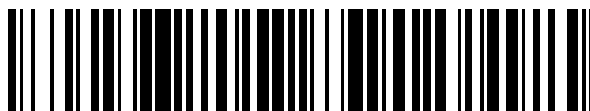


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 391**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2011** **E 11007684 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015** **EP 2572725**

54 Título: **Péptidos de cambio de marco (FSP) específicos de MSI para prevención y tratamiento del cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2015

73 Titular/es:

**RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG
(100.0%)
Grabengasse 1
69117 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**KLOOR, MATTHIAS;
REUSCHENBACH, MIRIAM y
KNEBEL-DOEBERITZ, MAGNUS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 548 391 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos de cambio de marco (FSP) específicos de MSI para prevención y tratamiento del cáncer

5 La presente invención proporciona una vacuna para prevención y tratamiento del cáncer caracterizada por inestabilidad de microsatélites (MSI). La vacuna contiene una combinación de péptidos de cambio de marco (FSP) específicos de MSI que generan respuestas humorales y celulares contra las células tumorales o un ácido nucleico que codifica dichos FSP.

10 Los tumores humanos se desarrollan por dos caminos principales de inestabilidad del genoma, inestabilidad cromosómica e inestabilidad de microsatélites (MSI) que es resultado de defectos en el sistema de reparación de errores del DNA. La MSI se encuentra en el 15% de los cánceres colorrectales y una diversidad de enfermedades malignas extracolónicas que presentan un sistema deficiente de reparación de errores del DNA, con inclusión de cánceres endometriales, cánceres gástricos, cánceres del intestino delgado y tumores de otros órganos. Los
15 cánceres MSI pueden desarrollarse esporádicamente o en el contexto de un síndrome tumoral hereditario, cáncer colorrectal hereditario distinto de poliposis (HNPCC) o síndrome de Lynch.

Los cánceres MSI colorrectales se caracterizan por una alta inmunogenicidad que es resultado de la generación de numerosos péptidos de cambio de marco (FSP) durante el desarrollo de tumores MSI como resultado directo de la
20 deficiencia en la reparación de errores, lo que conduce a alteraciones de marco de lectura de la traducción cuando los microsatélites de las regiones codificantes de genes se ven afectados por mutación (Figura 1).

La abundancia de antígenos FSP predecibles específicos de MSI y el hecho de que los mismos son resultado directo del proceso de transformación maligna hacen que los FSP sean dianas muy prometedoras para terapia
25 inmune. Se cree que el sistema inmune humano es un recurso potencial para erradicar las células tumorales y que puede desarrollarse un tratamiento eficaz si los componentes del sistema inmune se estimulan adecuadamente para reconocer y eliminar las células del cáncer. Así, la inmunoterapia, que comprende composiciones y métodos para activar el sistema inmune del cuerpo, directa o indirectamente, para contraer o erradicar el cáncer, ha sido estudiada desde hace muchos años como adyuvante para la terapia convencional del cáncer.

30 WO 03/087162-A2 da a conocer vacunas preventivas y terapéuticas que implican FSP, dirigidas entre otras cosas al tratamiento de HPNCC.

Está admitido generalmente que el crecimiento y la metástasis de los tumores depende en gran parte de su
35 capacidad para evadirse de la vigilancia inmune del hospedador. La mayoría de los tumores expresan antígenos que pueden ser reconocidos en una proporción variable por el sistema inmune del hospedador, pero en muchos casos, la respuesta inmune es inadecuada. El fracaso en la provocación de una activación fuerte de las células T efectoras puede ser resultado de la inmunogenicidad débil de los antígenos tumorales o la expresión inadecuada o ausente de moléculas co-estimulantes por las células tumorales. Para la mayoría de las células T, la producción de IL-2 y la
40 proliferación requieren una señal co-estimulante simultánea con la entrada en acción del TCR; en caso contrario, las células T pueden entrar en un estado funcionalmente insensible, conocido como anergia clonal.

A pesar del largo tiempo durante el que se han investigado estas terapias, persiste la necesidad de estrategias
45 mejoradas para aumentar la respuesta inmune contra los antígenos tumorales.

No obstante, existe necesidad en la técnica de composiciones seguras y eficaces que puedan estimular el sistema
inmune como inmunoterapia del cáncer.

Conforme a la invención, una estimulación segura y eficaz del sistema inmune como inmunoterapia del cáncer se
50 consigue por las materias que constituyen el objeto definido en las reivindicaciones. Datos in vitro han demostrado que los FSP son sumamente inmunógenos y pueden provocar in vitro respuestas pronunciadas de las células T específicas de FSP (Linnebacher et al. 2001, Ripberger et al. 2003, Schwitalle et al. 2004). En estudios ulteriores en los que se examinó sangre periférica extraída de pacientes con cáncer de colon MSI, se demostró una alta frecuencia de respuestas de células T específicas de FSP (Schwitalle et al. 2008). A pesar del elevado número de
55 células T específicas de FSP en el tumor y en la sangre periférica, estos pacientes no demostraban signo alguno de autoinmunidad, lo que sugería que no es de esperar que los enfoques de vacunación FSP tengan efectos secundarios en términos de autoinmunidad.

Los análisis inmunológicos en individuos portadores de una mutación de la línea germinal en los genes de
60 reparación de errores del DNA que predisponen a cáncer colorrectal hereditario distinto de la poliposis (HNPCC) se encontró también que exhiben respuestas inmunes celulares contra FSP, incluso en ausencia de un tumor clínicamente detectable. Esto sugiere que las respuestas inmunes específicas de FSP pueden ser protectoras en individuos con HNPCC, lo que sugiere que la vacunación FSP puede utilizarse también en un escenario preventivo como el primer enfoque de prevención específico en una condición de cáncer heredada.

65

En resumen:

- (a) los péptidos de cambio de marco (FSP) son específicos de MSI y son resultado directo de la patogénesis de tumores MSI;
- (b) no son de esperar efectos secundarios clínicamente relevantes;
- (c) se predice que las combinaciones de FSPs se direccionarán a todos los tumores con MSI;
- (d) se ha designado la vacunación con FSP para terapia del 15% de los cánceres de colon y tumores del endometrio, estómago, intestino delgado y otros órganos;
- (e) el análisis molecular de los tumores puede identificar pacientes que puedan beneficiarse de la vacunación con FSP (terapia direccionada); y
- (f) la vacunación con FSP puede utilizarse como vacunación preventiva en grupos de alto riesgo.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Ilustración esquemática de inestabilidad de microsatélites codificantes resultante de la deficiencia en la reparación de errores del DNA (Kloor et al., 2010)

Proteínas truncadas que abarcan secuencias de FSP (rojo) se generan cuando las mutaciones de microsatélites codificantes conducen a alteraciones de marco de lectura de la traducción (ejemplo: la proteína TGFB2).

Figura 2: Respuestas de células T ilustrativas contra FSPs de nuevo diseño en sangre periférica de tres pacientes con cáncer de colon MSI

Figura 3: Las respuestas inmunes humerales contra FSPs derivados de AIM2 (-1), HT001 (-1), TAF1B (-1), y TGFB2 (-1)

ELISA reveló respuestas de anticuerpos específicos de FSP dirigidas contra neopéptidos derivados de AIM2 (-1), HT001 (-1), TAF1B (-1), y TGFB2 (-1). La especificidad de péptidos se demostró por preabsorción de los anticuerpos del suero respectivos como se ha descrito previamente (Reuschenbach et al., 2008).

Figura 4: Respuestas citotóxicas como se determinan por la expresión en la superficie de CD107a

(A) Se observaron respuestas específicas importantes de FSP en diferentes donantes sanos después de estimulación de las células T con el antígeno durante 4 semanas. Las respuestas ocurrían solo en presencia de células B presentadoras de antígeno y el antígeno FSP. Las respuestas representativas se muestran en gráficos de barras.

(B) Análisis FACS representativos del ensayo de CD107a para células T incubadas con células B como células presentadoras de antígeno en ausencia (panel izquierdo) o presencia (panel derecho) del antígeno FSP HT001 (-1).

Así pues, la presente invención proporciona una vacuna que contiene una combinación de péptidos de cambio de marco (FSP) específicos de tumor MSI, derivados de TAF1B (Acc. No. L39061), HT001 (Acc. No. AF113539) y AIM2 (Acc. No. AF024714), y, opcionalmente, además de TGFB2 (Acc. No. NM_003242) o un ácido nucleico que codifica dicho FSP en el que dichos FSP son capaces de suscitar una respuesta inmune contra el cáncer que exhibe MSI.

La vacuna de la presente invención contiene una combinación de FSP que comprende o está constituida por las secuencias de aminoácidos siguientes:

NTQIKALNRGLKKKILKKAGIGMCVKVSSIFFINKQKP (TAF1B(-1));
 EIFLPKGRSNSKKKGRNRIPAVLRTEGEPLHTPSVGMRETTGLGC (HT001(-1));
 HSTIKVIKAKKKHREVKRTNSSLVL (AIM2(-1));
 y, opcionalmente, además
 ASPKCMKEKKSLVRLSSCVVALMSAMTTSSSQKNITPAILTCC (TGFB2(-1)).

Una respuesta inmune se define como una condición que satisface al menos uno de los criterios siguientes: 1. La inducción de células T CD8-positivas, como puede detectarse por ensayos de citotoxicidad o secreción de IFN-gamma o expresión de perforina o expresión de granzima B u otras citocinas que pueden ser producidas por células T CD8-positivas, medible como superior al ruido de fondo por ELISpot o tinción de citocinas intracelulares o ELISA de citocinas o métodos equivalentes. 2. La inducción de células T CD4-positivas, como puede detectarse por secreción de citocinas medible como superior al ruido de fondo por ELISpot o tinción de citocinas intracelulares o ELISA de citocinas o métodos equivalentes. Las citocinas pueden comprender IF-alfa, IFN-gamma, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TNF-alfa, TGF-beta u otras citocinas que pueden ser producidas por células T CD4-

positivas. 3. La inducción de anticuerpos, como puede detectarse por transferencia Western, ELISA y métodos equivalentes o afines. 4. La inducción de cualquier clase de respuesta inmune celular no mediada por células T CD8-positivas o CD4-positivas, como se describe en 1 y 2.

- 5 En una realización más preferida, la vacuna de la presente invención comprende adicionalmente un adyuvante y una citocina o quimiocina inmunoestimuladora.

Adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero pueden ser también una sal de calcio, hierro o cinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente, o polifosfazenos. Otros adyuvantes conocidos incluyen oligonucleótidos que contienen CpG. Los oligonucleótidos se caracterizan porque el dinucleótido CpG no está metilado. Tales oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en WO 96/02555.

- 15 El uso de citocinas inmunoestimuladoras se ha convertido en un enfoque crecientemente prometedor en la quimioterapia del cáncer. El objetivo principal es la activación de linfocitos T específicos de tumores capaces de rechazar las células tumorales de pacientes con baja carga tumoral o proteger pacientes contra una recurrencia de la enfermedad. Estrategias que proporcionan niveles altos de citocinas inmunoestimuladoras localmente en el sitio del antígeno han demostrado eficacia preclínica y clínica. Citocinas inmunoestimuladoras preferidas comprenden IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IFNs, GM-CSF y TNF- α .

Las quimiocinas son proteínas pequeñas (7-16 kD), secretadas y estructuralmente afines que están implicadas en la quimiotaxis de leucocitos y células dendríticas, la desgranulación de PMN, y la quimiotaxis de células dendríticas, desgranulación de PMN, y angiogénesis. Las quimiocinas se producen durante la fase inicial de la respuesta del hospedador a lesión, alérgenos, antígenos, o microorganismos invasores. Las quimiocinas atraen selectivamente leucocitos a los focos de inflamación, induciendo a la vez migración y activación celulares. Las quimiocinas pueden mejorar la inmunidad innata o específica del hospedador contra los tumores y, por tanto, pueden ser útiles en combinación con un FSP.

- 30 La vacuna de la presente invención podría contener también un ácido nucleico que codifica el FSP para inmunización del DNA, una técnica utilizada para estimular eficientemente las respuestas inmunes humoral y celular frente a los antígenos proteínicos. La inyección directa de material genético en un hospedador vivo hace que una pequeña cantidad de sus células fabriquen los productos génicos introducidos. Esta expresión de genes inapropiados en el hospedador tiene consecuencias inmunológicas importantes, dando como resultado la activación inmune específica del hospedador contra el antígeno suministrado por el gen. La inyección directa del DNA plasmídico desnudo induce respuestas inmunes potentes al antígeno codificado por el gen Vaccine. Una vez que se inyecta el constructo de DNA plasmídico, las células hospedadoras absorben el DNA extraño, expresando el gen viral y produciendo el FSP en el interior de la célula. Esta forma de presentación y procesamiento del antígeno induce a la vez respuestas inmunes celulares y humorales restringidas por el MHC tanto como Clase I y Clase II. Las vacunas de DNA están compuestas de vectores que contienen normalmente dos unidades: la unidad de expresión de antígeno compuesta de secuencias promotor/intensificador, seguidas por secuencias de codificación y poliadenilación del FSP del antígeno y la unidad de producción compuesta de secuencias necesarias para amplificación y selección del vector. La construcción de vectores con inserciones de vacuna se realiza utilizando tecnología de DNA recombinante, y las personas expertas en la técnica son conocedoras de vectores que pueden ser utilizados para este enfoque. La eficiencia de inmunización del DNA puede mejorarse por estabilización del DNA contra la degradación, y aumento de la eficiencia del suministro de DNA a las células presentadoras de antígeno. Esto se ha demostrado por recubrimiento de micropartículas catiónicas biodegradables (tales como poli(lactida-co-glicolida) formuladas con bromuro de cetiltrimetilamonio) con DNA. Tales micropartículas recubiertas de DNA pueden ser tan eficaces para aumentar CTL como los virus Vaccinia recombinantes, especialmente cuando se mezclan con alumbre. Las partículas de 300 nanómetros de diámetro parecen ser las más eficientes para ser absorbidas por las células presentadoras de antígeno.

Una diversidad de vectores de expresión, v.g. plásmidos o vectores virales, pueden ser utilizados para contener y expresar secuencias de ácido nucleico que codifican un FSP de la presente invención.

- 55 Un vector viral preferido es un poxvirus, adenovirus, retrovirus, herpesvirus o virus adenoasociado (AAV). Poxvirus particularmente preferidos son un virus Vaccinia, NYVAC, avipox virus, ALVAC, ALVAC(2), poxvirus de las aves, o TROVAC.

- 60 Se han utilizado también vectores basados en alfavirus recombinantes basados en alfavirus para mejorar la eficiencia de la vacunación de DNA. El gen que codifica el FSP se inserta en el replicón del alfavirus, reemplazando genes estructurales pero dejando intactos los genes de replicasa no estructurales. El virus Sindbis y el virus del Bosque de Semliki han sido utilizados para construir replicones de alfavirus recombinantes. Sin embargo, al contrario que las vacunaciones convencionales con DNA, los vectores de alfavirus se expresan solo transitoriamente. Los replicones de alfavirus generan una respuesta inmune debido a los altos niveles de proteína

expresada por este vector, respuestas de citocinas inducidas por el replicón, o apoptosis inducida por el replicón que conduce a una absorción incrementada de antígeno por las células dendríticas.

En una realización adicional preferida, el FSP contiene una secuencia Tag, preferiblemente en el término C, que podría ser útil para purificación de un FSP producido recombinantemente. Una secuencia Tag preferida es una His-Tag. Una His-Tag particularmente preferida consta de 6 residuos His.

La vacuna de la presente invención se administra en una cantidad adecuada para inmunización de un individuo y, preferiblemente, contiene además uno o más agentes auxiliares comunes. El término empleado "cantidad adecuada para inmunización de un individuo" comprende cualquier cantidad de FSP con la cual puede ser inmunizado un individuo. La cantidad depende de si la inmunización tiene por objeto un tratamiento profiláctico o terapéutico. Adicionalmente, la edad, el sexo y el peso del individuo juegan un papel para determinar la cantidad. Así, la cantidad adecuada para inmunización de un individuo se refiere a cantidades de los ingredientes activos que son suficientes para afectar al curso y la gravedad del tumor, conduciendo a la reducción o remisión de dicha patología. Una "cantidad adecuada para inmunización de un individuo" puede determinarse utilizando métodos conocidos por un experto en la técnica (véase por ejemplo Fingl et al., 1975). El término "individuo", como se utiliza en esta memoria, comprende un individuo de cualquier clase y que es susceptible de caer enfermo con carcinomas. Ejemplos de tales individuos son humanos y animales, así como células de los mismos.

La administración de la vacuna por inyección puede hacerse en varios sitios del individuo por vía intramuscular, subcutánea, intradérmica o en cualquier otra forma de administración. Puede ser también favorable realizar una o más "inyecciones de refuerzo" que tienen cantidades aproximadamente iguales.

El término empleado "agentes auxiliares comunes" comprende cualesquiera agentes auxiliares adecuados para una vacuna destinada a inmunizar a un individuo. Tales agentes auxiliares son, v.g., soluciones tamponadas de sal común, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, agentes humectantes, soluciones estériles, etc.

Un FSP, secuencia de ácido nucleico o vector de la presente invención puede estar presente en la vacuna como tal o en combinación con portadores. Es favorable que los portadores presentes en el individuo no sean inmunógenos. Tales portadores pueden ser las propias proteínas del individuo o proteínas extrañas o fragmentos de las mismas. Se prefieren portadores tales como seroalbúmina, fibrinógeno o transferrina o un fragmento de los mismos.

La vacuna de la presente invención puede ser terapéutica, es decir los compuestos se administran para tratar un cáncer existente, o para prevenir la recurrencia de un cáncer, o profiláctica, o sea que los compuestos se administran para prevenir o retardar el desarrollo de un cáncer. Si las composiciones se utilizan terapéuticamente, las mismas se administran a pacientes de cáncer y están diseñadas para suscitar una respuesta inmune con objeto de estabilizar un tumor por prevención o ralentización del crecimiento del cáncer existente, a fin de prevenir la propagación de un tumor o de metástasis, reducir el tamaño del tumor, prevenir la recurrencia de un cáncer tratado, o eliminar células de cáncer no destruidas por tratamientos anteriores. Una vacuna utilizada como tratamiento profiláctico se administra a individuos que no tienen cáncer, y están diseñadas para provocar una respuesta inmune con objeto de direccionarse a células cancerosas potenciales.

La presente invención se refiere también al uso de FSP, secuencia de ácido nucleico o vector como se ha definido arriba para la producción de una vacuna para la prevención de un carcinoma, v.g., vacunación preventiva de un grupo de alto riesgo, o tratamiento de un carcinoma. Por ejemplo, éstos pueden ser un cáncer colorrectal, preferiblemente un cáncer colorrectal hereditario distinto de poliposis (HNPCC), un cáncer endometrial, un cáncer gástrico o cáncer del intestino delgado.

Por medio de la presente invención es posible inmunizar individuos, en particular humanos y animales. La inmunización tiene lugar a la vez por inducción de anticuerpos y estimulación de células T CD8⁺. De este modo es posible realizar pasos profilácticos y terapéuticos contra los carcinomas.

Los ejemplos que siguen explican la invención con mayor detalle.

Ejemplo 1

Detección de células T específicas de FSP en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon MSI y portadores de mutación HNPCC sanos

(A) Métodos (ensayo ELISpot)

Se cuantificaron las frecuencias de células T periféricas específicas de FSP (pTc) por determinación del número de Tc secretoras de IFN-gamma específicas contra FSPs de nuevo diseño derivadas de tres genes candidato que contenían cMS utilizando análisis ELISpot. Los ensayos ELISpot se realizaron utilizando placas de nitrocelulosa de 96 pocillos (Multiscreen; Millipore, Bedford, MA) recubiertas durante una noche con anticuerpos monoclonales (mAb)

IFN-gamma antihumanos de ratón (Mabtech, Nacka, Suecia) y bloqueados con medio que contenía suero. Las PTc (día 0, 1×10^5 /pocillo) se extendieron en placas 6 veces con células B autólogas activadas con CD40 (4×10^4 /pocillo, TiBc o pBc, respectivamente) como células presentadoras de antígeno en 200 μ l de IMDM con 10% de suero AB humano. Los péptidos se añadieron a una concentración final de 10 μ g/ml. Como control positivo, las pTc se trataron con 20 nanomoles/L de 12-miristato-13-acetato de forbol en combinación con 350 nanomoles/L de ionomicina. Después de incubación durante 24 horas a 37°C, las placas se lavaron concienzudamente, se incubaron con mAb IFN-gamma antihumano biotinilado de conejo durante 4 horas, se lavaron de nuevo y se incubaron con estreptavidina-fosfatasa alcalina durante 2 horas, seguido por un paso final de lavado. Las manchas se detectaron por incubación con NBT/BCIP (Sigma-Aldrich) durante 1 hora, se paró la reacción con agua, y, después de secado, se contaron las manchas microscópicamente. Los métodos han sido descritos en detalle en Schwitalle et al., 2008.

(B) Resultados

Para examinar si las respuestas de las células T específicas de FSP eran detectables en la sangre periférica de pacientes de CRC MSI-H, se realizaron análisis ELISpot. Se utilizaron como células presentadoras de antígeno pBc autólogas, que tenían expresión fuerte de mHC Clase I y Clase II y coestimuladores (CD40, CD80, y CD86) así como antígenos específicos de células B (CD19 y CD23).

Se observaron reactividades acusadas contra FSPs de nuevo diseño derivados de AIM2 (-1), HT001 (-1), TAF1B (-1), y TGFB2 (-1):

TAF1B(-1) NTQIKALNRGLKKKTILKKAGIGMCVKVSSIFFINKQKP
 HT001(-1) EIFLPKGRSNSKKKGRRNRIPAVLRTEGEPLHTPSVGMRETTGLGC
 AIM2(-1) HSTIKVIKAKKKHREVKRTNSSLV
 TGFB2(-1) ASPKCIMKEKSLVRLSSCVPALMSAMTTSSSQKNITPAILTCC
 (las secuencias de neopéptidos están subrayadas)

Los resultados obtenidos de los pacientes (n = 8) se resumen en la Tabla 1. Los resultados representativos de ELISpot se muestran en la Figura 2.

Tabla 1

Respuestas de las células T específicas de FSP contra FSPs					
ID del paciente	Sin péptido	TAF1B (-1)	HT001 (-1)	AIM2 (-1)	TGFB2 (-1)
MSI01	4	8,17	5,83	3,5	6
MSI02	1,5	4,83	7,33	7,17	1,2
MSI03	11,83	28,17	31,83	23,33	10,16
MSI04	5,5	13	14,17	11,83	8,75
MSI05	3	7,75	16	10	2,8
MSI06	3,17	12	12,33	13,83	5,2
MSI07	6	17	16,83	14,5	9,33
MC01	1,17	3,5	3,5	3	8
MC02	1,67	2,83	5,83	4	3,33
MC03	0,83	1,17	1,17	2,17	4,4
MC04	15,17	18,83	18,67	15,17	20,75
MC05	0,33	3,17	2,17	1,33	5,67
MC06	30,5	37,83	37,8	34,83	39,5

Los números medios de mancha de análisis replicados se dan para cada péptido y se ensayan individualmente. MSI01 MSI07 - pacientes con CRC MSI-H, MC01-MC06 - portador de la mutación en la línea germinal HNPCC sana.

Ejemplo 2

Detección de respuestas inmunes humorales específicas de FSP en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon MSI y portadores de la mutación HNPCC sanos

(A) Métodos (ELISA)

Para el ensayo de inmunosorbente unido a enzima (ELISA), los péptidos se aplicaron como capa sobre placas de microtitulación de 96 pocillos con poliestireno "Maxisorp" (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a una concentración de 40 µg/ml en PBS durante una noche a 4°C. Después del recubrimiento, las placas se lavaron 4 veces con PBS (0.05% Tween) y se bloquearon durante 1 hora con caseína al 0.5% en PBS. La fijación de los péptidos a las placas de microtitulación y la concentración de péptidos saturante óptima se evaluaron utilizando un ensayo de competición fosfatasa alcalina-péptido. Para monitorizar la reactividad de fondo individual de cada suero, se utilizó un péptido de control derivado de la proteína p16^{INK4a} (p16_76-105), contra el cual no se encontró reactividad de anticuerpo alguno en un gran grupo de individuos (Reuschenbach et al., 2008). Cada suero se diluyó 1:100 en tampón de bloqueo (caseína al 0,5% en PBS) y se testó por duplicado respecto a la presencia de anticuerpos contra todos los FSPs y el péptido de control. Como referencia para la varianza inter-placas, se incluyó en cada placa un suero de control, y se utilizaron ODs específicas de péptido del suero de control para normalización. Los sueros diluidos (50 µl/pocillo) se incubaron durante 1 hora, y después de un paso de lavado las placas se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana de conejo marcado con HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; 1:10.000 en tampón de bloqueo) durante 1 hora. Después del lavado, se añadieron 50 µl/pocillo de sustrato TMB (Sigma, Deisenhofen, Alemania) y la reacción enzimática se paró después de 30 minutos por adición de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 1N. Se midió la absorción a 450 nm (longitud de onda de referencia 595 nm). La preabsorción de los anticuerpos del suero para control de especificidad se realizó conforme al método descrito en detalle en Reuschenbach et al., 2008.

(B) Resultados

Para examinar si eran detectables anticuerpos específicos de FSP en la sangre periférica de pacientes de CRC MSI-H, se realizaron análisis de portadores sanos de la mutación de Lynch, y análisis ELISA de controles sanos. Se observaron reactividades pronunciadas contra los FSPs de nuevo diseño derivados de AIM2 (-1), HT001 (-1), DAF1B (-1), y TGFB2 (-1). Los resultados de los ensayos ELISA se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 3**Detección de respuesta de las células T citotóxicas específicas de FSP**

Se midió la expresión en superficie de CD107a en células T efectoras después de estimulación con antígenos FSP clínicos. Se utilizaron ensayos de CD107a para demostrar la secreción de gránulos citotóxicos que contenían perforina/granzima B de células efectoras. Las moléculas CD107a se expresan en la superficie de los gránulos citotóxicos y se hacen detectables en la superficie celular si los gránulos se liberan en el contexto de una respuesta de células T citotóxicas.

Para determinar el potencial de los péptidos FSP para inducir una respuesta inmune celular citotóxica, se extrajo sangre de donantes sanos, y se estimularon las células T con los FSPs utilizando células dendríticas como células presentadoras de antígeno. La estimulación se repitió semanalmente y a lo largo de un período de tiempo de 4 semanas. Después de 4 semanas, se recogieron las células T y se coincubaron con células diana, y se utilizó un ensayo de FSPs CD107a para analizar la inducción específica de péptido de una respuesta de las células T citotóxicas.

Se observaron respuestas citotóxicas tal como se determinó por la expresión en superficie de CD107a para las células T coincubadas con células B como células presentadoras de antígeno en presencia del FSP antigénico (Figura 4A). Se observaron respuestas significativas en diferentes donantes sanos después de estimulación de las células T con el antígeno durante 4 semanas. Las respuestas representativas se muestran en gráficos de barras. La Figura 4B muestra el análisis FACS representativo del ensayo CD107a para las células T incubadas con células B como células presentadoras de antígeno en ausencia (panel izquierdo) o presencia (panel derecho) del antígeno FSP HT001 (-1).

Referencias

- Cunningham and Wells, Science 244 (1989), 1081-1085.
- Fingl et al., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., New York, pp. 1-46 (1975).
- Kloor M, Michel S, von Knebel Doeberitz M. Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. Int J Cancer. 2010 Mar 2. [Epub ahead of print]
- Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan YP, Bork P, von Knebel Doeberitz M. Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. Int J Cancer. 2001 Jul 1; 93(1):6-11.
- Reuschenbach M, Waterboer T, Wallin KL, Einenkel J, Dillner J, Hamsikova E, Eschenbach D, Zimmer H, Heilig B, Kopitz J, Pawlita M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N. Characterization of humoral immune responses against p16, p53, HPV16 E6 and HPV16 E7 in patients with HPV-associated cancers. Int J Cancer. 2008 Dec 1;123(11):2626-31.

Reuschenbach M, Kloor M, Morak M, Wentzensen N, Germann A, Garbe Y, Tariverdian M, Findeisen P, Neumaier M, Holinski-Feder E, von Knebel Doeberitz M.

Serum antibodies against frameshift peptides in microsatellite unstable colorectal cancer patients with Lynch syndrome.

5 Fam Cancer. 2009 Dec 2. [Epub ahead of print]

Ripberger E, Linnebacher M, Schwitalle Y, Gebert J, von Knebel Doeberitz M. Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene. J Clin Immunol. 2003 Sep;23(5):415-23.

10 Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, Tariverdian M, Benner A, von Knebel Doeberitz M. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. Gastroenterology. 2008 Apr;134(4):988-97.

Schwitalle Y, Linnebacher M, Ripberger E, Gebert J, von Knebel Doeberitz M. Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. Cancer Immun. 2004 Nov 25;4:14.

15

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que contiene una combinación de péptidos de cambio de marco (FSP) específicos de MSI que comprende las secuencias de aminoácidos siguientes:

NTQIKALNRGLKKKTILKKAGIGMCVKVSSIFFINKQKP (TAF1B (-1));
 EIFLPKGRSNSKKKGRRNRIPAVLRTEGEPLHTPSVGMRETTGLGC (HT001 (-1)); y
 HSTIKVIKAKKKHREVKRTNSSLV (AIM2 (-1)).

2. La vacuna de la reivindicación 1, que contiene adicionalmente un FSP que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

ASPKCIMKEKSLVRLSSCPVALMSAMTTSSSQKNITPAILTCC (TGFB2 (-1)).

3. La vacuna de la reivindicación 1 ó 2, en donde el FSP contiene adicionalmente una secuencia Tag.

4. Una vacuna que contiene (i) las secuencias de ácido nucleico que codifican el FSP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o (ii) vector(es) que contiene(n) dichas secuencias de ácido nucleico.

5. La vacuna de la reivindicación 4, en la cual dicho vector es un plásmido o vector viral.

6. La vacuna de la reivindicación 5, en la cual dicho vector viral es un vector basado en poxvirus, adenovirus, retrovirus, herpesvirus, alfavirus o virus adenoasociado (AAV).

7. La vacuna de la reivindicación 6, en la cual dicho poxvirus es un virus Vaccinia, NYVAC, avipoxvirus, canarypox virus, ALVAC, ALVAC(2), poxvirus de las aves o TROVAC.

8. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende adicionalmente una citocina o quimiocina adyuvante y/o inmunoestimuladora.

9. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la cual el compuesto activo está presente en un vehículo de emulsión de aceite en agua o de agua en aceite.

10. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende adicionalmente uno o más antígenos distintos.

11. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en un método para la prevención o tratamiento de un tumor.

12. Uso de los péptidos de cambio de marco (FSP) específicos de tumor MSI que se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico que se define en la reivindicación 4, o el vector que se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para la preparación de una vacuna para la prevención o el tratamiento de un tumor.

13. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para el uso de la reivindicación 11 ó 12 por vacunación preventiva de grupos de alto riesgo.

14. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para el uso conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la cual el tumor es cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer gástrico o cáncer de intestino delgado.

15. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para el uso conforme a la reivindicación 14, en la cual el cáncer colorrectal es cáncer colorrectal hereditario distinto de poliposis (HNPCC).

Figura 1

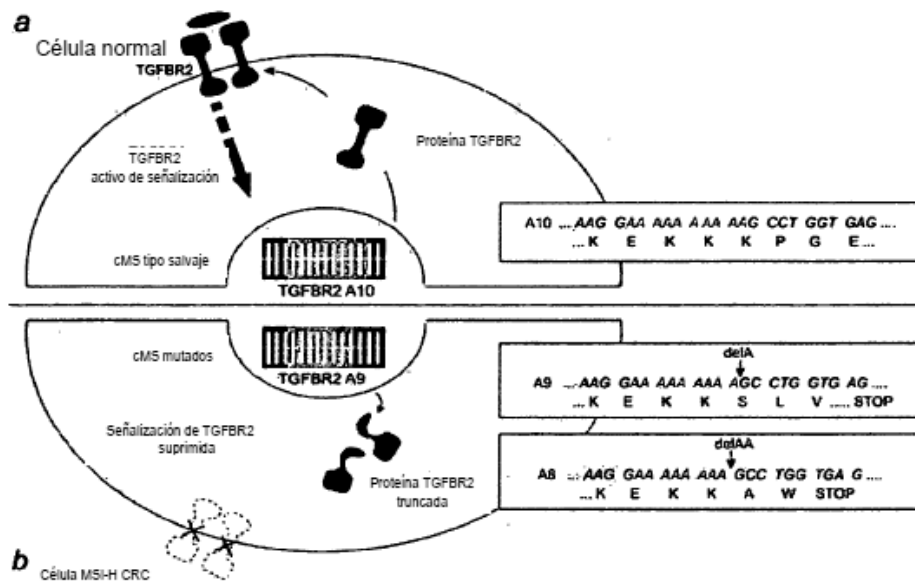


Figura 2

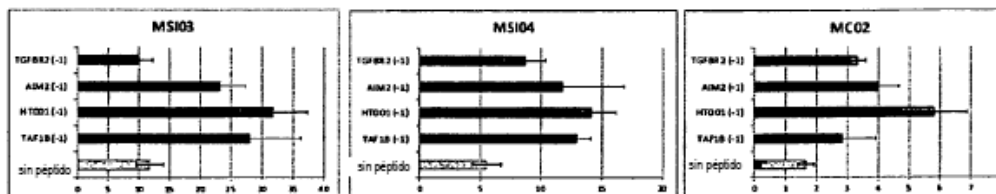
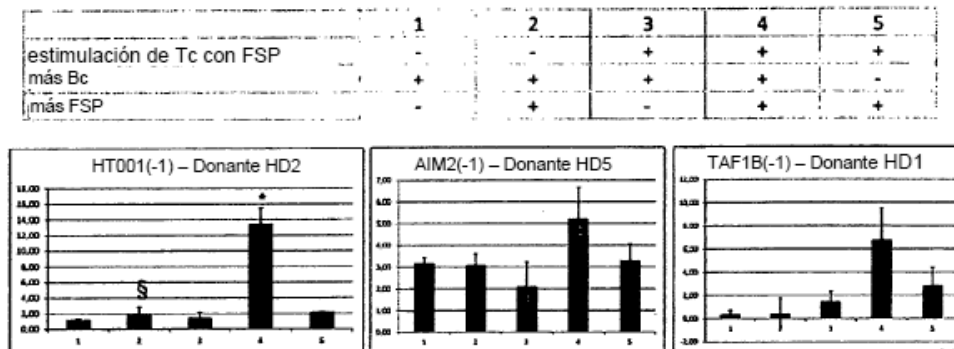


Figura 3

	AIM2(-1)	TAF1B(-1)	HT001(-1)	TGFBR2(-1)
Pacientes:	10.1%	13.0%	8.7%	14.0%
n=69				
Portadores de mutación sanos:	9.7%	12.9%	3.2%	11.1%
n=31				
controles sanos:	9.6%	3.8%	15.4%	5.8%
n=52				

Figura 4

A.



B.

