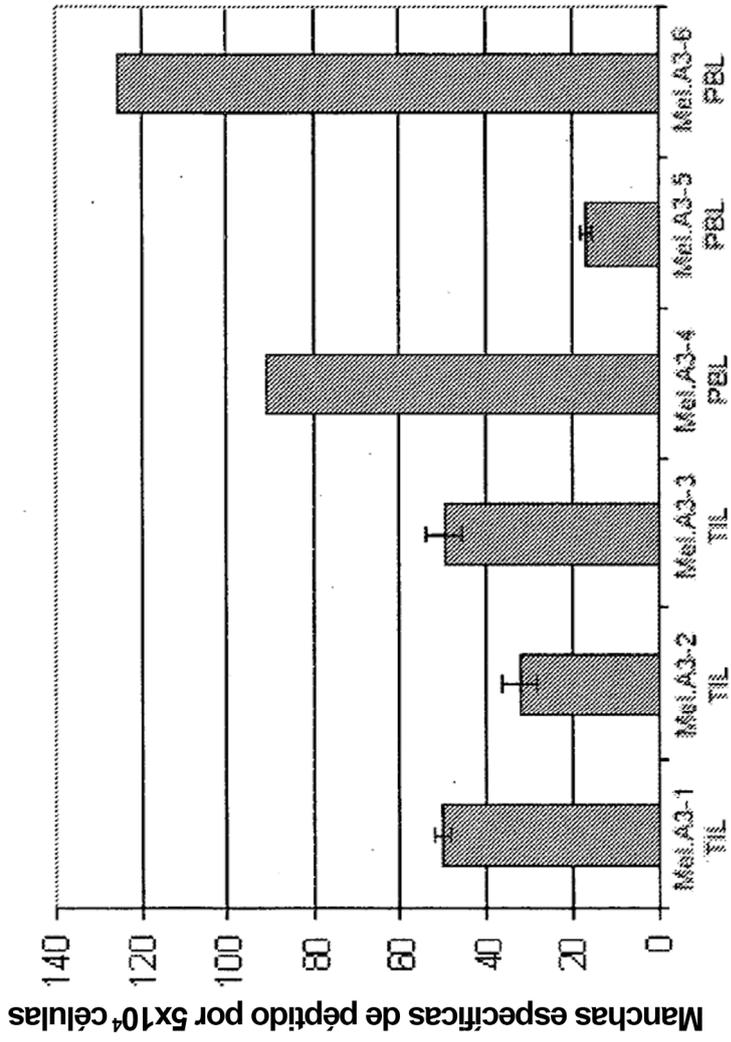


Fig. 13

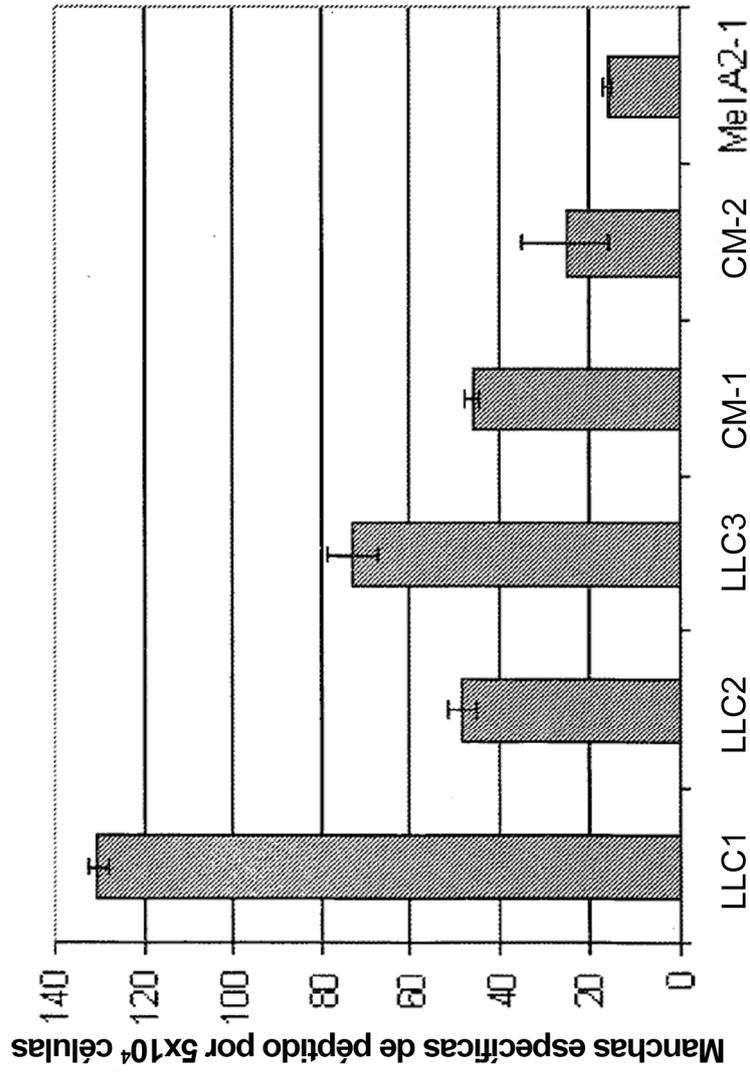


Fig. 14

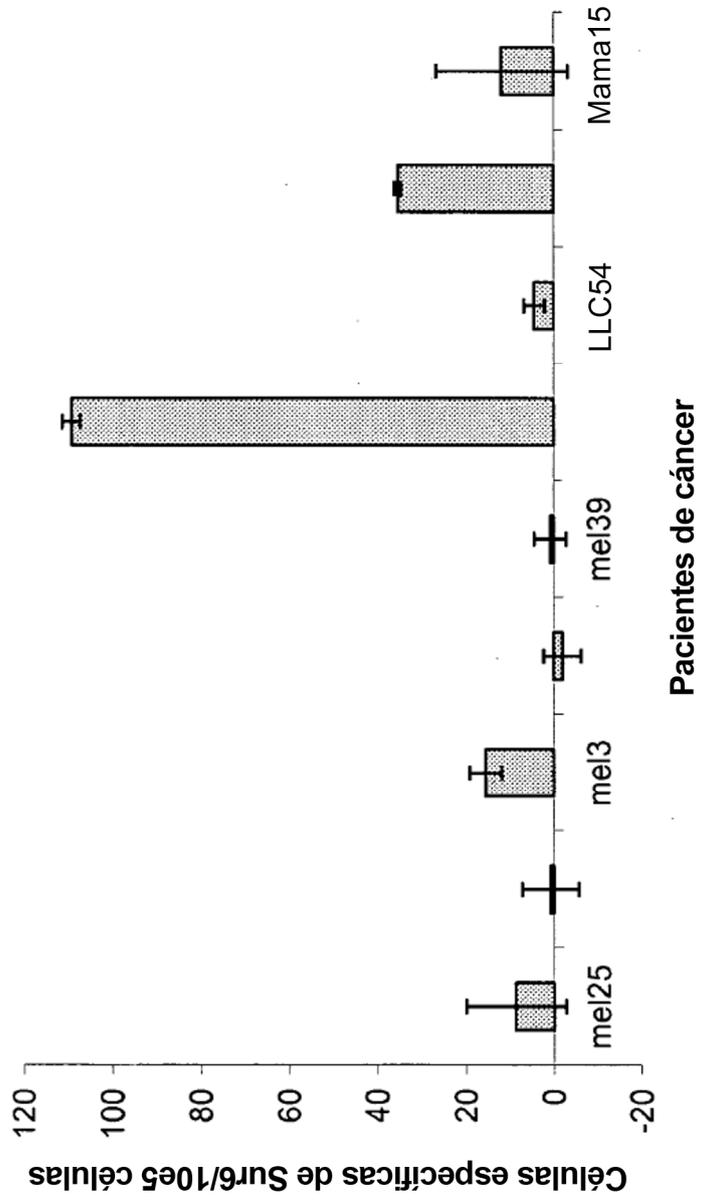


Fig. 15

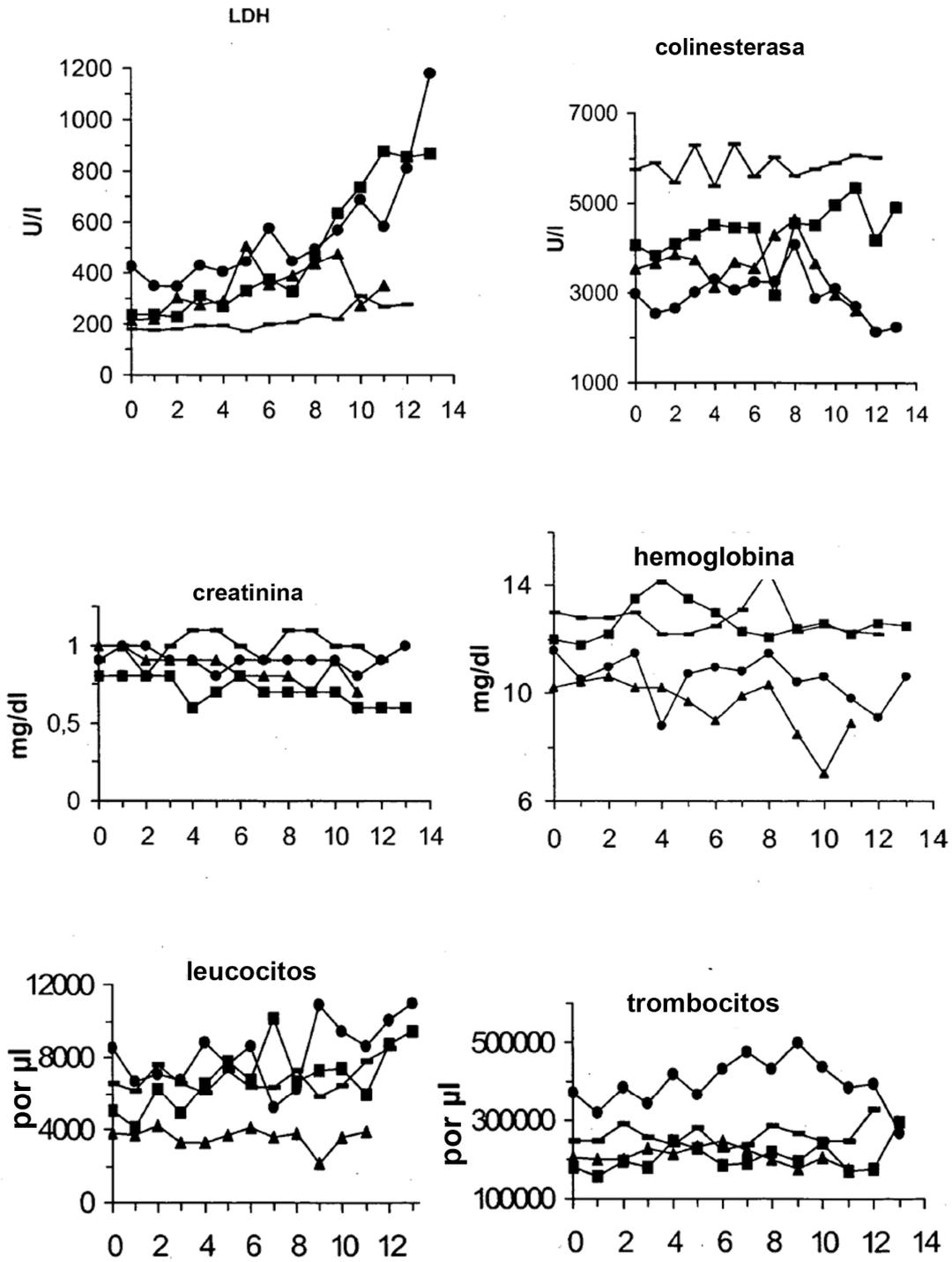


Fig. 16

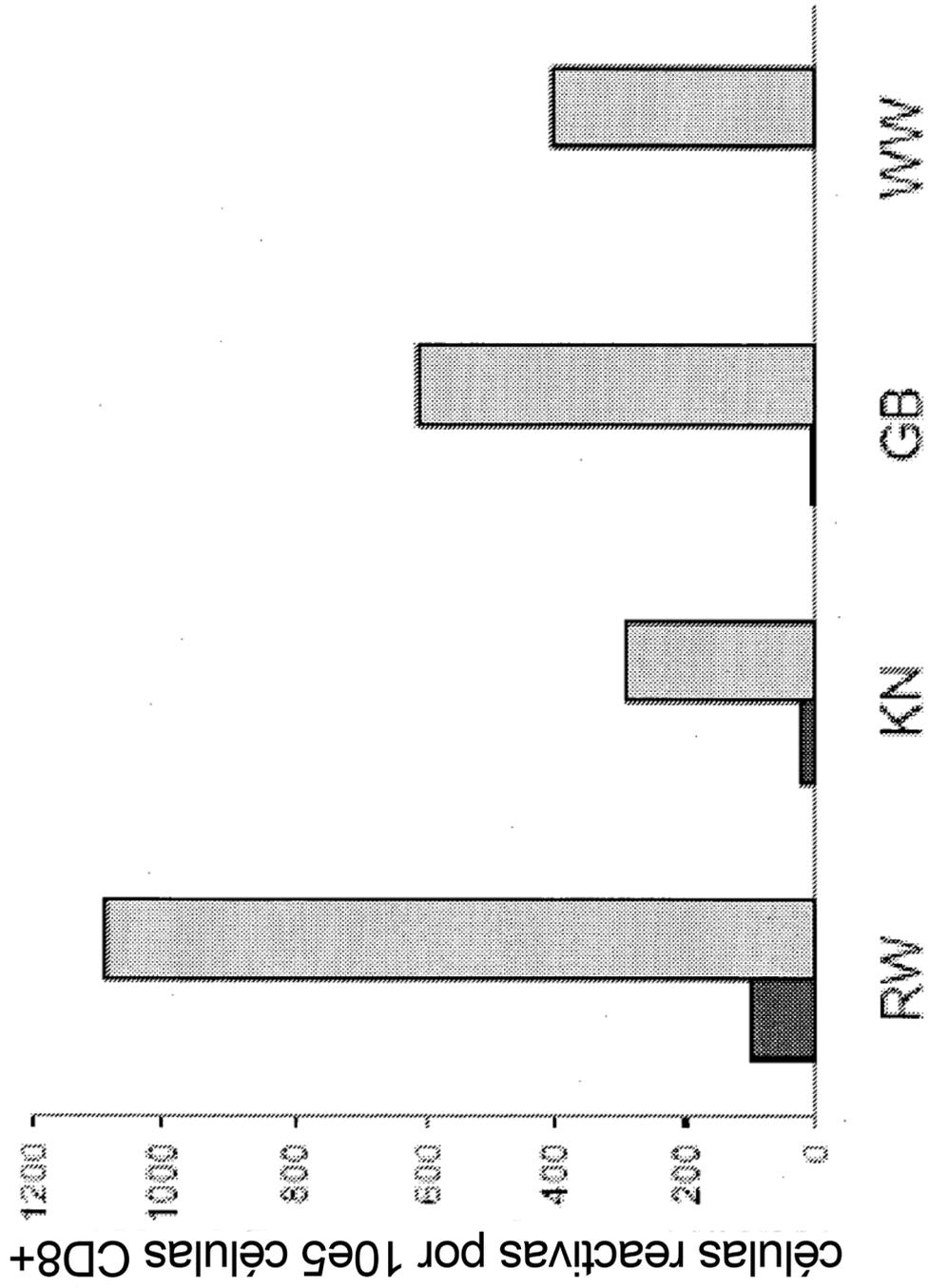


Fig. 17