

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 411**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10008550 .5**
- 96 Fecha de presentación: **27.09.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2260862**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2010**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de tumores que presentan antígenos survivina**

30 Prioridad:
27.09.2005 US 721199 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.08.2012

73 Titular/es:
**Merck Patent GmbH
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:
**Gillies, Stephen D.;
Hettmann, Thore A.O.;
Stein, Pascal André y
Klinz, Stephan G.**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 386 411 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

Composiciones y métodos para el tratamiento de tumores que presentan antígenos survivina.

Área de la invención.

5 La presente invención hace referencia a estrategias de vacunación para el tratamiento de tumores. De manera específica, la presente invención hace referencia a composiciones de vacuna que estimulan en un humano una respuesta inmune a la survivina humana, atacando, por tanto, células tumorales que sobreexpresan la survivina. En particular, la presente invención hace referencia a composiciones de vacuna que comprenden péptidos derivados de survivina no mamífera, además de survivina de mamíferos modificada, en especial humana.

Esta solicitud es una solicitud divisional de la EP 06 805 883.3, registrada el 27/09/2006.

10 Antecedentes.

El sistema inmunológico realiza su función de vigilancia en parte monitorizando las composiciones proteicas de las células. En un proceso denominado presentación antigénica a linfocitos T, las proteínas en el interior de una célula se procesan en péptidos. Un subgrupo de los péptidos procesados, los antígenos, se exportan a la superficie celular, en una asociación específica con un miembro de un tipo de receptores conocidos como receptores del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). Estos complejos MHC-péptido son muestreados por inmunocitos especializados, los linfocitos T, mediante una interacción con las proteínas de la superficie de los linfocitos T, conocidas como Receptores de Linfocitos T (TCR, del inglés T Cell Receptor). Cada linfocito T dado lleva un único TCR en su superficie. Ante una interacción productiva del TCR del linfocito T con el complejo MHC-péptido se activa una respuesta inmune, la cual conduce a la eliminación de la célula que presenta ese complejo MHC-péptido en particular. Por lo general, la interacción es no productiva si los antígenos presentados se derivan del huésped, los llamados autoantígenos. Comúnmente, las respuestas inmunes se activan por la interacción con un antígeno derivado de una proteína foránea, por ejemplo, con un antígeno derivado de una proteína constituyente de un virus infectante.

25 El objetivo del tratamiento de tumores mediante inmunización activa es inducir el sistema inmunológico para que reconozca y elimine las células tumorales. Al igual que ocurre en cualquier otra célula, los antígenos peptídicos en las células tumorales se derivan del repertorio de proteínas expresadas. Los antígenos tumorales enriquecidos, derivados de proteínas expresadas diferencialmente en tumores, son en principio una diana de la vigilancia inmunológica, igual que los antígenos víricos lo son de las células infectadas. Por consiguiente, resultaría de utilidad aprovechar ramas del sistema inmunológico que han evolucionado para hacer frente a una infección intracelular con el propósito de eliminar un tumor.

30 Una proteína tumoral enriquecida de ese tipo es la survivina. Las células tumorales a menudo sobreexpresan la proteína survivina, la cual se cree que bloquea la apoptosis y, por tanto, interfiere con los mecanismos que evitan el crecimiento anormal de las células tumorales. Las células normales, por otro lado, expresan muy poca survivina (ver, por ejemplo, Ambrosini et al., (1997) Nat. Med., 3:917-921). Por lo tanto, la survivina es un antígeno tumoral específico o un antígeno tumoral enriquecido ideal. Resultaría de utilidad administrar una forma antigénica de la proteína survivina a células presentadoras de antígenos, de manera que pueda estimularse una respuesta inmune a la survivina. Sin embargo, en contraste con células infectadas con virus, la survivina, al igual que otras proteínas expresadas diferencialmente en tumores, son proteínas del anfitrión y no activan el sistema inmunológico. Por lo tanto, persiste una necesidad en el arte de desarrollar composiciones y métodos efectivos que provoquen una respuesta inmune efectiva a las células tumorales, en particular a aquellas caracterizadas con la sobreexpresión de survivina.

Resumen de la invención.

45 La presente invención proporciona composiciones y métodos efectivos que provocan una respuesta inmune efectiva a células tumorales. De manera específica, la presente invención proporciona estrategias de vacunación, utilizando formas antigénicas de proteínas tumorales enriquecidas como antígenos de linfocitos T. En particular, la presente invención proporciona una forma antigénica de una proteína tumoral enriquecida, survivina, preferentemente survivina humana.

50 La presente invención hace referencia a una vacuna que incluye un ácido nucleico que codifica un péptido de survivina humana modificada. De manera alternativa, la presente invención hace referencia a una vacuna que incluye un péptido de survivina humana modificada. El péptido de survivina humana modificada es biológicamente inerte, pero inmunológicamente similar a la survivina humana. Tal como se utiliza en la presente patente, mediante "biólogicamente inerte" se entiende un péptido de survivina que no es capaz, sustancialmente, de provocar un efecto sobre, o ejercer una actividad habitualmente asociada con, la survivina normal. Por ejemplo, un péptido de survivina

“biológicamente inerte” no presenta una actividad apoptótica considerable, ni es capaz de interferir de manera considerable con una actividad anti-apoptótica, asociada de manera habitual con una proteína survivina endógena. Una survivina biológicamente inerte no tendría, de forma habitual, un efecto dominante negativo considerable. Tal como se utiliza en la presente patente, por “inmunológicamente similar a la survivina humana” se entiende un péptido de survivina modificada capaz de provocar, al menos, una respuesta inmune a la misma secuencia diana que el correspondiente péptido de survivina humana no modificada. Una respuesta inmune puede medirse, por ejemplo, por la población de células CD8+ linfocitos T, o por la liberación de IFN γ por parte de las células CD8+ linfocitos T, en respuesta a una secuencia diana.

En un modo de realización preferente, la vacuna de la invención incluye un ácido nucleico que codifica un péptido de survivina humana modificada. El ácido nucleico puede incluir un promotor de mamífero. En otro modo de realización, el ácido nucleico es un ADN desnudo. En otro modo de realización, el ácido nucleico está formulado con un reactivo que mejora la transfección de células de mamíferos. La vacuna de la presente invención puede también incluir un adyuvante.

En un modo de realización, el ácido nucleico que codifica un péptido de survivina humana modificada es parte de una partícula vírica, por ejemplo, una partícula adenoviral. Las partículas adenovirales adecuadas para la invención incluyen aquellas derivadas de adenovirus capaces de replicación, o aquellas derivadas de adenovirus de replicación condicional (“CRAD”, del inglés Conditionally Replicating Adenoviruses), que replican solamente en ciertas células o únicamente bajo determinadas condiciones, o aquellas derivadas de adenovirus que son incompetentes para la replicación. Otras partículas víricas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, partículas víricas derivadas de lentivirus u otros virus ARN, virus adeno-asociados, rotavirus, o virus Vaccinia (o virus vacuna), por nombrar algunos.

En un modo de realización, la vacuna incluye una bacteria que contiene el ácido nucleico que codifica un péptido de survivina humana modificada. De manera preferente, la bacteria es una bacteria entérica, tal como la Salmonella, Escherichia, o Klebsiella. Otras bacterias, tales como la especie Listeria, pueden también utilizarse para hospedar tales ácidos nucleicos. La bacteria puede ser una bacteria de tipo silvestre o puede contener mutaciones que, por ejemplo, atenúen su patogenicidad. En general, se prefiere utilizar una forma mutante de una bacteria, tal como por ejemplo un auxótrofo.

En otro modo de realización preferente, la vacuna de la invención incluye un péptido de survivina humana modificada. De manera preferente, el péptido de survivina humana modificada incluye un dominio BIR modificado. El dominio BIR puede incluir, al menos, una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a Arg18, Cys57, Cys60, His77 y Cys84 de la survivina humana. De manera alternativa, o adicional el péptido de survivina humana modificada incluye un dominio helicoidal modificado. El dominio helicoidal modificado puede incluir al menos una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a Lys 122, Ala128, y Ile 135 de la survivina humana. Por ejemplo, el dominio helicoidal modificado puede contener un Pro en una posición correspondiente a Ala 128 de la survivina humana. El dominio helicoidal modificado puede, además, incluir un Pro en una posición correspondiente a Ile 135. El péptido de survivina humana modificada contiene, de manera preferente, uno o más epítopos de linfocitos T del MHC de clase I. Por ejemplo, el péptido de survivina humana modificada puede incluir la secuencia de aminoácidos LTLGEFLKL (SEQ ID NO: 1) o LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 6).

En algunos modos de realización, el péptido de survivina humana modificada se fusiona a una fracción Fc. Una fracción Fc preferente se deriva de una región Fc de un mamífero, de manera más preferente de una región Fc humana. La fracción Fc puede contener mutaciones que mejoran el ensamblaje, por ejemplo, la sustitución de la cisteína en la secuencia EPKSCDK (SEQ ID NO: 4) de la región bisagra de la IgG1 con una serina. Como resultado, la fracción Fc puede contener una secuencia modificada EPKSSDK (SEQ ID NO: 5). La fracción Fc puede además contener mutaciones que reduzcan la inmunogenicidad de las regiones para las que una respuesta inmune no se desea, por ejemplo, la unión entre las fracciones de proteínas de fusión.

En ciertos modos de realización, el péptido de survivina humana modificada funciona en concierto con una molécula efectora que contribuye a la respuesta inmune. Por ejemplo, una molécula efectora de ese tipo puede ser una fracción de citocina que incluye, pero no se limita a, IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, GM-CSF, o cualquier otra citocina, en particular una capaz de activar una respuesta inmune Th1. Una molécula efectora tal, puede también ser un inhibidor de una citocina que reprime el sistema inmunológico, por ejemplo, un inhibidor STAT3 (por ejemplo, una proteína STAT3 dominante negativa, tal como STAT3 β). Las citocinas u otras moléculas efectoras pueden también contener mutaciones. Por ejemplo, una citocina puede contener una sustitución Ser en una posición correspondiente a Cys125 de la IL-2.

Por tanto, en modos de realización preferentes, la vacuna de la invención incluye un ácido nucleico que codifica un péptido de survivina humana modificada, y un segundo péptido que incluye una molécula efectora descrita con anterioridad que contribuye a la respuesta inmune. Las regiones que codifican el péptido de survivina humana modificada y el péptido de la molécula efectora, pueden estar en una única unidad de transcripción, o en dos unidades de transcripción distintas. De manera alternativa, la vacuna de la invención incluye un ácido nucleico que

codifica un péptido de survivina humana modificada, y un ácido nucleico diferente que codifica un segundo péptido que incluye una molécula efectora, descrita con anterioridad, que contribuye a la respuesta inmune.

En otros modos de realización, la vacuna de la invención incluye un péptido de survivina humana modificada, y un segundo péptido que incluye una molécula efectora, descrita con anterioridad, que contribuye a la respuesta inmune.

5 En otro modo de realización, el péptido de survivina humana modificada se fusiona o se conjuga al péptido que incluye una molécula efectora. La proteína de fusión del péptido de survivina humana modificada y la molécula efectora, pueden fusionarse o conjugarse adicionalmente a una fracción Fc, tal como se ha descrito con anterioridad.

10 En otro aspecto, la presente invención hace referencia a un ácido nucleico capaz de provocar una respuesta inmune contra las células que expresan la survivina humana. El ácido nucleico codifica un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos con más del 50% de identidad, pero menos del 80% de identidad, con el dominio BIR de la survivina humana, y el ácido nucleico contiene un promotor capaz de expresar el péptido en una célula de mamíferos.

15 La presente invención hace referencia, además, a un método de tratamiento que comprende administrar una vacuna o un ácido nucleico tal como se ha descrito con anterioridad. En particular, la presente invención proporciona métodos de tratamiento para el cáncer y otras enfermedades que implican la proliferación celular no deseada. Los métodos de tratamiento de la invención pueden, de manera opcional, incluir otros pasos, por ejemplo, un paso de someter a pruebas, en primer lugar, el tumor de un paciente para determinar la expresión de niveles altos de survivina. Otro paso opcional es el tratamiento previo del paciente con un agente inmunosupresor, tal como por ejemplo una dosis baja de ciclofosfamida, antes de administrar una vacuna o un ácido nucleico de la invención. Sin
20 la intención de estar sujetos a la teoría, un efecto de un tratamiento previo de este tipo es la reducción de la cantidad de linfocitos T reguladores. Por lo tanto, otros tratamientos previos que tengan un efecto similar quedan abarcados en la presente invención.

25 Además de a la survivina, la presente invención puede ser aplicada a una amplia variedad de proteínas que puedan ser utilizadas como antígenos, tales como antígenos tumorales específicos, antígenos víricos, y otros antígenos. Entre los antígenos tumorales específicos, además de a la survivina, la presente invención puede ser aplicada a moléculas de adhesión de células epiteliales, oncogenes tales como Ras, antígeno carcinoembrionario, y otras proteínas tumorales específicas o enriquecidas. Entre los antígenos víricos, la invención puede ser aplicada al p24 del VIH, hemaglutinina de la gripe, y otras proteínas víricas.

En resumen la invención hace referencia a los siguientes elementos:

30 Aunque la presente solicitud de patente se encuentra focalizada de manera específica en survivina de mamíferos, preferentemente humana, a continuación, los apartados de Figuras, Descripción Detallada y Ejemplos contienen datos y resultados procedentes de survivina no humana además de survivina humana.

Esta información adicional se proporciona con fines ilustrativos y comparativos.

Breve descripción de los dibujos.

35 La Figura 1 es un alineamiento de secuencias de proteínas de homólogos de survivina. Los alineamientos se realizaron mediante el método ClustalW (ver Thompson et al. (1994) Nucl. Acid Res. 22:4673-4680). Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos NCBI, utilizando los siguientes números de Acceso: survivina humana (Accesión #: NM_001168, SEQ ID NO:8), survivina de perro (NP_001003019, SEQ ID NO:9), survivina de cerdo (NP_999306, SEQ ID NO:39), survivina de vaca (NP_001001855, SEQ ID NO:40), survivina de gato (NP_001009280, SEQ ID NO:41), survivina de ratón (NP_033819, SEQ ID NO:10), survivina de rata (AAF82586, SEQ ID NO:42), survivina de orangután (CAH91231, SEQ ID NO:43), survivina de pollo (NP_001012318, SEQ ID NO:11), Xenopus laevis SIX (o rana africana de uñas) (AAO20085, SEQ ID NO:13), homólogo de survivina de Xenopus laevis (AAM76714, SEQ ID NO:46), homólogo 2 de survivina de Xenopus laevis (AAH89271, SEQ ID NO:47), homólogo de survivina de siluro (CK419466, SEQ ID NO:52), homólogo de survivina de pez cebra (NP_919378, SEQ ID NO:48), homólogo 2 de survivina de pez cebra (NP_660196, SEQ ID NO:49), homólogo similar a la survivina de pez globo (CAG04432, SEQ ID NO:50), y homólogo 2 similar a la survivina de pez globo (CAG07433, SEQ ID NO:51). El dominio BIR está subrayado; los asteriscos indican los residuos distintivos que se encuentran implicados en la coordinación del Zn; y los guiones indican huecos en el alineamiento. En las secuencias no humanas, los residuos que son idénticos a los residuos humanos están representados por periodos; otros
45 residuos están representados en el código de aminoácidos de una letra.

La Figura 2 es una tabla del porcentaje de identidades de aminoácidos para la comparación de los dominios BIR de varios homólogos de survivina. La secuencia 1 es la secuencia humana; la secuencia 2 procede de un perro; la secuencia 3 procede de un cerdo; la secuencia 4 procede de una vaca; la secuencia 5 procede de un gato; la secuencia 6 procede de un ratón; la secuencia 7 procede de una rata; la secuencia 8 procede de un orangután; la

5 secuencia 9 procede de un pollo; la secuencia 10 procede de la proteína de la rana *Xenopus laevis* SIX; la secuencia 11 procede de un homólogo de rana *Xenopus laevis*; la secuencia 12 procede de un homólogo 2 de una rana *Xenopus laevis*; la secuencia 13 procede de un homólogo de un siluro; la secuencia 14 procede de un homólogo de pez cebra; la secuencia 15 procede de un homólogo 2 de pez cebra; la secuencia 16 procede de una proteína similar a la survivina 1 de un pez globo; y la secuencia 17 procede de una proteína similar a la survivina 2 de un pez globo.

10 La Figura 3 es un alineamiento de secuencias del dominio BIR de invertebrados con la survivina humana. La secuencia del dominio BIR de la survivina humana se muestra en SEQ ID NO:63. Los alineamientos se llevaron a cabo mediante el método ClustalW (ver Thompson et al. (1994) Nucl. Acid Res. 22:4673-4680). Las secuencias se obtuvieron de la base de datos NCBI, utilizando los siguientes números de acceso: survivina humana (NM_001168, secuencia del dominio BIR mostrada en SEQ ID NO:63), *D. melanogaster* (AAF55399, secuencia del dominio BIR mostrada en SEQ ID NO:53) y *C. elegans* (NP_505949, secuencia del dominio BIR mostrada en SEQ ID NO:54). El dominio BIR está subrayado; los asteriscos indican los residuos distintivos implicados en la coordinación del Zn; y los guiones indican huecos en el alineamiento. En las secuencias no humanas, los residuos que son idénticos a los residuos humanos están representados por periodos; otros residuos están representados en el código de aminoácidos de una letra.

20 La Figura 4 es una representación esquemática de las modalidades de vacunas de ADN mediante plásmidos que llevan *Salmonella* que codifican un polipéptido de survivina. La *Salmonella* en el lumen del intestino invade el epitelio intestinal a través de células M de placas de Peyer. Una vez en el epitelio, la *Salmonella* invade células tales como los macrófagos y las células dendríticas. La muerte bacteriana y la transferencia del plásmido permiten la expresión del plásmido mediante los macrófagos, lo que conduce a la presentación de péptidos del polipéptido de survivina codificado en moléculas MHC de clase I. Además, la captación por parte de las células dendríticas de los macrófagos apoptóticos que expresan el polipéptido de survivina, conduce a la presentación cruzada (cross-priming), que es el resultado de la presentación de los péptidos en las moléculas MHC de clase I y MHC de clase II.

25 La Figura 5 es un gráfico de barras que representa la liberación de IFN γ de linfocitos T aislados procedentes de ratones vacunados con survivina, tras la exposición a células cancerígenas. La liberación de IFN γ se midió en un ensayo ELISpot (ensayo de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas). Se vacunaron ratones C57B1/6 con *Salmonella* que llevaba un plásmido de expresión de survivina murina o bien de pollo, o no se vacunaron (eje x), y se midió (eje y) la cantidad de puntos de IFN γ por 5×10^5 de linfocitos T en placas, después de que los linfocitos T fueran expuestos a las líneas celulares cancerígenas B16/KSA (barras con rayas) o bien LLC/KSA (barras en negro).

35 La Figura 6 es un gráfico de barras que representa la liberación de IFN γ de linfocitos T aislados procedentes de ratones vacunados con survivina, tras la exposición a células cancerígenas. La liberación de IFN γ se midió en un ensayo ELISpot. Se vacunaron ratones Balb/c con *Salmonella* que llevaba un plásmido de expresión de survivina murina o bien de pollo, o no se vacunaron (eje x), y se midió (eje y) la cantidad de puntos de IFN γ por 5×10^5 de linfocitos T en placas, después de que los linfocitos T fueran expuestos a las líneas celulares cancerígenas 4T1/KSA (barras con rayas) o bien A20 (barras en negro).

40 La Figura 7 es un gráfico de supervivencia de ratones vacunados con *Salmonella* SL7207 con survivina de pollo o survivina murina. El porcentaje de ratones Balb/c supervivientes (eje y) se introduce en el gráfico contra la cantidad de días después del desafío con CT26/KSA (eje x), para ratones vacunados bien con *Salmonella* que lleva un plásmido de expresión para la survivina murina (triángulos rellenos) o la survivina de pollo (cuadrados rellenos), o bien con PBS (rombos rellenos).

45 La Figura 8 es un gráfico de supervivencia de ratones vacunados con *Salmonella* SL7207 con survivina de pollo o survivina murina. El porcentaje de ratones C57B1/6 supervivientes (eje y) se introduce en el gráfico contra la cantidad de días después del desafío con LLC/KSA (eje x), para ratones vacunados bien con *Salmonella* que lleva un plásmido de expresión para la survivina murina (triángulos rellenos) o una survivina de pollo mutante, Survivina-de-pollo(N97E, T99M, V100L, Q101G) (cuadrados rellenos), o bien con PBS (rombos rellenos).

50 La Figura 9 es una representación esquemática de una programación de dosificación para evaluar el efecto de los tiempos de vacunación, en relación a un desafío tumoral en el día 10. "D" es una abreviatura de "día". Por tanto, por ejemplo, algunos ratones recibieron la vacuna por vía oral en el día 1, un desafío tumoral en el día 10, y una vacuna por vía oral en el día 13; otros ratones recibieron un desafío tumoral y una vacuna por vía oral en el día 10, y una segunda vacuna por vía oral en el día 18. Las cargas tumorales en el pulmón fueron evaluadas en el día 29.

55 La Figura 10 es una gráfica que representa los pesos pulmonares para los ratones que reciben las vacunas los días 1 y 13; 7 y 13; 10 y 18; o 13 y 21; o que reciben PBS. Todos los ratones recibieron desafíos tumorales con células LLC/KSA por vía intravenosa el día 10. Las puntuaciones de la metástasis pulmonar para cada uno de los ratones también se proporcionan.

La Figura 11 es una representación esquemática de una programación de dosificación, que incluye vacunas mediadas por Salmonella con survivina de pollo en los días 1 y 15; desafío tumoral por vía intravenosa con células LLC/KSA en el día 4; y ciclofosfamida (CTX) por vía intraperitoneal el día 11 y tratamiento con indometacina en los días 12-15. Se puntuó la carga tumoral en los pulmones el día 28.

5 La Figura 12 es una gráfica que representa los pesos pulmonares de los ratones que reciben solamente el desafío pulmonar (vehículo); la vacuna con survivina de pollo en los días 1 (cebar) y 15 (estimular) y un desafío tumoral el día 4 (PCB); CTX e indometacina y desafío tumoral C(CI); cebado, desafío, CTX, indometacina, y estimulación (PC(CI)B); cebado, desafío, CTX, e indometacina (PC(CI)), o desafío, CTX, indometacina, y estimulación C(CI)B. Las puntuaciones de la metástasis pulmonar para cada uno de los ratones también se proporcionan.

10 La Figura 13 proporciona representaciones de datos de citometría de flujo de células de sangre periférica que demuestran la aparición de una nueva población de células CD44^{brillantes}, CD3^{bajas} en ratones después de la vacunación con Salmonella que lleva un plásmido que codifica survivina no mamífera. El eje X representa las células CD3 y el eje Y representa las células CD44.

15 La Figura 14 es una representación esquemática de una programación de dosificación, que incluye un desafío tumoral por vía subcutánea en el día 1; vacunas mediadas por Salmonella con survivina no mamífera en los días 4, 11, 18, y 25; y tratamiento de inmunocitocina por vía intravenosa en los días 8, 9 y 10.

La Figura 15 es una gráfica que representa volúmenes tumorales a lo largo del tiempo para los ratones tratados con PBS; inmunocitocina; survivina no mamífera; o inmunocitocina y survivina no mamífera.

Descripción detallada de la invención.

20 La presente invención mejora el tratamiento del cáncer u otras enfermedades proporcionando las composiciones y los métodos que provocan de manera efectiva la respuesta inmune contra las células enfermas/afectadas. El cáncer es la enfermedad diana principal, aunque la invención se aplica a otras enfermedades y condiciones tales como proliferación no deseada de células normales, tales como tejido fibroide. La invención también contempla las composiciones y métodos para el tratamiento de infecciones víricas, tales como infecciones por VIH, infecciones del virus influenza, y otras infecciones víricas.

25 En particular, para el tratamiento del cáncer u otros tumores, la presente invención proporciona composiciones y métodos para la presentación de un péptido, relacionado con una proteína tumoral específica o tumoral enriquecida, en el antígeno que presenta las células para provocar una respuesta inmune adaptativa en un mamífero contra células tumorales o cancerígenas. Un antígeno tumoral específico o enriquecido para la presente invención es survivina.

30 Visión general de la presentación del antígeno a los linfocitos T.

35 La presentación de antígenos es un proceso celular en el cual las proteínas en las células son procesadas en péptidos, y entonces se hacen transitar a lo largo de la vía secretora hasta la superficie celular. Los péptidos procesados transitan como un complejo estable con proteínas membrana presentadoras de péptidos especializadas, conocidas como MHC. Este proceso permite que los componentes del sistema inmunológico, por ejemplo, los linfocitos T colaboradores (linfocitos T CD4⁺) y los linfocitos T citotóxicos (linfocitos T CTL o CD8⁺), estudien las composiciones de las células mediante el muestreo de un complejo MHC-péptido. Los linfocitos T colaboradores interaccionan con complejos MHC II-péptido, mientras que los linfocitos T citotóxicos interactúan con complejos MHC I-péptido. La interacción tiene lugar vía un receptor de linfocito T (TCR, por sus siglas en inglés) expresados en la superficie de un linfocito T. Cada linfocito T expresa un TCR único. De forma análoga a los anticuerpos, la diversidad del TCR se genera a través del reordenamiento en los loci cromosómicos del TCR. Como ocurre con las células que producen anticuerpos, el encuentro con un autoantígeno (es decir, un péptido antígeno generado a partir de una proteína endógena presente en la célula), durante la diferenciación de linfocitos T, conduce a la selección negativa de ese linfocito T en particular. Aquellos linfocitos T que no son eliminados durante la selección negativa, se desarrollan además en linfocitos T maduros. Finalmente, la interacción con un antígeno foráneo en complejo con complejos MHC conduce a la activación de los linfocitos T, especialmente en presencia de una estimulación secundaria.

Survivina.

50 La proteína survivina se caracteriza por un dominio de aproximadamente 70 aminoácidos conservado, conocido como dominio BIR (o dominio IAP). En la survivina humana, el dominio BIR corresponde a la región que se extiende desde Asp16 a Leu87. Las células tumorales o cancerígenas a menudo sobreexpresan la proteína survivina, la cual se cree que bloquea la apoptosis de estas células, y por tanto interfiere con los mecanismos que evitan el crecimiento anormal de las células tumorales o cancerígenas. Las células normales, por otro lado, expresan muy

poca survivina. Por lo tanto, la survivina es un antígeno tumoral específico o tumoral enriquecido ideal. Es, por lo tanto, objeto de la presente invención distribuir una forma antigénica de la proteína survivina a las células presentadoras de antígenos, de manera que pueda estimularse una respuesta inmune a las células tumorales que expresan survivina. Proteínas y genes de survivina humana y de mamíferos se describen en detalle en la Patente estadounidense U.S. Patent No. 6,245,523 o en WO 2004/067023.

Survivina no mamífera.

Como se muestra en la presente solicitud de patente, los genes y/o proteínas de survivina no mamífera pueden utilizarse en vacunas para el cáncer y otras enfermedades. Por ejemplo, la inmunización de un ratón o un humano con un ácido nucleico que codifica survivina de pollo puede generar linfocitos T CD8⁺, que atacarán las células que expresan la survivina humana o de ratón, respectivamente. Este descubrimiento indica que la survivina de pollo puede utilizarse como una forma antigénica de la proteína survivina para provocar una respuesta inmune en un mamífero.

Las proteínas survivina de especies mamíferas y no mamíferas están alineadas en la Figura 1. Las proteínas survivina incluyen en el alineamiento la survivina humana (número de accesión Genbank NM_001168 or 015392, SEQ ID NO:8), survivina de perro (número de accesión Genbank NP_001003019, SEQ ID NO:9), survivina de cerdo (número de accesión Genbank NP_999306, SEQ ID NO:39), survivina de vaca (número de accesión Genbank Number NP_001001855, SEQ ID NO:40), survivina de gato (número de accesión Genbank NP_001009280, SEQ ID NO:41), survivina de ratón (número de accesión Genbank NP_033819, SEQ ID NO:10), survivina de rata (número de accesión Genbank AAF82586, SEQ ID NO:42), survivina de orangután (número de accesión Genbank CAH91231, SEQ ID NO:43), survivina de pollo (número de accesión Genbank NP_001012318, SEQ ID NO:11, de "tipo silvestre"), survivina de rana *Xenopus laevis* SIX (número de accesión Genbank AAO20085, SEQ ID NO:13), homólogo de survivina de *Xenopus laevis* (número de accesión Genbank AAM76714, SEQ ID NO:46), homólogo 2 de survivina de *Xenopus laevis* (número de accesión Genbank AAH89271, SEQ ID NO:47), homólogo de survivina de siluro (número de accesión Genbank CK419466, SEQ ID NO:52), homólogo de survivina de pez cebra (número de accesión Genbank NP_919378, SEQ ID NO:48), homólogo 2 de survivina de pez cebra (número de accesión Genbank NP_660196, SEQ ID NO:49), homólogo de survivina de pez globo (número de accesión Genbank CAG04432, SEQ ID NO:50), y homólogo 2 similar a survivina de pez globo (número de accesión Genbank CAG07433, SEQ ID NO:51). Todas estas secuencias, reveladas en la presente patente mediante sus números de accesión Genbank, se incorporan a modo de referencia. Las secuencias incluidas en la Figura 1 se encuentran también enumeradas en la lista de secuencias de la especificación.

Además, dos variantes de la survivina de pollo se incluyen también en la lista de secuencias anexa, la variante 1 (número de accesión Genbank NM_001012319, SEQ ID NO:44), que se diferencia comenzando en el residuo aminoácido 116 de la secuencia de survivina de pollo de tipo silvestre mostrada en SEQ ID NO:11, para proporcionar un C-terminal diferente, y la variante 2 (número de accesión Genbank NP_001012317, SEQ ID NO:45) que se diferencia empezando en el residuo aminoácido 38 de la secuencia de survivina de pollo de tipo silvestre mostrada en SEQ ID NO:11.

Las siguientes secuencias adicionales se incluyen en el listado de secuencias: survivina humana (número de accesión Genbank N_001168.2, SEQ ID NO:64); survivina *Homo sapiens* (número de accesión Genbank 015392, SEQ ID NO:65); survivina *Canis familiaris* (número de accesión Genbank NM_001003019.1, SEQ ID NO:66); survivina *Sus scrofa* (número de accesión Genbank NP_999306.1, SEQ ID NO:67); survivina *Bos Taurus* (número de accesión Genbank NP_001001855.2, SEQ ID NO:68); survivina *Felis catus* (número de accesión Genbank NP_001009280.1, SEQ ID NO:69); survivina *Mus musculus* (número de accesión Genbank NP_033819.1, SEQ ID NO:70); survivina *Rattus norvegicus* (número de accesión Genbank AAF82586.1, SEQ ID NO:71); survivina *Pongo pygmaeus* (número de accesión Genbank CAH91231.1, SEQ ID NO:72); survivina *Gallus gallus* (número de accesión Genbank NP_001012318.1, SEQ ID NO:73); survivina *Xenopus laevis* SIX (número de accesión Genbank AA020085.1, SEQ ID NO:74); homólogo de survivina *Xenopus laevis* (número de accesión Genbank AAM76714.1, SEQ ID NO:75); homólogo 2 de survivina *Xenopus laevis* (número de accesión Genbank AAH89271.1, SEQ ID NO:76); ácido nucleico que codifica survivina *Ictalurus punctatus* (número de accesión Genbank CK419466.1, SEQ ID NO: 77); homólogo de survivina *Danio rerio* (número de accesión Genbank NP_919378.1, SEQ ID NO:78); homólogo 2 de survivina *Danio rerio* (número de accesión Genbank NP_660196.1, SEQ ID NO:79); homólogo similar a survivina *Tetraodon nigroviridis* (número de accesión Genbank CAG04432.1, SEQ ID NO:80); homólogo 2 similar a survivina *Tetraodon nigroviridis* (número de accesión Genbank CAG07433.1, SEQ ID NO:81); survivina *Drosophila melanogaster* (número de accesión Genbank AAF55399.1, SEQ ID NO:82); y survivina *Caenorhabditis elegans* (número de accesión Genbank NP_505949.1, SEQ ID NO:83).

La invención contempla la utilización no sólo de secuencias de survivina que se encuentran en la naturaleza, tales como las secuencias de survivina reveladas en la Figura 1, sino también otras secuencias de aminoácidos que presentan, por ejemplo, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% de identidad de aminoácidos con al menos una de las secuencias reveladas en la Figura 1.

Como se ilustra en la Figura 1, mientras que las proteínas survivina de mamíferos en el alineamiento son idénticas a la survivina humana en más de un 80%, los homólogos no mamíferos de la survivina en el alineamiento son idénticos a la survivina humana en menos de un 60%. Dentro del dominio BIR (la región subrayada en el alineamiento de la Figura 1), sin embargo, las proteínas survivina no mamíferas son idénticas en más del 60%, pero menos del 80%, a la survivina humana, mientras que las proteínas survivina mamíferas son idénticas en más del 90% a la survivina humana. El porcentaje de las identidades del par de secuencias de los dominios BIR de los homólogos se encuentran resumidas en la Figura 2. Por ejemplo, la survivina de pollo es, aproximadamente, un 78% idéntica a la survivina humana a lo largo del dominio BIR.

De manera significativa, tal como de muestra en la Figura 1, existe sólo un péptido 9-mer (18-26: STRAATFRN) (SEQ ID NO:7) en la survivina de pollo dentro del dominio BIR que contiene más de un 50% de variación de aminoácidos en relación a la correspondiente secuencia humana (5 de 9 aminoácidos son diferentes en este péptido 9-mer en particular). La mayoría de los péptidos 9-mer dentro del dominio BIR de la survivina de pollo contiene dos o menos cambios en la secuencia (48 de 64 péptidos). Sin la intención de estar sujetos a la teoría, se contempla que este grado de conservación de secuencia hace, de manera efectiva, que la survivina de pollo sea, inmunológicamente, considerablemente similar a la survivina humana.

En general, el porcentaje de identidad entre el dominio BIR de la survivina de pollo y los dominios BIR de la survivina humana que se muestran en la Figura 2, varía en aproximadamente un 72% y aproximadamente un 78%. Además, alrededor de un 75% de los péptidos 9-mer, derivados de la survivina de pollo, del dominio BIR contienen dos o menos cambios de secuencia, en comparación con los péptidos 9-mer de mamíferos correspondientes. Por ejemplo, la survivina de pollo es idéntica en un porcentaje del 75% a la survivina de ratón a lo largo del dominio BIR, lo que es consistente con el resultado de que la survivina de pollo es, inmunológicamente, considerablemente similar a la survivina de ratón, tal como se describe en el Ejemplo 6 más adelante.

La eficacia de una composición de survivina no mamífera, tal como una composición de survivina de pollo, para inducir una respuesta inmune en un ratón contra un tumor que expresa survivina de ratón, tal como se ilustra en los Ejemplos que siguen más adelante, subraya un principio de la invención, concretamente, que la vacunación de un mamífero con una molécula de survivina no mamífera es útil para inducir una respuesta inmune contra la survivina mamífera o contra células que sobreexpresan survivina mamífera. Por tanto, la survivina de pollo es también útil para la generación de una respuesta inmune efectiva en humanos contra células que sobreexpresan la survivina humana, tales como muchas células tumorales, ya que la respuesta inmunológica se conserva suficientemente entre mamíferos.

En contraste, un alineamiento de los dominios BIR de invertebrados con los dominios BIR de survivina humana muestra que los dominios BIR del *D. melanogaster* (AAF55399, SEQ ID NO:53) y del *C. elegans* (NP_505949, SEQ ID NO:54) son un 50% o menos idénticos a la secuencia del dominio BIR de la survivina humana (Figura 3), aunque los residuos críticos para la quelación del Zn se conservan (ver los asteriscos en el alineamiento en la Figura 3). Por ejemplo, el dominio BIR de la survivina de mosca es, aproximadamente, un 50% idéntico al dominio BIR de la survivina humana. De manera significativa, el dominio BIR de mosca contiene sólo tres (3 de 64) péptidos 9-mer que tienen dos o menos sustituciones de aminoácidos en comparación con los péptidos humanos correspondientes.

De acuerdo con la invención, el término "survivena no mamífera", tal como se utiliza en la presente patente, abarca al menos cualquier proteína survivina que tenga un dominio BIR (o un dominio IAP) con al menos más del 50% de identidad de aminoácidos, pero menos del 90% de identidad de aminoácidos con un dominio BIR de survivina humana, por ejemplo al menos 55 %, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% o 85% de identidad con un dominio BIR de survivina humana.

Para calcular el porcentaje de identidad, los aminoácidos alineados de cada secuencia se comparan secuencialmente. Si los aminoácidos no son idénticos, la puntuación de la identidad del emparejamiento es cero; de otro modo, la puntuación de la identidad del emparejamiento es 1.0. La puntuación de identidad en bruto es la suma de los aminoácidos idénticos alineados. La puntuación bruta se normaliza entonces dividiendo la misma entre el número de aminoácidos en el menor de los candidatos o de las secuencias referencia, y multiplicando el resultado por 100. La puntuación bruta normalizada es el porcentaje de identidad. Las inserciones y deleciones se ignoran para los propósitos de calcular el porcentaje de identidad. Por consiguiente, las penalizaciones por huecos no se utilizan en este cálculo.

Los métodos para generar múltiples alineamientos de secuencias se conocen bien por parte de los expertos en el arte. Para alinear secuencias de survivina, se utilizó el módulo Megalign 6.1 del paquete de software DNASTAR Lasergene™ 6, aplicando el algoritmo de alineamiento ClustalV, utilizando ajustes por defecto (Higgins y Sharp (1989) Comput Appl Biosci. 5:151-3). Para el sub-alineamiento de los dominios BIR de survivina, se aplicó el método ClustalW ("slow-accurate", proceso lento y preciso), utilizando ajustes por defecto (Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-80).

- 5 Se contempla que la survivina no mamífera puede contener más péptidos con el potencial para generar una respuesta de un linfocito T colaborador, que una survivina de mamífero. Sin la intención de estar sujetos a la teoría, se contempla que un efecto de inmunización aumentado puede lograrse mediante el acoplamiento de los linfocitos T citotóxicos, a través del complejo MHC I, y los linfocitos T colaboradores, a través del complejo MHC II, en la respuesta inmune. Las diferencias de secuencias entre la survivina endógena humana y la survivina no mamífera son susceptibles de producir algunos péptidos que se presentan ante los que el sistema inmunológico humano no se ha mostrado tolerante. La presencia de epítomos de MHC II potenciales puede ser analizada utilizando algoritmos predictivos disponibles públicamente, tales como el Análisis ProPred ((www.imtech.res.in/raghava/propred); Singh et al., (2001) Bioinformática 17:1236-1237).
- 10 Utilizando un algoritmo tal, se descubre que en relación a las proteínas de survivina mamíferas tales como la survivina humana o de perro, se prevé que las proteínas survivina no mamíferas, como por ejemplo la survivina de pollo o la survivina de rana SIX, contienen más péptidos que se unen y/o péptidos con una afinidad de unión mayor a las moléculas MHC II (ver Tabla 1).

Tabla 1. Predicción de la unión de péptidos a la HLA-DR humana.

| # | Péptido | #unión | Puntuación | |
|----------------------------------|-------------|--------|------------|-----------------------------------|
| Survivina humana (SEQ ID NO:8) | | | | |
| 10 | WQPFLKDHR | 2 | 59.1 | (residuos 10-18 of SEQ ID NO:8) |
| 13 | FLKDHRIST | 9 | 272.5 | (residuos 13-21 of SEQ ID NO:8) |
| 14 | LKDHRISTF | 3 | 68.2 | (residuos 14-22 of SEQ ID NO:8) |
| 19 | ISTFKNWPF | 3 | 81.6 | (residuos 19-27 of SEQ ID NO:8) |
| 22 | FKNWPFLEG | 4 | 95.9 | (residuos 22-30 of SEQ ID NO:8) |
| 28 | LEGCACTPE | 1 | 21.3 | (residuos 28-36 of SEQ ID NO:8) |
| 43 | FIHCPTENE | 4 | 114.6 | (residuos 43-51 of SEQ ID NO:8) |
| 58 | FFCFKELEG | 3 | 80.6 | (residuos 58-66 of SEQ ID NO:8) |
| 74 | IEEHKKHSS | 11 | 320.3 | (residuos 74-82 of SEQ ID NO:8) |
| 86 | FLSVKKQFE | 5 | 142.5 | (residuos 86-94 of SEQ ID NO:8) |
| 87 | LSVKKQFEE | 3 | 79.9 | (residuos 87-95 of SEQ ID NO:8) |
| 96 | LTLGEFLKL | 5 | 148.5 | (residuos 96-104 of SEQ ID NO:8) |
| 98 | LGEFLKLDLDR | 7 | 171.3 | (residuos 98-106 of SEQ ID NO:8) |
| 101 | FLKLDLDRERA | 5 | 106.3 | (residuos 101-109 of SEQ ID NO:8) |
| 102 | LKLDLDRERAK | 1 | 20.0 | (residuos 102-110 of SEQ ID NO:8) |
| 113 | IAKETNNKK | 2 | 48.8 | (residuos 113-121 of SEQ ID NO:8) |
| # | Péptido | #unión | Puntuación | |
| Survivina de perro (SEQ ID NO:9) | | | | |
| 10 | WQPFLKDHR | 2 | 59.1 | (residuos 10-18 of SEQ ID NO:9) |
| 13 | FLKDHRIST | 9 | 272.5 | (residuos 13-21 of SEQ ID NO:9) |
| 14 | LKDHRISTF | 3 | 68.2 | (residuos 14-22 of SEQ ID NO:9) |
| 19 | ISTFKNWPF | 3 | 81.6 | (residuos 19-27 of SEQ ID NO:9) |
| 22 | FKNWPFLEG | 4 | 95.9 | (residuos 22-30 of SEQ ID NO:9) |
| 43 | FIHCPTENE | 4 | 114.6 | (residuos 43-51 of SEQ ID NO:9) |
| 58 | FFCFKELEG | 3 | 80.6 | (residuos 58-66 of SEQ ID NO:9) |

Tabla 1 (continuación)

| # | Péptido | #unión | Puntuación | |
|-----------------------------------|-------------|--------|------------|------------------------------------|
| Survivina de perro (SEQ ID NO:9) | | | | |
| 74 | IEEHKKHSS | 11 | 320.3 | (residuos 74-82 of SEQ ID NO:9) |
| 86 | FLSVKKQFE | 5 | 142.5 | (residuos 86-94 of SEQ ID NO:9) |
| 87 | LSVKKQFEE | 3 | 79.9 | (residuos 87-95 of SEQ ID NO:9) |
| 96 | LTLGEFLKL | 5 | 148.5 | (residuos 96-104 of SEQ ID NO:9) |
| 98 | LGEFLKLDLDR | 7 | 171.3 | (residuos 98-106 of SEQ ID NO:9) |
| 101 | FLKLDLDRERA | 5 | 106.3 | (residuos 101-109 of SEQ ID NO:9) |
| 102 | LKLDLDRERAK | 1 | 20.0 | (residuos 102-110 of SEQ ID NO:9) |
| 113 | IAKETNNKK | 2 | 48.8 | (residuos 113-121 of SEQ ID NO:9) |
| # | Péptido | #unión | Puntuación | |
| Survivina de ratón (SEQ ID NO:10) | | | | |
| 6 | LPQIWQLYL | 2 | 70.7 | (residuos 6-14 of SEQ ID NO:10) |
| 10 | WQLYLKNYR | 26 | 897.3 | (residuos 10-18 of SEQ ID NO:10) |
| 12 | LYLKNYRIA | 10 | 278.3 | (residuos 12-20 of SEQ ID NO:10) |
| 13 | YLKNYRIAT | 8 | 202.3 | (residuos 13-21 of SEQ ID NO:10) |
| 14 | LKNYRIATF | 19 | 627.3 | (residuos 14-22 of SEQ ID NO:10) |
| 17 | YRIATFKNW | 5 | 139.8 | (residuos 17-25 of SEQ ID NO:10) |
| 19 | IATFKNWPF | 4 | 111.6 | (residuos 19-27 of SEQ ID NO:10) |
| 22 | FKNWPFLED | 2 | 55.9 | (residuos 22-30 of SEQ ID NO:10) |
| 43 | FIHCPTENE | 4 | 114.6 | (residuos 43-51 of SEQ ID NO:10) |
| 58 | FFCFKELEG | 3 | 80.6 | (residuos 58-66 of SEQ ID NO:10) |
| 67 | WEPDDNPIE | 1 | 26.3 | (residuos 67-75 of SEQ ID NO:10) |
| 86 | FLTVKKQME | 3 | 91.7 | (residuos 86-94 of SEQ ID NO:10) |
| 87 | LTVKKQMEE | 4 | 135.9 | (residuos 87-95 of SEQ ID NO:10) |
| 96 | LTVSEFLKL | 4 | 146.9 | (residuos 96-104 of SEQ ID NO:10) |
| 101 | FLKLDLDRQRA | 13 | 305.6 | (residuos 101-109 of SEQ ID NO:10) |
| 102 | LKLDLDRQRAK | 8 | 223.6 | (residuos 102-110 of SEQ ID NO:10) |
| 113 | IAKETNNKQ | 3 | 90.8 | (residuos 113-121 of SEQ ID NO:10) |
| Survivina de pollo (SEQ ID NO:11) | | | | |
| 1 | MAAYAEMPLP | 2 | 42.9 | (residuos 1-9 of SEQ ID NO:11) |
| 7 | MLPKEWLVY | 2 | 51.0 | (residuos 7-15 of SEQ ID NO:11) |
| 12 | WLVYLVSTR | 11 | 315.7 | (residuos 12-20 of SEQ ID NO:11) |
| 13 | LVYLVSTRA | 34 | 1188.0 | (residuos 13-21 of SEQ ID NO:11) |
| 14 | VYLVSTRAA | 28 | 842.9 | (residuos 14-22 of SEQ ID NO:11) |
| 15 | YLVSTRAAT | 3 | 70.8 | (residuos 15-23 of SEQ ID NO:11) |
| 16 | LVSTRAATF | 8 | 234.7 | (residuos 16-24 of SEQ ID NO:11) |
| 24 | FRNWPFTG | 2 | 46.4 | (residuos 24-32 of SEQ ID NO:11) |
| 45 | FVHCPSSENS | 23 | 656.0 | (residuos 45-53 of SEQ ID NO:11) |
| 56 | WQCFFCLK | 2 | 42.9 | (residuos 56-64 of SEQ ID NO:11) |
| 57 | VQCFFCLKE | 14 | 428.5 | (residuos 57-65 of SEQ ID NO:11) |
| 60 | FFCLKELEG | 3 | 81.0 | (residuos 60-68 of SEQ ID NO:11) |

Tabla 1 (continuación)

| # | Péptido | #unión | Puntuación | |
|--|------------|--------|------------|------------------------------------|
| Survivina de pollo (SEQ ID NO:11) | | | | |
| 61 | FCLKELEGW | 2 | 41.5 | (residuos 61-69 of SEQ ID NO:11) |
| 76 | LEEHHKHS | 7 | 161.8 | (residuos 76-84 of SEQ ID NO:11) |
| 91 | LQKDPSNLT | 8 | 226.6 | (residuos 91-99 of SEQ ID NO:11) |
| 98 | LTVQEFLKL | 2 | 48.3 | (residuos 98-106 of SEQ ID NO:11) |
| 100 | VQEFLKLDK | 14 | 377.6 | (residuos 100-108 of SEQ ID NO:11) |
| 103 | FLKLDKKRT | 9 | 236.2 | (residuos 103-111 of SEQ ID NO:11) |
| 104 | LKLDKKRRTK | 19 | 686.1 | (residuos 104-112 of SEQ ID NO:11) |
| 114 | VIKKAISQK | 3 | 90.1 | (residuos 114-122 of SEQ ID NO:11) |
| 115 | IKKAISQKE | 3 | 78.6 | (residuos 115-123 of SEQ ID NO:11) |
| 129 | VAKGVRHAI | 2 | 46.9 | (residuos 129-137 of SEQ ID NO:11) |
| # | Péptido | #unión | Puntuación | |
| Survivina de pollo (N97E,T99M,V100L,Q101G) (SEQ ID NO:12) | | | | |
| 1 | MAAYAEMLP | 2 | 42.9 | (residuos 1-9 of SEQ ID NO:12) |
| 7 | MLPKEWLVI | 2 | 51.0 | (residuos 7-15 of SEQ ID NO:12) |
| 12 | WLVYLVSTR | 11 | 315.7 | (residuos 12-20 of SEQ ID NO:12) |
| 13 | LVYLVSTRA | 34 | 1188.0 | (residuos 13-21 of SEQ ID NO:12) |
| 14 | VYLVSTRAA | 28 | 842.9 | (residuos 14-22 of SEQ ID NO:12) |
| 15 | YLVSTRAAT | 3 | 70.8 | (residuos 15-23 of SEQ ID NO:12) |
| 16 | LVSTRAATF | 8 | 234.7 | (residuos 16-24 of SEQ ID NO:12) |
| 24 | FRNWPFTEG | 2 | 46.4 | (residuos 24-32 of SEQ ID NO:12) |
| 45 | FVHCPSENS | 23 | 656.0 | (residuos 45-53 of SEQ ID NO:12) |
| 56 | WQCFFCLK | 2 | 42.9 | (residuos 56-64 of SEQ ID NO:12) |
| 57 | VQCFFCLKE | 14 | 428.5 | (residuos 57-65 of SEQ ID NO:12) |
| 60 | FFCLKELEG | 3 | 81.0 | (residuos 60-68 of SEQ ID NO:12) |
| 61 | FCLKELEGW | 2 | 41.5 | (residuos 61-69 of SEQ ID NO:12) |
| 76 | LEEHHKHS | 7 | 161.8 | (residuos 76-84 of SEQ ID NO:12) |
| 91 | LQKDPSELM | 9 | 312.0 | (residuos 91-99 of SEQ ID NO:12) |
| 98 | LMLGEFLKL | 5 | 201.1 | (residuos 98-106 of SEQ ID NO:12) |
| 100 | LGEFLKLDK | 3 | 79.5 | (residuos 100-108 of SEQ ID NO:12) |
| 103 | FLKLDKKRT | 9 | 236.2 | (residuos 103-101 of SEQ ID NO:12) |
| 104 | LKLDKKRRTK | 19 | 686.1 | (residuos 104-112 of SEQ ID NO:12) |
| 114 | VIKKAISQK | 3 | 90.1 | (residuos 114-122 of SEQ ID NO:12) |
| 115 | IKKAISQKE | 3 | 78.6 | (residuos 115-123 of SEQ ID NO:12) |
| 129 | VAKGVRHAI | 2 | 46.9 | (residuos 129-137 of SEQ ID NO:12) |

Tabla 1 (continuación)

| # | Péptido | #unión | Puntuación | |
|--------------------------------------|-----------|--------|------------|------------------------------------|
| Survivina de rana SIX (SEQ ID NO:13) | | | | |
| 1 | MLSISPIVS | 35 | 1104.7 | (residuos 1-9 of SEQ ID NO:13) |
| 2 | LSISPIVSL | 3 | 135.9 | (residuos 2-10 of SEQ ID NO:13) |
| 4 | ISPIVSLRR | 6 | 143.4 | (residuos 4-12 of SEQ ID NO:13) |
| 7 | IVSLRRCDN | 30 | 926.8 | (residuos 7-15 of SEQ ID NO:13) |
| 8 | VSLRRCDNE | 1 | 22.1 | (residuos 8-16 of SEQ ID NO:13) |
| 10 | LRRCDNEPS | 27 | 867.5 | (residuos 10-18 of SEQ ID NO:13) |
| 23 | WRLYNLATR | 28 | 1040.3 | (residuos 23-31 of SEQ ID NO:13) |
| 25 | LYNLATRLR | 22 | 716.5 | (residuos 25-33 of SEQ ID NO:13) |
| Survivina de rana SIX (SEQ ID NO:13) | | | | |
| 26 | YNLATRLRT | 21 | 663.2 | (residuos 26-34 of SEQ ID NO:13) |
| 28 | LATRLRTFS | 2 | 59.1 | (residuos 28-36 of SEQ ID NO:13) |
| 32 | LRTFSNWP | 20 | 710.0 | (residuos 32-40 of SEQ ID NO:13) |
| 56 | FVHCPTDNS | 21 | 683.3 | (residuos 56-64 of SEQ ID NO:13) |
| 67 | WKCFCLK | 2 | 42.9 | (residuos 67-75 of SEQ ID NO:13) |
| 68 | VKCFCLKKE | 12 | 374.2 | (residuos 68-76 of SEQ ID NO:13) |
| 71 | FFCLKELEG | 3 | 81.0 | (residuos 71-79 of SEQ ID NO:13) |
| 72 | FCLKELEGW | 2 | 41.5 | (residuos 72-80 of SEQ ID NO:13) |
| 98 | LFIALKKKA | 30 | 1015.6 | (residuos 98-106 of SEQ ID NO:13) |
| 99 | FIALKKKAE | 9 | 325.6 | (residuos 99-107 of SEQ ID NO:13) |
| 100 | IALLKKKAE | 13 | 464.8 | (residuos 100-108 of SEQ ID NO:13) |
| 109 | LTLSEFLKL | 4 | 165.8 | (residuos 109-117 of SEQ ID NO:13) |
| 111 | LSEFLKLDL | 3 | 81.6 | (residuos 111-119 of SEQ ID NO:13) |
| 115 | LKLDLEHTK | 6 | 164.7 | (residuos 115-123 of SEQ ID NO:13) |
| 124 | IKMQKQMN | 28 | 729.2 | (residuos 124-132 of SEQ ID NO:13) |
| 126 | MQKQMNLHI | 14 | 419.4 | (residuos 126-134 of SEQ ID NO:13) |
| 130 | MNLHIERFQ | 12 | 410.6 | (residuos 130-138 of SEQ ID NO:13) |
| 134 | IERFQAKAN | 1 | 24.4 | (residuos 134-142 of SEQ ID NO:13) |
| 144 | VRGHLEKLD | 4 | 103.7 | (residuos 144-152 of SEQ ID NO:13) |

5 La Tabla 1 muestra la posición de inicio (#) y la secuencia (Péptido) de cada péptido 9-mer que se une a, al menos, un alelo HLA-DR. #unión hace referencia al número de alelos a los que los péptidos se unen (de 50), por encima de un umbral arbitrario, en este caso 20%. El umbral del 20% hace referencia al 20% de una puntuación de unión máxima teórica, como se calcula por un algoritmo según se implementa en Propred. La puntuación hace referencia a una puntuación acumulada a lo largo de todo los alelos HLA a los que el péptido se une. Como referencia, el péptido de proteína básica de mielina humana (MBP) VVHFFKNIV (SEQ ID NO: 14), derivada de una porción de proteína conocida por elevar los anticuerpos anti-MBP en humanos (MBP(85-99)), se une a los alelos 29 HLA con una puntuación acumulada de 1087.6.

Survivina modificada.

15 En otro aspecto, la invención proporciona formas antigénicas de la proteína survivina mediante la introducción de modificaciones en las proteínas de survivina de mamíferos. De manera específica, la invención contempla los péptidos de survivina de mamíferos modificada que son biológicamente inertes, pero inmunológicamente sustancialmente similares a la survivina. Este aspecto de la invención también se dirige a dos problemas en particular, con la simple aproximación de sencillamente expresar una proteína survivina en el citoplasma de una célula presentadora de antígeno. El primer problema es que la proteína de survivina biológicamente activa puede alterar la fisiología de la célula presentadora del antígeno. El segundo problema es que cuando la survivina, o esencialmente cualquier otra proteína, se expresa en una célula, sólo una pequeña fracción de la proteína es

degradada de tal manera que los péptidos antigénicos se presenten a través del complejo MHC de clase I en la superficie de la célula.

Por tanto, la invención contempla proteínas de survivina de mamíferos modificada, incluyendo versiones mutantes de la survivina humana. La invención también contempla la utilización no solamente de secuencias de survivina que se encuentran en la naturaleza, tales como las secuencias de survivina reveladas en la Figura 1, sino también otras secuencias de aminoácidos que tienen, por ejemplo, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con al menos una de las secuencias reveladas en la Figura 1.

La estructura de la survivina humana ha sido determinada (Chantalat et al., (2000) Mol. Cell 6:183-189; número de Acceso del depósito de estructuras proteicas del "Protein Data Bank" (Banco de datos de Proteínas) (PDB): PDB ID 1E31; Verdecia et al., (2000) Nat. Struct. Bio. 7:602-608; número de Acceso del depósito de estructuras proteicas Protein Data Bank (PDB): PDB ID IF3H.)

En base a su estructura tridimensional, la survivina humana contiene al menos dos dominios: un dominio N-terminal globular que incluye un sitio de unión a zinc, denominado como el dominio BIR o IAP, y una hélice alfa C-terminal extendida, denominada en la presente patente el dominio helicoidal. En un modo de realización preferente, la invención proporciona formas de survivina con una mutación en el dominio BIR N-terminal y/o en el dominio helicoidal C-terminal. Es una nueva visión de la presente invención la de que puede lograrse un efecto óptimo mediante la mutación de ambos dominios. Sin la intención de estar sujetos a la teoría, se cree que el dominio BIR tiene cierto nivel de actividad anti-apoptótica, incluso en la ausencia del dominio helicoidal. Además, el dominio helicoidal presenta una actividad de unión al citoesqueleto, y puede tener una actividad biológica distinta.

De manera específica, en el dominio BIR, por ejemplo, las mutaciones preferentes incluyen, pero no se limitan a, sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a Cys57, Cys60, His77, o Cys84 de la survivina humana. Por ejemplo, un dominio BIR modificado puede contener, al menos, una de las siguientes sustituciones: Cys57Ser, Cys60Ser, His77Phe, y Cys84Ser. Las sustituciones de cualquiera de estos aminoácidos con alanina o prolina son también preferentes. Se cree que estas mutaciones alteran el sitio de unión a zinc en el dominio BIR. Otras mutaciones que tienen el efecto de alterar el sitio de unión a zinc pueden también ser utilizadas. Además, las mutaciones en la posición correspondiente a la survivina humana Arg18, preferentemente ácido aspártico o ácido glutámico, pueden ser utilizadas para generar un dominio BIR inactivo. Los dominios BIR modificados en los que los aminoácidos de unión a zinc se mutan en dos, tres, o cuatro posiciones son particularmente preferentes.

Es, en general, útil introducir residuos prolina en cualquier lugar en el dominio helicoidal, a fin de alterar su función. En particular, las sustituciones de prolina pueden ser introducidas en las posiciones correspondientes a la survivina humana Ala128 o Ile135. Otras sustituciones de aminoácidos que pueden alterar el dominio helicoidal son también preferentes.

Una survivina de mamífero modificada preferente puede contener una mutación en Arg18, Cys57, Cys60, His77, y/o Cys84 y una prolina en el dominio helicoidal. Cada uno de los aminoácidos mencionados con antelación en las posiciones Arg18, Cys57, Cys60, His77, Cys84, Ala128, y Ile135 se conservan entre la survivina humana y la de pollo, y por tanto pueden introducirse mutaciones idénticas para generar una survivina de pollo biológicamente inerte. Mutaciones similares pueden también introducirse en las posiciones correspondientes en otras proteínas de survivina no mamíferas.

Cualquiera de las mutaciones anteriores pueden ser combinadas con una mutación en la posición correspondiente a Leu98 de la survivina humana, tal como, por ejemplo, Leu98Arg, Leu98Lys, y Leu98Ala. En la survivina de pollo, la posición correspondiente a Leu98 humana es Va1100.

Otras mutaciones útiles pueden ser identificadas mediante experimentación de rutina, tal como se describe en los Ejemplos. Por ejemplo, una mutación se introduce en una proteína survivina y se someten a prueba, por ejemplo, para ausencia de actividad biológica, y/o degradación aumentada, y/o habilidad para inducir una respuesta inmune contra células tumorales. Los ensayos, a modo de ejemplo, para estas pruebas se describen en los ejemplos que siguen más adelante y son conocidos en el arte.

En general, un péptido de survivina modificada preferente contiene tres, cuatro, cinco o más mutaciones. Sin embargo, una utilidad de la survivina modificada contemplada por la invención es presentar péptidos de epítopos de linfocitos T derivados de survivina a través de moléculas MHC de clase I. Por consiguiente, se prefiere por lo general mutar menos de cincuenta (o menos de treinta o menos de veinte) aminoácidos para mantener una similitud inmunológicamente sustancial con la survivina de mamíferos.

Presentación del antígeno.

La invención proporciona líneas directrices para introducir de manera óptima mutaciones en la survivina o en otras secuencias de proteínas, de manera que el procesamiento de los epítomos del complejo MHC de clase I se realiza relativamente sin obstáculos.

5 Es posible que ciertas mutaciones de survivina puedan encontrarse dentro de un segmento del péptido que es presentado por una molécula MHC de clase I, y reconocido por un receptor de linfocitos T en particular. Es además posible que una mutación pueda modificar el proceso proteolítico de la survivina en epítomos de péptidos, de tal manera que un epítomo se divida, o que un epítomo no se divida pero un nuevo epítomo sea creado de manera preferente. Para tratar el asunto de la presentación del antígeno, es posible utilizar bases de datos que se encuentran disponibles públicamente y la información para identificar epítomos candidatos del complejo MHC de clase I en una proteína survivina, y determinar entonces si una mutación modifica un epítomo. Por ejemplo, el algoritmo SYFPEITHI puede ser utilizado (www.unituebingen.de/uni.kxi; ver también, Rammensee et al., (1999) Immunogenetics (Inmunogenética) 50:213-219, cuyos contenidos se incorporan al presente documento a modo de referencia). De manera alternativa, puede utilizarse el algoritmo BIMAS (bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/; ver también, Parker et al., (1994) J. Immunol. 152:163-175, cuyos contenidos se incorporan al presente documento a modo de referencia). Debido a que los genes HLA que codifican las proteínas MHC de clase I humanas son altamente polimórficos, con proteínas MHC de clase I diferentes que se unen a diferentes motivos de péptidos, se crea una tabla de epítomos potenciales, que tiene en un eje varias moléculas MHC de clase I, y en el otro eje una secuencia de survivina. Las entradas en la tabla identifican posiciones de un epítomo para una molécula MHC de clase I. El efecto de una mutación candidata se juzga en base al efecto en varios epítomos. Al final, una mutación o mutaciones se eligen en base a las necesidades de una vacuna, teniendo en cuenta, por ejemplo, la frecuencia alélica de los diferentes alelos de HLA, o la frecuencia específica del grupo de los alelos de HLA. Para tratar el asunto del procesamiento proteolítico, de acuerdo a la invención es posible utilizar públicamente bases de datos e información para identificar sitios de corte de proteosoma candidatos, y para determinar entonces si una mutación modifica dicho sitio de corte. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos disponible públicamente NetChop (25 www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/). Es en general preferible evitar modificar los sitios de corte.

Con fines ilustrativos, el Ejemplo 12 proporciona análisis a modo de ejemplo para determinar sustituciones de utilidad en la proteína survivina.

De acuerdo a la invención, resulta también útil tomar en consideración el "inmunoproteosoma". En las células presentadoras del antígeno, el proteosoma tiene una composición algo diferente de proteínas, y su especificidad proteolítica está dominada por una enzima que divide el C-terminal en residuos hidrofóbicos. Como resultado, el proteosoma genera péptidos que pueden unirse al complejo MHC de clase I con un residuo de anclaje hidrofóbico C-terminal. Si resulta deseable mantener la especificidad del patrón de corte del inmunoproteosoma, se prefiere evitar la mutación de tales residuos hidrofóbicos, en particular la leucina, isoleucina, metionina, tirosina, triptófano, y fenilalanina. De igual modo, se prefiere también evitar la mutación de otros residuos con leucina, isoleucina, metionina, tirosina, triptófano, y fenilalanina. Por tanto, las mutaciones en Arg18, Cys57, Cys60, His77, y Cys84 presentan la ventaja de desestabilizar la estructura de la survivina y no eliminar los sitios de corte del inmunoproteosoma. Además, se prefiere evitar la introducción de mutaciones en los aminoácidos 7 a 9 inmediatamente N-terminales con leucina, isoleucina, metionina, tirosina, triptófano, y fenilalanina en la secuencia de la proteína.

40 Por tanto, la invención proporciona un método general de identificación preferente de sitios de mutación en una secuencia de proteínas para generar una proteína con inmunogenicidad aumentada. En base a este método, un sitio de mutación preferente en una secuencia de proteínas tiene las siguientes propiedades. En primer lugar, una o más mutaciones del sitio desestabiliza la estructura de la proteína. En segundo lugar, la mutación desestabilizante no introduce una leucina, isoleucina, metionina, tirosina, triptófano, o fenilalanina. En tercer lugar, el aminoácido normal en esa posición no es leucina, isoleucina, metionina, tirosina, triptófano, o fenilalanina. Este método puede ser aplicado a una amplia variedad de proteínas que pueden ser utilizadas como antígenos, tales como, por ejemplo, antígenos específicos tumorales, antígenos víricos, y otros antígenos. Entre los antígenos específicos tumorales, además de la survivina, el método puede ser aplicado a moléculas de adhesión de células epiteliales, oncogenes tales como Ras, antígeno carcinoembrionario, y otros. Entre los antígenos víricos, el método puede aplicarse al p24 del VIH, hemaglutinina de la gripe, y otras proteínas víricas.

Proteínas de fusión que comprenden survivina no mamífera y/o modificada.

A fin de promover la degradación de la fracción de survivina y su procesamiento en péptidos que pueden ser presentados a través de moléculas MHC de Clase I, resulta deseable fusionar los péptidos de survivina no mamífera o survivina mutante, descritos con anterioridad, con una segunda proteína adecuada. Por ejemplo, la ubiquitina es un compañero de fusión particularmente preferente para este propósito. Una proteína de fusión ubiquitina-survivina puede construirse en una de las siguientes configuraciones: N-terminal-ubiquitina-survivina-C-terminal o N-terminal-survivina-ubiquitina-C-terminal. N-terminal-ubiquitina-survivina-C-terminal es la orientación preferente. Además, resulta deseable mutar la metionina de la survivina N-terminal, preferentemente a arginina, ácido aspártico o ácido

glutámico. Resulta además deseable introducir una lisina en una posición correspondiente a la survivina humana Ile19 o Val21 en una proteína de fusión ubiquitina-survivina.

Resulta deseable fusionar la survivina de la presente invención con una fracción Fc. Una fracción Fc preferente contiene dominios CH2 y CH3 del anticuerpo, y de manera opcional contiene una región bisagra. La fracción Fc puede fusionarse o bien al N-terminal o al C-terminal de la survivina. La secuencia de proteína para Survivina de pollo-Fc madura humana se muestra en SEQ ID NO:25. La secuencia de proteína para Survivina de pollo-Fc madura murina se muestra en SEQ ID NO:27.

Además, una proteína de fusión que contiene las fracciones survivina y Fc puede, adicionalmente, contener otras fracciones, tales como citocinas que estimulan el sistema inmune, tal como se ha descrito en la publicación de la PCT WO 01/07081. Sin la intención de estar sujetos a la teoría, la presencia de la fracción Fc puede mejorar la captación de survivina que contiene proteínas de fusión en células presentadoras de antígenos. Resulta, en general, preferente que la fracción Fc se derive del organismo que está siendo tratado. Por ejemplo, para el tratamiento de un humano, se prefiere utilizar una fracción Fc humana.

Las proteínas de fusión Fc-survivina o ácidos nucleicos que codifiquen las proteínas de fusión pueden contener, de manera preferente, una secuencia señal para la secreción. La presencia de la secuencia señal facilita la expresión de las proteínas de fusión en líneas celulares de mamíferos, tales como las células NS/O, y puede permitir la secreción de la proteína de fusión *in vivo* si un correspondiente ácido nucleico se administra a un paciente. La proteína de fusión Fc-survivina que codifica secuencias, comienza de manera preferente en el sentido 5' a 3' con una "secuencia líder" derivada, por ejemplo, de una cadena liviana de un anticuerpo (L), fusionada en un marco con al menos una porción de la cadena pesada de la inmunoglobulina o un mutante de la misma, de manera preferente, de la región Fc γ del gen γ 1 de la inmunoglobulina humana. La región Fc γ 1 del gen Fc γ 1 de la inmunoglobulina incluye, de manera preferente, al menos una porción del dominio bisagra y un dominio CH3, y más preferentemente incluye al menos un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

La porción de ADN que codifica la secuencia señal codifica, de manera preferente, un segmento de péptido que dirige la secreción de la proteína de fusión Fc y a partir de ahí se divide separándose del resto de la proteína de fusión de Fc. La secuencia señal de la invención es un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que inicia el transporte de una proteína a través de la membrana del retículo endoplasmático. Las secuencias señales que son útiles para la invención incluyen secuencias señal de cadena liviana de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo 14.18 (Gillies et al. (1989) J. Immunol. Meth., 125:191), secuencias señal de cadena pesada de anticuerpo, por ejemplo, la secuencia señal de cadena pesada de anticuerpo MOPC141 (Sakano et al. (1980) Nature, 286:5774), y cualquier otra secuencia señal que sean conocidas en el arte (ver, por ejemplo, Watson (1984) Nucleic Acids Research (Estudio de Ácidos Nucleicos, 12:5145).

Las secuencias señal han sido bien caracterizadas en el arte y se conoce, de manera habitual, que contienen 16 a 30 residuos aminoácidos, y pueden contener mayor o menor cantidad de residuos aminoácidos. Un péptido señal consiste en tres regiones: una región básica N-terminal, una región central hidrofóbica, y una región más polar C-terminal. La región central hidrofóbica contiene 4 a 12 residuos hidrofóbicos que se ancla al péptido señal a través de la bicapa lipídica de la membrana durante el transporte del polipéptido nascente. A continuación de la iniciación, el péptido señal se divide, habitualmente, dentro del lumen del retículo endoplasmático mediante enzimas celulares conocidas como peptidasas señal. Los sitios de corte potenciales del péptido de señal siguen, generalmente, la "norma (-3, -1)". Por tanto, un péptido señal típico presenta residuos aminoácidos neutrales y pequeños en las posiciones -1 y -3, y carece de residuos prolina en esta región. La peptidasa señal dividirá dicho péptido entre los aminoácidos -1 y +1. Por tanto, la secuencia señal puede ser dividida del amino-terminal de la proteína de fusión durante la secreción. Este hecho da como resultado la secreción de una proteína de fusión. Las secuencias del péptido señal útiles en la práctica de la presente invención se conocen bien en el arte. Ver, por ejemplo, von Heijne (1986) Nucleic Acids Res., 14:4683.

El término "secuencia señal", "péptido señal", "secuencia líder", o "péptidos líder" se utilizan de manera intercambiable en la presente patente.

La proteína de fusión secretada puede en general tener un dominio Fc correctamente plegado, pero con una fracción de survivina plegada de manera incorrecta. Sin la intención de estar sujetos a la teoría, se cree que cuando la survivina es forzada a la vía secretora por la fracción Fc de una proteína de fusión Fc-survivina, el plegamiento de la survivina se ve comprometido, en particular debido a que la survivina contiene numerosas cisteínas que podrían acoplarse en puentes disulfuros. El correcto plegamiento de la fracción de survivina no es necesario para la actividad de las vacunas de la invención.

Como una alternativa a las proteínas de fusión mediante técnicas de ingeniería genética, la conjugación química utilizando entrecruzadores químicos convencionales, puede utilizarse para conectar fracciones de proteína.

Ácidos nucleicos.

La presente invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican la survivina no mamífera y/o modificada y las proteínas de fusión que incluyen la survivina tal como se ha descrito con anterioridad. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos para la survivina humana se muestra en SEQ ID NO:57, la secuencia de nucleótidos para la survivina de *Xenopus SIX* se muestra en SEQ ID NO:58, la secuencia de nucleótidos para el homólogo de la *Xenopus* se muestra en SEQ ID NO:59, la secuencia de nucleótidos para el homólogo de la survivina del pez cebra se muestra en SEQ ID NO:60, y la secuencia de nucleótidos para el homólogo de la survivina del siluro se muestra en SEQ ID NO:61. Los ácidos nucleicos, de manera preferente, se unen a y están interdigitados con elementos que permiten la expresión en las células eucarióticas, en particular, en células de mamíferos, para formar casetes de expresión. De manera habitual, un casete de expresión que codifica la survivina incluye, al menos, uno de los siguientes elementos regulatorios tales como promotores, potenciadores, intrones, terminadores, señales de poliadenilación y otros. De manera preferente, se incluye un promotor mamífero. Tal como se utiliza en la presente patente, por "promotor mamífero" se entiende un gen promotor que se deriva de un promotor que se encuentra en mamíferos o en un virus que normalmente crece en un mamífero. Por ejemplo, los promotores preferentes incluyen aquellos que están presentes en virus que crecen en células mamíferas, tales como citomegalovirus (CMV), virus Simio 40 (SV40), virus de Epstein Barr (EBV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus de Moloney, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del Tumor Mamario Murino (MMTV), o aquellos derivados de genes de mamíferos, tales como por ejemplo de actina, beta-globina, miosina, de mamíferos, o de manera opcional derivados de genes de mamíferos expresados, de manera preferente, en células presentadoras de antígeno, tales como Fascina u otros genes específicos APC conocidos en el arte. Un ejemplo de una señal de poliadenilación de utilidad es una señal derivada de una señal de poliadenilación de SV40.

Los elementos de expresión pueden dirigir la expresión de las proteínas de survivina en todas las células eucarióticas, o pueden tener potenciadores específicos del tipo de célula para dirigir la expresión, por ejemplo, en células presentadoras de antígeno. Las porciones codificadoras de los casetes de expresión están diseñados, de manera preferente, para tener codones que son utilizados más comúnmente en células eucarióticas, especialmente en células de mamíferos o humanas.

Los casetes de expresión de la invención pueden ser utilizados para producir proteínas de la invención en células cultivadas. Por lo tanto, los casetes de expresión pueden estar unidos a genes de resistencia a fármacos apropiados, orígenes de replicación de ADN, y otros elementos que facilitan la selección y la replicación de los casetes de expresión. En un modo de realización, las secuencias de ácido nucleico del casete de expresión se incorporan en un plásmido capaz de ser replicado en una bacteria. Los plásmidos adecuados para la invención pueden tener marcadores para la selección en las células bacterianas, tal como genes de resistencia a antibióticos. De manera alternativa, los plásmidos adecuados pueden carecer de marcadores de resistencia a antibióticos pero pueden, de manera opcional, incluir un gen que codifique una enzima metabólica, un ARNt supresor, u otro gen de ese tipo que podría encontrarse normalmente en el genoma de una bacteria sin resistencia a fármaco. Por tanto, un modo de realización, a modo de ejemplo, de la invención es un plásmido que contiene un ácido nucleico que codifica un péptido de survivina de la invención asociado de forma operativa con un promotor de mamíferos sin un marcador de resistencia a antibiótico. Un plásmido de tal tipo puede transformarse en una bacteria, y la bacteria puede entonces ser utilizada para vacunar a un paciente sin introducir un gen de resistencia a antibióticos en el paciente. De manera alternativa, un plásmido de ese tipo puede ser introducido en un paciente sin un soporte vivo. Por ejemplo, un plásmido de ese tipo puede ser introducido como ADN desnudo o como ADN encapsulado en perlas o recubierto en la superficie de las perlas.

Los casetes de expresión de la invención pueden incorporarse en genomas víricos, plásmidos apropiados para la administración de ADN desnudo, o genomas bacterianos. En el caso de genomas víricos, resulta deseable utilizar virus de ADN de doble cadena, tales como adenovirus y virus adeno-asociados, y virus de ARN tales como los retrovirus. Los casetes de expresión se introducen en los genomas de tales virus mediante técnicas estándar. Por tanto, la invención proporciona tanto formas de ADN como de ARN de ácidos nucleicos.

Moléculas efectoras.

La presente invención también proporciona modos de realización que permiten que el péptido de survivina no mamífera o mamífera modificada funcione en concierto con una molécula efectora que contribuye a la respuesta inmune. Por ejemplo, una molécula efectora de ese tipo puede ser una fracción de citocina que incluye, pero no se limita a, IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, GM-CSF, o cualquier otra citocina, en particular una capaz de activar una respuesta inmune Th1. Una molécula efectora tal, puede también ser un inhibidor de una citocina que reprime el sistema inmunológico, por ejemplo, un inhibidor STAT3 (por ejemplo, una proteína STAT3 dominante negativa tal como STAT3 β). Las citocinas u otras moléculas efectoras pueden también contener mutaciones. Por ejemplo, una citocina puede contener una sustitución Ser en una posición correspondiente a Cys125 de la IL-2.

Por tanto, en modos de realización preferentes, la vacuna de la invención incluye un ácido nucleico que codifica un péptido de survivina no mamífera o mamífera modificada y un segundo péptido que incluye una molécula efectora,

descrita con anterioridad, que contribuye a la respuesta inmune. Las regiones que codifican el péptido de survivina mamífera o no mamífera modificada, y el péptido de la molécula efectora pueden estar en una única unidad de transcripción, o en dos unidades de transcripción distintas. De manera alternativa, la vacuna de la invención incluye un ácido nucleico que codifica un péptido de survivina, mamífera o no mamífera, modificada y un ácido nucleico diferente que codifica un segundo péptido que incluye una molécula efectora, descrita con anterioridad, que contribuye a la respuesta inmune.

En otros modos de realización, la vacuna de la invención incluye un péptido de survivina no mamífera o mamífera modificada, y un segundo péptido que incluye una molécula efectora, descrita con anterioridad, que contribuye a la respuesta inmune. En un modo de realización, el péptido de survivina no mamífera o mamífera modificada, se fusiona o se conjuga al péptido que incluye una molécula efectora. La proteína de fusión del péptido de survivina y la molécula efectora pueden fusionarse o conjugarse adicionalmente a una fracción Fc, tal como se ha descrito con anterioridad.

Administración.

Las vacunas de la invención se utilizan para tratar humanos o mamíferos que muestran, o están en riesgo de, enfermedades asociadas con la sobreexpresión de survivina. Tales enfermedades incluyen cáncer u otros tumores caracterizados por células que sobreexpresan la survivina.

Las vacunas producidas de acuerdo a la presente invención pueden ser administradas a un huésped mamífero mediante cualquier vía. La inyección de antígenos proteicos se utiliza para provocar respuestas inmunes en mamíferos. Sin embargo, las vacunas de la invención pueden también ser administradas a células APC mediante ácido nucleico, por ejemplo, inyección de ADN. Una técnica utilizada comúnmente es inyectar vectores de expresión de ADN que codifican una proteína antigénica en el músculo. Se cree que las células APC especializadas, por ejemplo, macrófagos o células dendríticas, migran al sitio de la inyección o administración, recogen y presentan el antígeno a través de un proceso conocido como proceso de presentación de antígeno.

Por tanto, según resulte apropiado, la administración puede ser por vía oral o parenteral, incluyendo las vías de administración intravenosa e intraperitoneal. Además, la administración puede realizarse mediante inyecciones periódicas de un bolo de la vacuna, o puede realizarse de forma más continua mediante administración por vía intravenosa o intraperitoneal desde un depósito que sea externo (por ejemplo, un contenedor de líquido intravenoso). En ciertos modos de realización, las vacunas de la presente invención pueden ser de grado farmacéutico. Es decir, ciertos modos de realización cumplen con el estándar de control de pureza y calidad requerido para la administración en humanos. Las aplicaciones veterinarias también se encuentran dentro del sentido deseado, tal como se utiliza en la presente patente.

Las formulaciones, tanto para el uso médico veterinario o humano, de las vacunas de acuerdo a la presente invención incluyen, de manera habitual, tales vacunas en asociación con un adyuvante, soporte, y de manera opcional otro(s) ingrediente(s) farmacéuticamente aceptables. El soporte, o soportes, puede ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con otros ingredientes de las formulaciones y no nocivos para el recipiente del mismo. Se pretende que los soportes farmacéuticamente aceptables, a este respecto, incluyan cualquier disolvente, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios o agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en el arte. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente sea incompatible con el compuesto activo o su vector de administración, se contempla el uso del mismo en las composiciones. Compuestos activos suplementarios (identificados de acuerdo a la invención y/o conocidos en el arte), pueden también ser incorporados a las composiciones. Las formulaciones pueden ser presentadas convenientemente en forma de unidades de dosificación, y pueden ser preparadas mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en el arte de la farmacia/ microbiología. En general, algunas formulaciones se preparan produciendo la vacuna en asociación con un soporte líquido o un soporte sólido finamente dividido, o ambos, y entonces, si fuera necesario, conformando el producto con la formulación deseada.

Una composición de la vacuna de la invención se formula para ser compatible con la vía de administración por la que se pretende administrar. Ejemplos de vías de administración incluyen la vía oral o parenteral, por ejemplo, vía intravenosa, intradérmica, inhalación, transdérmica (vía tópica), transmucosa, y administración por vía rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea, pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; antioxidantes tales como el ácido ascórbico o el bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como el cloruro sódico o la dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases, tales como el ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

Soluciones útiles para la administración por vía oral o parenteral pueden ser preparadas mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en el arte farmacéutico, descrito, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences,

(Gennaro, A., ed.), Mack Pub., 1990. Las formulaciones para la administración parenteral pueden también incluir glicocolato para la administración oral, metoxisalicilato para la administración por vía rectal, o ácido cítrico para la administración por vía vaginal. La preparación parenteral puede ser incluida en ampollas, jeringas desechables o múltiples viales de dosificación realizados en plástico o cristal. También pueden prepararse supositorios para su administración por vía rectal, mezclando el fármaco con un excipiente no irritante tal como la manteca de cacao, otros glicéridos, u otras composiciones que se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente y en estado líquido a temperatura corporal. Las formulaciones también pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados, y similares. Las formulaciones para la administración directa pueden incluir glicerol y otras composiciones de alta viscosidad. Otros soportes parenterales potencialmente útiles para estas vacunas incluyen partículas del copolímero de etilen-vinil acetato, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para la administración por inhalación pueden contener como excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contengan, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y deoxicolato, o soluciones aceitosas para su administración en forma de gotas nasales, o como un gel para ser aplicado intranasalmente. Los enemas de retención también pueden utilizarse para la administración por vía rectal.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden realizarse en forma de unidades separadas tales como cápsulas, cápsulas de gelatina, bolsitas, comprimidos, pastillas o grageas, donde cada una contiene una cantidad predeterminada del fármaco; en forma de polvos o granulado; en forma de solución o suspensión en un líquido acuoso o líquido no acuoso; o en forma de una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. La vacuna puede también administrarse en forma de bolo, electuario o pasta. Un comprimido puede realizarse mediante la compresión o el moldeo del fármaco, de manera opcional, con uno o más ingredientes. Los comprimidos pueden prepararse comprimiendo, en una máquina adecuada, el fármaco en una forma de flujo libre tal como polvos o granulado, de manera opcional mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden ser realizados mediante moldeo, en una máquina adecuada, de una mezcla del fármaco en polvo y un soporte adecuado hidratado con un diluyente líquido inerte.

Las composiciones orales incluyen en general un diluyente inerte o un soporte comestible. Para el propósito de administrar la vacuna por vía oral, al compuesto activo se le pueden incorporar excipientes. Las composiciones orales preparadas con un soporte fluido para su uso como un enjuague bucal, incluyen el compuesto en el soporte fluido, y se aplican por vía oral y se utilizan para hacer enjuagues y expectorar, o se tragan. Los agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden ser incluidos como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente desintegrante tal como el ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente endulzante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato de metilo, o aroma de naranja.

Las composiciones de vacunas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (en el caso de que sean hidrosolubles), o dispersiones y polvo estéril para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los soportes adecuados incluyen suero fisiológico, agua bacteriostática, Cremofor EL TM (BASF, Parsippany NJ) o tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). En todos los casos, la composición puede encontrarse estéril y puede estar fluida hasta el grado de que exista de jeringabilidad. Puede mantenerse estable bajo la condiciones de elaboración y almacenaje, y puede preservarse de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El soporte puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión, y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser ocasionada incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monostearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización por filtrado. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo que en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los que se han enumerado anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de las soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización, lo que produce un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente deseado, de una solución del mismo previamente esterilizada por filtrado.

Las formulaciones adecuadas para la administración intra-articular pueden realizarse en forma de preparaciones acuosas estériles de la vacuna que puede estar en forma microcristalina, por ejemplo, en forma de una suspensión microcristalina acuosa. Las formulaciones liposomales o sistemas de polímeros biodegradables pueden también ser utilizados para presentar la vacuna tanto para la administración intra-articular como para la administración oftálmica.

5 Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semi-líquidas tales como linimentos, lociones, geles, sustancias de aplicación, emulsiones de aceite en agua o agua en aceite tal como cremas, pomadas o pastas; o soluciones o suspensiones tales como gotas. Las formulaciones para la administración
10 tópica en la superficie de la piel pueden prepararse dispersando la vacuna con un soporte dermatológicamente aceptable tal como una loción, crema, pomada o jabón. En algunos modos de realización, son soportes útiles aquellos capaces de formar una capa o película sobre la piel para localizar la aplicación e inhibir la eliminación. Cuando la adhesión a la superficie de un tejido se desee, la composición puede incluir la vacuna dispersada en una
15 composición fibrinógeno-trombina u otro bioadhesivo. La vacuna puede entonces pintarse, pulverizarse o aplicarse de otro modo a la superficie de tejido deseada. Para la administración tópica en superficies de tejido internas, el agente puede ser dispersado en un adhesivo tisular líquido, u otra sustancia que se conozca que potencia la adsorción de la superficie de un tejido. Por ejemplo, pueden utilizarse de manera ventajosa hidroxipropilcelulosa o soluciones fibrinógeno/trombina. De manera alternativa, las soluciones de recubrimiento de tejido, tal como las formulaciones que contienen pectina pueden ser utilizadas.

Para tratamientos por inhalación, puede utilizarse polvo de inhalación (formulaciones presurizadas (autopropulsadas) o en aerosol) dispensado con pulverizador, nebulizador o un atomizador. Tales formulaciones
20 pueden encontrarse en forma de un polvo triturado finamente para la administración transalveolar desde un dispositivo de inhalación de polvos o formulaciones dispensadoras de polvo presurizadas. En el caso de una solución presurizada y de formulaciones en aerosol, el efecto puede lograrse mediante la elección de una válvula que tiene las características de pulverizado deseadas (*es decir*, ser capaz de producir un pulverizado que tenga el tamaño de partícula deseado), o incorporando el ingrediente activo a modo de polvo suspendido en un tamaño de
25 partícula controlado. Para la administración por inhalación, las vacunas también pueden ser administradas en forma de un aerosol de pulverización de un recipiente presurizado o un dispensador que contiene un propulsante, por ejemplo, un gas tal como el dióxido de carbono, o un nebulizador. También pueden utilizarse gotas nasales.

La administración sistémica puede realizarse también por medios transmucosa o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que
30 se va a penetrar. Tales penetrantes son en general conocidos en el arte, en incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede llevarse a cabo a través del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, las vacunas se formulan de forma habitual en pomadas, bálsamos, geles, o cremas tal como se conocen generalmente en el arte.

35 En un modo de realización, las vacunas se preparan con soportes que protegerán de la rápida eliminación del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como etilen-vinilo acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones resultarán evidentes para aquellos expertos en el arte. Los materiales también pueden ser
40 obtenidos comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden utilizarse suspensiones liposomales como soportes farmacéuticamente aceptables. Éstas pueden prepararse de acuerdo a métodos conocidos por aquellos expertos en el arte, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense U.S. Patent No. 4,522,811. También pueden utilizarse microsomas y micropartículas.

Las composiciones por vía oral o parenteral pueden ser formuladas en forma de unidades de dosificación para
45 facilitar su administración y la uniformidad de la dosis. La forma de unidad de dosificación hace referencia a unidades físicamente separadas, adaptadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a ser tratado; donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto de la vacuna deseado en asociación con el soporte farmacéutico requerido. La especificación de las formas de las unidades de dosificación de la invención vienen dictadas por, y dependen directamente de, las características únicas del
50 compuesto activo, y del efecto de la vacuna en particular que se quiere lograr, y a las limitaciones inherentes en el arte de la composición de un compuesto activo de esas características para el tratamiento de individuos.

En general, las vacunas identificadas de acuerdo a la presente invención puede ser formuladas para su administración oral o parenteral a humanos u otros mamíferos, por ejemplo, en cantidades terapéuticamente
55 efectivas, es decir, cantidades que proporcionan concentraciones apropiadas del fármaco a un tejido diana durante el tiempo suficiente para inducir el efecto deseado. De manera adicional, las vacunas de la presente invención pueden ser administradas en solitario o en combinación con otras moléculas que se conoce tienen un efecto beneficioso en la enfermedad en particular o indicación de interés. A modo de ejemplo únicamente, cofactores útiles incluyen cofactores de alivio de síntomas, incluyendo agentes antisépticos, antibióticos, antivirales y antifúngicos, y analgésicos y anestésicos.

La concentración efectiva de las vacunas identificadas de acuerdo a la invención que va a administrarse en una composición de vacuna, variará dependiendo de una serie de factores, que incluyen la dosificación final deseada del fármaco que se va a administrar y de la vía de administración. La dosificación preferente a ser administrada es posible que además dependa de tales variables como el tipo y el grado de enfermedad o indicación a ser tratada, el estado general de salud del paciente en particular, la eficacia biológica relativa de la vacuna administrada, la formulación de la vacuna, la presencia y el tipo de excipientes en la formulación, y la vía de administración. En algunos modos de realización, las vacunas de la presente invención, pueden proporcionarse a un individuo utilizando unidades de dosificación habituales deducidas a partir de los estudios en mamíferos descritos anteriormente, utilizando primates no humanos y roedores. Tal y como se ha descrito con anterioridad, una unidad de dosificación hace referencia a una dosis unitaria, es *decir*, una dosis única que puede administrarse a un paciente, y que puede ser manipulada y envasada fácilmente, permaneciendo como una unidad de dosificación física y biológicamente estable, que comprende o bien la vacuna como tal, o una mezcla de la misma con diluyentes o soportes farmacéuticos sólidos o líquidos.

Configuración de la administración de un ácido nucleico de survivina con una perla.

En otro modo de realización, los ácidos nucleicos de la invención pueden ser configurados con un vehículo de administración tal como una perla. Por ejemplo, un ácido nucleico de la invención puede ser recubierto en perlas de celulosa, de acuerdo al método que se describe en la solicitud de patente estadounidense U.S. Application Publication No. 003-0166594, los contenidos de la cual se incorporan en el presente documento a modo de referencia. Un ácido nucleico de la invención puede ser incorporado dentro de las perlas poliméricas de acuerdo al método descrito en la Patente estadounidense U.S. Patent No. 5,783,567.

En ciertos modos de realización, organismos (por ejemplo, bacterias, células de mamíferos, y partículas víricas) se modifican para producir la survivina de la invención. Estos organismos pueden liberar la survivina para su cosecha o pueden ser introducidos como vacunas directamente a un paciente.

Configuración de la administración de un ácido nucleico de survivina dentro de un virus.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser configurados con un vehículo de administración vírico. El vehículo de administración vírico puede, de manera opcional, tener un efecto adyuvante. Por ejemplo, virus adecuados incluyen, pero no se limitan a, adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus, o virus Vaccinia. A menudo se prefiere utilizar una forma mutante o mermada de un virus, tal como por ejemplo un virus incompetente para la replicación. Los ácidos nucleicos de la invención se introducen en los genomas virales y se incorporan adicionalmente en partículas víricas. Los ácidos nucleicos se acondicionan utilizando sistemas de virus colaboradores que son bien conocidos en el arte de la terapia génica.

Configuración de la administración de un ácido nucleico de survivina dentro de una bacteria.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser configurados para la administración dentro de un hospedador microbiano, como, por ejemplo, el descrito por Gentshev et al. (2000) J. Biotechnol., 83:19-26; o por Stocker BAD (2000) J. Biotechnol., 83:45-50.

Bacterias adecuadas para la administración de ácidos nucleicos (*por ejemplo*, ADN) incluyen, pero no se limitan a, Salmonella, Shigella, Listeria, o E. Coli. Se prefiere a menudo utilizar una forma mutante, atenuada de una bacteria, tal como un auxótrofo. Por ejemplo, cepas adecuadas de Salmonella incluyen, pero no se limitan a, Salmonella typhimurium aroA auxótrofo SL7202 (ver, e.g., Darji et al., (1997) Cell, 91:765-775), Salmonella typhimurium aroA, auxótrofo dam RE88 (ver, e.g., Heithoff et al., (1999) Science, 284:967-70), Salmonella typhimurium msb, auxótrofo purI VNP20009 (ver, e.g., Clairmont et al., (2000) J. Infect. Dis., 181(6):1996-2002; Low, et al., (2004) Methods Mol. Med., 90:47-60), o Salmonella typhimurium protótrofo LT2 (ATCC #700720). Un modo de vacunación de ADN, a modo de ejemplo, mediante Salmonella se ilustra en la Figura 4.

Multiterapia.

La vacuna de la invención puede combinarse con otras modalidades de tratamientos utilizados en el cuidado del paciente. En un modo de realización del tratamiento, la vacuna se utiliza en concierto con la resección quirúrgica del tumor. En otro grupo de modos de realización del tratamiento, la vacuna se utiliza en combinación con quimioterapia o radioterapia que reduce el tamaño del tumor, daña potencialmente la vasculatura del tumor, o vuelve el tumor susceptible a las respuestas inmunes. Los agentes quimioterápicos o radioterápicos particularmente útiles para la multiterapia con la vacuna de la invención incluyen, pero no se limitan a, agentes que dañan el ADN tales como ciclofosfamida; antimetabolitos tales como gemcitabina; y agentes que alteran las funciones del citoesqueleto, tales como taxoles. Tales agentes reducen el crecimiento tumoral y pueden dañar la vasculatura del tumor, la cual, sin la intención de estar sujetos a la teoría, se cree que hace al tumor más susceptible a las respuestas inmunes.

En la multiterapia, la quimioterapia o irradiación normalmente se continúan con la administración de la vacuna, de tal manera que la formación de una respuesta inmune anti tumoral efectiva no se vea comprometida por efectos residuales potenciales del tratamiento previo.

5 En un modo de realización adicional de la multiterapia, el tratamiento con vacuna puede combinarse con
tratamientos con inmunocitocinas. Si la intención de estar sujetos a la teoría, se cree que una vacuna genera una
respuesta inmune más efectiva, cuando una citocina que promueve la respuesta inmune se encuentra presente en el
microentorno tumoral. Por ejemplo, inmunocitocinas particularmente útiles son aquellas que provocan una respuesta
Th1, tales como la IL-2 o IL-12. Durante una multiterapia, por ejemplo, un paciente puede recibir primero una vacuna
10 de la invención para generar una respuesta inmune hacia el tumor, y luego una inmunocitocina que puede que
puede fijar como diana al tumor y apoyar la respuesta inmune en el tumor. Las inmunocitocinas preferentes
presentan habitualmente, por ejemplo, una fracción de anticuerpo que reconoce un antígeno de superficie
característico del tumor, tal como EpCAM, o que reconozca una característica del núcleo necrótico de un tumor, tal
como el ADN. Las inmunocitocinas habitualmente tienen además una fracción de citocina tal como IL-2, IL-12, u
15 otras que, de manera preferente, dirigen una respuesta Th1. Las inmunocitocinas adecuadas para la invención se
describen en la patente estadounidense U.S. Patent No. 5,650,150, cuyos contenidos se incorporan a la presente
patente a modo de referencia.

Ejemplos.

La práctica de la invención se entenderá de una manera más completa a partir de los siguientes ejemplos, que se
20 presentan en la presente memoria únicamente con fines ilustrativos, y no deben interpretarse como limitativas para
la invención en modo alguno.

Ejemplo 1. *Clonación de survivina de pollo, generación de variantes de survivina, construcción de plásmidos que
replican en Salmonella y expresan survivina de pollo en células mamíferas.*

Los métodos para aislar las moléculas de ADN deseadas son familiares para las personas expertas en el arte. Por
ejemplo, en los casos en los que la secuencia de la molécula de ADN se conoce, se emplean comúnmente la
25 transcripción inversa y la reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR), o bien la molécula de ADN puede
obtenerse mediante síntesis química utilizando un proveedor comercial tal como Blue Heron Biotechnology Inc.
(Bothwell, WA). Para obtener ADN que codifica survivina de pollo de tipo silvestre, se realizó RT-PCR en polyA+
ARNm aislado del hígado de pollo (BD Biosciences cat # 636307), empleando el Superscript One-Step RT-PCR para
el Kit para el Long Templates Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) y un grupo de cebadores externos en una primera ronda
30 de transcripción inversa y amplificación, y el Supermix High Fidelity Kit (Invitrogen) y un grupo de cebadores internos
para la segunda ronda de amplificación. Los cebadores exteriores fueron el cebador sentido exterior 5' -
GAAAAATGGCGGCCTATGC- 3' (SEQ ID NO:17) y el cebador antisentido 5' -CACCGTAGACCCAGAGGAACC- 3'
(SEQ ID NO: 18), y los cebadores internos fueron el cebador sentido 5' -CTCTAGAATGGCGGCCTATGCTG- 3'
(SEQ ID NO: 19), que incorpora un sitio de restricción de Xba I (subrayado), y un cebador antisentido 5' -
35 CCTCGAGACCTAAGGGCCCATGTTCTC- 3' (SEQ ID NO:20), que incorpora un sitio de restricción Xho I
(subrayado), respectivamente. El producto PCR amplificado PCR fue separado mediante electroforesis en gel,
aislado, clonado en un vector pCR2.1 (Invitrogen), y su secuencia verificada. Las secuencias del nucleótido y
aminoácido de survivina de pollo de tipo silvestre se muestran en la lista de secuencias como SEQ ID NO:21 y SEQ
ID NO:11, respectivamente.

40 El fragmento de ácido nucleico que codifica la survivina de tipo silvestre completa se transfirió a los vectores de
expresión apropiados para su expresión en células mamíferas. Por ejemplo, el fragmento digerido Xba I / Xho I de la
secuencia codificadora de la survivina de pollo de tipo silvestre se introdujo en el plásmido igualmente digerido pdCs
(ver Lo et al., (1998) Protein Engineering 11:495), colocando el gen de la survivina de pollo del tipo silvestre bajo el
control de un promotor CMV.

45 Como otro ejemplo, un fragmento que codifica survivina de pollo de tipo silvestre se introdujo en el vector de
expresión pdCs-huFc (ver Lo et al., (1998) Protein Engineering 11:495), colocando un fragmento de survivina de
pollo de tipo silvestre completo que carece de metionina de comienzo (start) en la región aguas abajo
("downstream") de la secuencia que codifica la Fc humana, generando un plásmido que codifica una proteína de
fusión huFc-survivina de pollo. Brevemente, un ligamiento triple se llevó a cabo con un fragmento PflMI / XhoI
50 de survivina de pollo de tipo silvestre (el sitio PflMI se encuentra en el nucleótido 26 de la survivina de pollo de tipo
silvestre), un fragmento del plásmido SmaI / XhoI pdCs-huFc (ver Lo et al., (1998) Protein Engineering 11:495), y
una molécula doble de oligonucleótidos adaptadora que restaura el extremo 5' de la secuencia de survivina de pollo
de tipo silvestre, omitiendo el codón de comienzo ATG. La molécula doble adaptadora se formó mediante hibridación
de oligonucleótidos complementarios, y los oligonucleótidos sentido 5'-
55 GGGTGCAGCGGCCTATGCTGAAATGCTGCCAAGGA- 3' (SEQ ID NO:22) y el antisentido 5' -
TTGGGCAGCATTTTCAGCATAGGCCGCTGCACCC- 3' (SEQ ID NO:23). La generación de la proteína de fusión
correctamente codificada se verificó mediante secuenciación. La secuencia de nucleótidos de la Fcγ1 madura

humana -survivina de pollo (survivina de pollo menos Met de comienzo (start)) se muestra en la lista de secuencias como SEQ ID NO:24.

5 Para obtener un vector de expresión que codifica muFc-survivina de pollo, el fragmento Sma I/XhoI de survivina de pollo de tipo silvestre digerido del pdCs-huFc-Survivina de pollo fue transferido a un vector de expresión igualmente derivado de pdCs-muFc tratado de la misma manera, que es el resultado de una secuencia química entre muFc y survivina de pollo de tipo silvestre, con survivina de pollo colocada dentro del marco, directamente aguas abajo (downstream) de la secuencia que codifica una fracción CH3 de muFc. La fracción muFc codificada mediante este vector de expresión fue del isotipo de IgG2a. La secuencia de nucleótidos de survivina de pollo-mu Fc γ 2 (survivina de pollo menos Met de comienzo (start)) se muestra en SEQ ID NO:26. La secuencia de aminoácidos para la mu-Fu de survivina de pollo madura se muestra en SEQ ID NO:27.

15 La secuencia de survivina de pollo que codifica Survivina-de-Pollo(N97E, T99M, V100L, Q101G) se generó por un enfoque PCR que incorpora cebadores mutagénicos. Las sustituciones de codón en el cebador mutagénico sentido (Mut1s) 5' - CCTCTGAACTGATGTTGGGGGAGTTCTTGAAGCTGGAT- 3' (SEQ ID NO:28) y el cebador antisentido (Mut1a) 5' - AACTCCCCAACATCAGTTCAGAGGGATCTTTCTG-3' (SEQ ID NO: 29) se muestran subrayadas, y una sustitución de A a G que eliminó un sitio EcoRI se encuentra indicada en negrita. Dos fragmentos PCR que se solapan se generaron a partir de un ADN modelo de survivina de pollo de tipo silvestre, donde el fragmento aguas arriba (upstream) utiliza un cebador flanqueador Pr1s (5'-CCGCGGCCGCCCTTCACCATGGCGGCCTATGCTGAAATG-3') (SEQ ID NO:30) y Mut1a, y el fragmento aguas abajo utiliza el cebador flanqueador Pr1a (5' - AGATCTGGATCCCTAAGGGCCCATGTTCTCTATC- 3') (SEQ ID NO:31) y Mut1s, respectivamente, para las amplificaciones. Una reacción PCR se llevó a cabo en los fragmentos PCR resultantes, combinados con cebadores Pr1s y Pr1a, generando el producto completo, que fue clonado en un vector pCR2.1 (Invitrogen), y su secuencia fue verificada. El fragmento que codifica Survivina-de-pollo (N97E, T99M, V100L, Q101G) se suprimió con Not I / Bam HI y se ligó en un vector de expresión pdCs digerido del mismo modo. La secuencia de proteína para Survivina-de-pollo(N97E, T99M, V100L, Q101G) se muestra como SEQ ID NO:12 y la secuencia de aminoácidos se muestra como SEQ ID NO:62.

Ejemplo 2. Síntesis de genes de survivina de otros no mamíferos y construcción de vectores de expresión mamíferos.

30 De acuerdo a la invención, los genes y proteínas de survivina de otros vertebrados no mamíferos se utilizan en composiciones de vacunas. Por ejemplo, un gen de survivina de un pez como un pez globo, tiburón, siluro o pez cebra, o de un anfibio tal como la rana *Xenopus*, o de un reptil tal como un caimán, cocodrilo, tortuga, lagarto o salamandra, o de otras aves además del pollo, se obtienen por métodos análogos a los descritos en el Ejemplo 1, o mediante otros métodos conocidos para los expertos en el arte de la biología molecular. En algunos casos, tales como los homólogos de la survivina de *Xenopus*, pez cebra, siluro y pez globo, (cuyas secuencias se proporcionan en el listado de secuencias de la presente solicitud) los homólogos de la survivina han sido descritos y se encuentran disponibles a través de bases de datos públicas tales como PubMed. Cuando la secuencia génica de un homólogo de survivina se conoce, puede obtenerse el correspondiente ADN de una empresa comercial de síntesis de ADN, tal como Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA).

40 Los homólogos de la survivina de dichos peces, anfibios, reptiles, y aves se configuran en composiciones de vacuna mediante métodos análogos a aquellos de los Ejemplos 3, 4 y 5. Por ejemplo, los genes de survivina de *Xenopus*, pez cebra, siluro y pez globo se colocan en el plásmido pdCs después de la adición de un sitio 5' Xba I y un sitio 3' Xho I en los extremos de la secuencia codificadora. Esto se realiza, por ejemplo, utilizando métodos PCR análogos a los descritos en el Ejemplo 1, o mediante la total síntesis de los genes de la secuencia relevante flanqueada por conectores. El plásmido pdCs-survivina se coloca entonces en una cepa de *Salmonella* mediante los métodos descritos en el Ejemplo 3.

45 De manera alternativa, los genes de survivina se configuran en plásmidos que expresan proteínas de fusión Fc-survivina como en el ejemplo 1, y las proteínas de fusión Fc-survivina se utilizan como vacunas. Por ejemplo, los genes de survivina de *Xenopus*, pez cebra, siluro o pez globo se colocan en el plásmido pdCs después de la adición de un sitio 5' Xma I y un sitio 3' Xho I en los extremos de la secuencia codificadora. Esto se realiza, por ejemplo, utilizando métodos PCR análogos a los descritos en el Ejemplo 4, o mediante la total síntesis de los genes de la secuencia relevante flanqueada por conectores. El plásmido de Fc-survivina se coloca entonces en una línea celular de mamíferos adecuada para expresión de alto nivel, tal como células NS/O, y la proteína secretada resultante se recoge y se purifica como en el Ejemplo 4, y se formula con un adyuvante y se utiliza para la vacunación en humanos o animales como en el Ejemplo 5.

Ejemplo 3. Construcción de cepas de *Salmonella* que contienen plásmidos de la invención.

55 Las cepas de *Salmonella* que llevan plásmidos de la invención para su utilización en la vacunación se generaron mediante un protocolo de electroporación estándar explicado a continuación, familiar para aquellas personas

5 expertas en el arte. Por ejemplo, el plásmido pdCs-Survivina-de-pollo se transformó en una cepa de Salmonella libre de plásmidos tal como la cepa atenuada de Salmonella typhimurium aroA SL7207. Otras cepas atenuadas de Salmonella pueden también ser utilizadas, tales como RE88, con el genotipo aroA, dam-, VNP20009, con el genotipo msh⁻, purI, o de manera alternativa la cepa prototrófica LT2. Las cepas de Salmonella typhii, preferentemente atenuadas, pueden también ser utilizadas.

10 Para preparar bacterias electrocompetentes, un cultivo de 50 ml de Salmonella en la fase logarítmica se cosechó en un OD₆₀₀ de al menos 0.5, se enfrió en hielo, y las células se lavaron secuencialmente en un volumen igual y a continuación en la mitad de volumen con 1 mM HEPES helado, y re-granuladas. Las células fueron entonces re-suspendidas en 1 ml de glicerol al 10% frío, con 1 mM HEPES, granuladas y finalmente re-suspendidas en 0.5 ml de glicerol al 10% frío, con 1 mM HEPES mediante pipeteo suave. Las células se mantuvieron en hielo hasta su uso posterior, o los alícuotas se almacenaron a -80 °C.

15 Para la electroporación, se añadieron 40 microlitros de bacterias electrocompetentes a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml enfriado previamente, combinado con hasta 200 ng de plásmido super-esprial (supercoiled) pdCs-Survivina-de-pollo en hasta 2 microlitros de volumen, y se mezclaron sometiendo a pequeños golpes ("tapping"). La mezcla del ADN de las bacterias se transfirió a una cubeta de 0.2 cm de separación (Bio-Rad, Hercules, CA) y fue electroporada con un pulso eléctrico de 2500 V, 25 µF, 200 ohm, dando como resultado, en general, una constante de tiempo de 4.5 +/- 0.2, tras lo cual se añadió 1 ml de un medio SOC. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, 0.1 ml de las células se colocaron en placas, en placas de selección de antibióticos LB (100 microgramos / ml ampicilina).

20 Se obtuvieron y se cultivaron aislados de colonia única, y el ADN plasmídico se aisló para confirmar su identidad mediante análisis de restricción. Un cultivo validado recién cultivado se complementó con glicerol al 15%, se ultracongeló en alícuotas a 500 microlitros y se almacenó a -80 °C.

Ejemplo 4. Transfección, expresión, caracterización preliminar, y purificación de proteínas de fusión Fc-survivina.

A. Transfección y Expresión de proteínas de fusión Fc-survivina.

25 Para el rápido análisis de la expresión de proteínas, los plásmidos que expresan, por ejemplo, muF-Survivina-de-pollo o muFc-muSurvivina se introducen comúnmente en una línea celular tal como, por ejemplo, en células embrionarias de riñón humano HEK (ATCC# CRL-1573) mediante transfección transitoria utilizando lipofectamina (Invitrogen).

30 Para obtener clones transfectados de manera estable que expresen proteínas Fc-survivina, por ejemplo, el ADN plasmídico apropiado fue introducido en las células NS/O de mieloma de ratón mediante electroporación. Las células NS/O se cultivaron en un medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM de glutamina y penicilina/ estreptomycin. Aproximadamente 5x10⁶ células se lavaron con PBS y fueron re-suspendidas en 0.5 ml de PBS. A continuación, se incubaron 10 µg de ADN plasmídico linealizado con las células en una Cubeta Gene Pulser (con una separación de las puntas del electrodo de 0.4 cm, de BioRad, Hercules, CA), en hielo durante 10 minutos. La electroporación se llevó a cabo utilizando un Gene Pulser (BioRad) con ajustes a 0.25 V y 500 mF. Se permitió que las células se recuperaran durante 10 minutos en hielo, fueron re-suspendidas en un medio de cultivo, y se colocaron en dos placas de 96 pocillos. Los clones transfectados de manera estable se seleccionaron por su crecimiento en presencia de 100 nM de metotrexato (MTX), el cual fue añadido al medio de cultivo dos días después de la transfección. Las células se alimentaron cada 3 días de dos a tres veces más, y los clones estables resistentes al MTX aparecieron en 2 a 3 semanas. Los sobrenadantes de clones fueron sometidos a ensayo mediante ELISA anti-Fc para identificar los de alta producción. Los clones de alta producción se aislaron y propagaron en un medio de cultivo que contiene 100 nM de MTX. Habitualmente, se utilizó un medio H-SFM o medio CD (Invitrogen) como medio de cultivo.

45 De manera alternativa, los clones que expresan proteínas de fusión Fc-survivina de manera estable, se obtuvieron en células embrionarias de riñón humano HEK 293 por selección de metotrexato, mediante un método similar al descrito con anterioridad. Los clones de HEK 293 se mantuvieron en DMEM complementado con 10% de FBS.

B. Purificación y análisis de proteínas de fusión Fc-survivina.

50 Una purificación estándar de proteínas de fusión que contienen Fc se realizó a base de la afinidad de la fracción Fc de la proteína para la Proteína A. Brevemente, las células transfectadas con un plásmido que codifica una proteína de fusión Fc-survivina fueron cultivadas de manera habitual en frascos rotativos en H-SFM complementado con 0.1 µM de MTX, y el sobrenadante celular que contiene la proteína de fusión se cargó en una columna de flujo rápido de Proteína A – Sefarosa equilibrada previamente (50 mM de fosfato de sodio, 150 nM de NaCl, 0.01 % de Tween 80 en pH neutro). La columna se lavó ampliamente en este tampón, y la proteína enlazada se eluyó en un pH bajo (pH 2.5) en el mismo tampón que anteriormente y las fracciones se llevaron a un pH 6.7 con una base 1M Tris, de pH 11.

Las proteínas de fusión Proteína A Sefarosa – Fc-survivina purificada se analizaron por cromatografía analítica de exclusión por tamaños (SEC, por sus siglas en inglés), y se observó que normalmente la mayoría del material se encontraba en estado agregado. Este resultado fue inesperado ya que la survivina es, normalmente, una proteína citoplásmica. Sin la intención de estar sujetos a la teoría, se cree que cuando la survivina es forzada a la vía secretora por la fracción Fc de una proteína de fusión Fc-survivina, el plegamiento de la survivina se ve comprometido, en particular debido a que la survivina contiene numerosas cisteínas que podrían acoplarse en puentes disulfuro. Aunque esta agregación puede interferir con la actividad biológica, la agregación no resulta desaconsejable cuando la proteína va a ser utilizada como vacuna.

La integridad y pureza de las proteínas de fusión fueron verificadas mediante electroforesis SDS-PAGE de reducción. La banda más fuerte se vio a aproximadamente 45 kDa, el tamaño esperado de la proteína de fusión. Una multitud de bandas secundarias estaban presentes también: evidencia adicional de que la proteína se había agregado de hecho.

C. Procedimientos ELISA.

La concentración de productos proteicos que contienen Fc en los sobrenadantes de clones resistentes a MTX y otras muestras para ensayo se determinaron mediante ensayo ELISA anti-Fc. Procedimientos estándar se siguieron de manera esencial, tal como se describe más adelante.

i. Placas de recubrimiento.

Se recubrieron placas de ELISA con IgG (H+L) anti-murino AffiniPure Goat (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA) a 5 µg/mL en PBS, y 100 µL/pocillo en placas de 96 pocillos (Nunc-Immuno plate Maxisorp). Se cubrieron las placas recubiertas y se incubaron a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron a continuación 4 veces con 0.05% d Tween (Tween 20) en PBS, y se bloquearon con 1% de BSA/1% de suero de cabra en PBS, 200 µl 1/pocillo. Después de la incubación con el tampón de bloqueo a 37 °C durante 2 horas, las placas se lavaron 4 veces con 0.05 Tween en PBS y se sacudieron suavemente sobre toallas de papel.

ii. Incubación con muestras para ensayo y anticuerpo secundario.

Las muestras para ensayo se diluyeron según fuera apropiado en tampón de muestra (1% BSA/1% suero de cabra /0.05% Tween en PBS). Una curva estándar se preparó utilizando un anticuerpo quimérico (con Fc humana), cuya concentración se conocía. Para preparar una curva estándar, se realizaron diluciones en serie en el tampón de muestra para proporcionar una curva estándar en un rango desde 125 ng/mL a 3.9 ng/mL. Las muestras diluidas y estándar se añadieron a la placa, 100 µl/pocillo y la placa se incubó a 37 °C durante 2 horas. Después de la incubación, la placa se lavó 8 veces con 0.05% Tween en PBS. Se añadió a cada pocillo, a continuación, 100 µl del anticuerpo secundario, anti-IgG humano conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson Immuno Research), diluido a aproximadamente 1:120,000 en tampón de muestra. La dilución precisa del anticuerpo secundario a ser utilizado varía para cada lote. Después de la incubación a 37°C durante 2 horas, la placa se lavó 8 veces con 0.05% Tween en PBS.

iii. Desarrollo.

La solución de sustrato se añadió a la placa a 100 µL/pocillo. La solución de sustrato se preparó disolviendo 30 mg de OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD)), (1 comprimido) en 15 mL de 0.025 M de ácido cítrico/0.05 M de tampón de Na₂HPO₄, pH 5, que contenía 0.03% de peróxido de hidrógeno recién añadido. Se permitió que el color se desarrollara durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El tiempo de desarrollo está sujeto al cambio, dependiendo de la variabilidad de lote a lote de las placas recubiertas, el anticuerpo secundario, etc. La reacción se paró añadiendo 4N de ácido sulfúrico a 100 µL/pocillo. La placa se leyó mediante un lector de placas, que se ajustó a 490 y a 650 nm, y se programó para sustraer el OD de fondo a 650 nm del OD a 490 nm.

Ejemplo 5. Métodos para la administración de la vacuna y desafío tumoral.

Ratones C57B1/6 y Balb/c (7-8 semanas de edad) fueron adquiridos de Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME). Los ratones se mantuvieron en EMD Lexigen Research Center Corp., Billerica, MA, y todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los Procedimientos Operativos para instalaciones de Animales (Animal Facilities Operating Procedures) autorizados.

Para preparar la muestra de vacuna de Salmonella, un cultivo de 5 ml de LB/AMP se inoculó con una colonia de bacterias única transformada, se cultivó durante la noche a 37°C, se centrifugó a 2000xg durante 10 minutos, se lavó una vez en PBS y después se re-suspendió en 2 ml de PBS. El OD₆₀₀ de una dilución 1:10 del cultivo en PBS se midió, y la concentración del cultivo se ajustó a 10⁹ células/ml con PBS, asumiendo que 1 unidad de OD₆₀₀

correspondía a aproximadamente 10^9 bacterias/ml (según se determinó de la preparación en placas de una dilución en serie del cultivo en placas de LB/Ampicilina). La vacunación mediante alimentación por sonda se realizó con una jeringa de 1 ml cargada con una aguja de alimentación desechable de 20G x 1.5" que se insertó en el estómago. Los ratones fueron tratados previamente con una alimentación por sonda de 0.1 ml de 10% de bicarbonato de sodio para neutralizar los ácidos del estómago, y cinco minutos más tarde se administró a los ratones una muestra de vacuna de 0.1 ml (108 bacterias).

El efecto de la vacuna se midió en líneas celulares tumorales que expresan survivina de mamíferos y presentan antígenos derivados de survivina en complejos MHC. Las líneas celulares tumorales utilizadas en los ejemplos a continuación fueron la línea celular D121 del carcinoma de pulmón murino, línea celular A20 de linfoma murino, línea celular 4T1 del tumor de mama murino, línea celular LLC del carcinoma pulmonar de Lewis murino, línea celular CT26 de cáncer de colon murino, y línea celular B 16 del melanoma murino, pero otras líneas celulares que expresan survivina de mamíferos y antígenos derivados que presentan survivina podrían utilizarse. En algunos experimentos, se utilizaron líneas celulares tumorales que habían sido modificadas para expresar la molécula de adhesión de las células epiteliales humanas (EpCAM, por sus siglas en inglés), designada por "KSA" (por ejemplo LLC/KSA). La expresión de survivina es evaluada convenientemente por un análisis Western blot, mediante métodos estándar. El anticuerpo policlonal de conejo a la survivina humana y murina (AHP604, Serotec, Raleigh, NC) se utilizó en una dilución a 1:500.

Las líneas celulares tumorales utilizadas en los Ejemplos que siguen a continuación, se mantuvieron en los siguientes medios. D121 se cultivó en DMEM con 10% de suero fetal bovino (FBS), complementado con 1% de penicilina/ estreptomina (P/S), 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de sodio, y 1% de aminoácidos no esenciales. A20 y 4T1 se cultivaron en RPMI con 10% de FBS, 1% P/S, 1% de L-glutamina. LLC se cultivó en DMEM con 10% de FBS, 1% P/S, 1% de L-glutamina. CT26 se cultivó en un medio DMEM con 10% de FBS, 1% de P/S, 1% de L-glutamina, y 1% de vitamina B16. Los medios CT26/KSA también incluyeron 1% de piruvato de sodio y 1% de aminoácidos no esenciales. El medio para las líneas celulares que expresan adicionalmente la EpCAM también contenía 1 μ g/ml de G418.

Para evaluar el efecto de la vacuna en la supervivencia del ratón o la carga tumoral del pulmón de los ratones tratados, las células tumorales se administraron por vía intravenosa. Las líneas celulares tumorales se lavaron con PBS, se tripsinizaron durante 3 minutos, y la tripsina se neutralizó con medio condicionado. Las células fueron granuladas y lavadas dos veces con PBS, o en el caso de células D121, con PBS, 1% de albúmina de suero bovino, 50 μ M EDTA. Una única suspensión de células se obtuvo aplicando las células re-suspendidas en múltiples tamices de malla de nailon de 100 μ M desechables (BD Falcon). Se inyectó a los ratones por vía intravenosa en la vena de la cola con la suspensión celular, en un volumen de 200 μ l por ratón utilizando una aguja de calibre 27. Los pulmones fueron extraídos, pesados y puntuados evaluando el porcentaje de área pulmonar cubierta por el tumor para comparar la carga tumoral metastásica.

Ejemplo 6. *La inmunización con ADN que codifica la survivina de pollo genera anticuerpos que inter-reaccionan con survivina de mamíferos.*

Para probar si la vacuna con ácidos nucleicos que codifican la survivina de pollo puede generar anticuerpos que inter-reaccionan con survivina de mamíferos, se llevaron a cabo los siguientes experimentos. Se utilizó un protocolo de inmunización descrito por Davis ((1996) Adv. Drug Delivery Reviews 21:33) como base para los experimentos. Se inmunizaron ratones Balb/c hembra, de 7 – 8 semanas de edad (n=2 por grupo de tratamiento), una vez (Día 1) o tres veces (Día 1, 21, y 46) con plásmidos de expresión que codifican survivina de pollo de tipo silvestre (ChSur) o muFc-Survivina-de-pollo (FcChSur) o con un plásmido de expresión de control que codifica el antígeno muFc-carcinoembrionario (CEA) (FcCEA). Se inyectó a los ratones en el músculo tibial anterior con 100 μ l de una solución de 10 μ M de cardiotoxina, seguido de 100 μ g de ADN plasmídico cinco días después de la inyección. En el día 62, los ratones se desangraron y el suero se analizó para anticuerpos contra la survivina murina. El suero diluido en serie se aplicó a una placa de ELISA recubierta con proteína de fusión muFc-muSurvivina, la placa se lavó, las muestras se incubaron con un anticuerpo de la IgG2a anti-ratón conjugado con peroxidasa. El análisis ELISA detectó la presencia de anticuerpos anti-survivina mediante ensayo colorimétrico comparado con ratones naive de control negativo. Los resultados mostrados en la Tabla 2 indican que las vacunas de ADN de survivina fueron efectivas en obtener anticuerpos reactivos a la survivina murina, mientras que la vacuna de ADN de control no lo fue.

Tabla 2: Títulos de anticuerpos de survivina anti murina.

| Dilución de Suero | 1 tratamiento (n=2) | | | 3 tratamientos (n=2) | | |
|-------------------|---------------------|---------|-------|----------------------|---------|-------|
| | ChSur | FcChSur | FcCEA | ChSur | FcChSur | FcCEA |
| 50 x | 0.285 | 1.089 | n.a. | 2.176 | 2.495 | 0.046 |
| 200 x | 0.123 | 0.769 | n.a. | 1.177 | 1.276 | 0.042 |
| 800 x | 0.124 | 0.484 | n.a. | 0.417 | 0.454 | 0.044 |

5 Los anticuerpos anti-survivina de ratón se someten a prueba adicionalmente para la reactividad cruzada hacia la survivina humana bien en un ensayo Western blot o en un ensayo ELISA. Se espera que los anticuerpos de survivina de ratón, obtenidos mediante vacunación de los ratones con una composición de survivina de pollo, también se unan a la proteína survivina humana.

Ejemplo 7. *Vacunación de un mamífero con ADN que codifica survivina que provoca una respuesta inmune de linfocitos T a las células cancerígenas.*

10 Para determinar la habilidad de una vacuna de survivina basada en Salmonella para estimular una respuesta inmune de linfocitos T contra células cancerígenas, se llevaron a cabo los siguientes experimentos. Se vacunaron ratones Balb/c con la cepa de Salmonella SL7207 que lleva una mutación AroA (Medina et al., (1999) Infection and Immunity, pp. 1093-1099), y que lleva también un vector de expresión de mamíferos que codifica survivina murina (n=2), o survivina de pollo de tipo silvestre (n=2) en el día 0 y día 14, tal como se describe en el Ejemplo 5. Ratones naive inmunizados (n=2) se utilizaron como control negativo en este experimento.

15 Un mes antes de la primera vacunación, se extrajeron esplenocitos de cada grupo y se agruparon. Se purificaron linfocitos T CD8⁺ y se utilizaron como receptores en un ensayo ELISpot de IFN γ , esencialmente tal como se describe más adelante. En este ensayo, las líneas celulares tumorales A20 y 4T1 se utilizaron como las células efectoras (Figura 6). Las células 4T1 habían sido modificadas para expresar la molécula de adhesión a células epiteliales humanas (EpCAM), pero no se consideró que esto fuera relevante para el experimento. Hubo un número significativamente mayor de linfocitos T receptores de IFN γ de los ratones vacunados que de los animales de control. La vacunación con Salmonella que contiene un plásmido de expresión de survivina de pollo o murina, estuvo en correlación con una cantidad elevada de linfocitos T precursores de secreción de IFN γ en respuesta a las diferentes líneas celulares tumorales.

25 El mismo protocolo de vacunación se llevó también a cabo en ratones C57B1/6. Se incubaron linfocitos T CD8⁺, procedentes de los bazo de estos ratones, con células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) o células de melanoma B16 en el ensayo ELISpot de IFN γ murino. Las células LLC y B16 habían sido modificadas para expresar la molécula de adhesión a células epiteliales humanas (EpCAM), pero no se consideró que esto fuera relevante para el experimento. Ambas vacunas resultaron en un aumento en la cantidad relativa de linfocitos T receptores dirigidos contra los péptidos del antígeno diana expresado en el contexto de MHC de clase I, en comparación con animales C57B1/6 naive (Figura 5). Hubo un número significativamente mayor de células secretoras de IFN γ producidas en ratones vacunados con survivina de pollo SL7207 que ratones con survivina murina SL7207 contra ambas células, las células tumorales LLC y células B16.

35 Juntos, estos resultados indican que ambos enfoques de vacunación provocan un aumento en la cantidad de precursores de linfocitos T CD8⁺ reactivos con células cancerígenas que muestran péptidos de survivina de mamíferos e el contexto de epítopos de MHC de clase I. Estas observaciones sugieren además que la inmunización con survivina de pollo puede ser más potente en romper la tolerancia y generar una respuesta inmune dirigida contra células diana que expresan survivina de mamíferos.

40 En este Ejemplo y en varios de los siguientes Ejemplos, se utilizó la cepa de Salmonella typhimurium SL7207, pero otras cepas de Salmonella podrían utilizarse, tal como la Salmonella typhi. En el tratamiento de humanos con Salmonella typhi, se prefiere generalmente utilizar auxótrofos que, de manera opcional, lleven mutaciones atenuantes adicionales.

Protocolo de ensayo ELISpot de IFN γ murino:

El ensayo ELISpot se llevó a cabo esencialmente como se describe en Power et al., (Power et al., (1999) J. Immunol. Meth. 227:99-107). Los linfocitos T CD8⁺ fueron aislados de esplenocitos utilizando un kit de aislamiento de linfocitos T CD8⁺ Miltenyi (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), y se clasificaron en un clasificador de perlas magnéticas Automacs, según las instrucciones del fabricante. Los linfocitos T CD8⁺ se mantuvieron en RPMI complementado con 0.7 ng/ml de IL-2 (R&D Systems). En el transcurso de 24 horas, se purificaron células viables en un gradiente Lympholyte® y se re-suspendieron a una concentración final de 10⁶ células/ml. Los linfocitos T CD8⁺ se colocaron en placas en diluciones en serie, comenzando en 10⁵ células/pocillo en una placa de ELISpot de IFN γ murino (BD Biosciences, San José, CA), previamente recubierta con 5 μ g/ml de un anticuerpo de IFN γ anti murino. Todas las líneas celulares se añadieron a una concentración de 5 x 10⁴ células/pocillo. Después de 18 – 24 horas, las células se extrajeron, las membranas recubiertas de anti- IFN γ se lavaron con 0.05% de Tween en PBS, se incubaron con un anticuerpo biotinilado secundario para IFN γ en PBS con 2% de suero fetal bovino, y se visualizó el anticuerpo secundario unido mediante la exposición a solución de acetato HRP y AEC conjugado con estreptavidina (3-amino-9-etilcarbazol). Los puntos correspondientes a los linfocitos T CD8⁺ secretores de IFN γ fueron cuantificados utilizando el sistema Zeiss KS ELISpot (Muenchen-Hallergmoos, Alemania).

15 **Ejemplo 8.** Inmunización in vitro de inmunocitos derivados de humanos con survivina de pollo.

Para confirmar la habilidad de una secuencia de survivina no mamífera, tal como la secuencia de survivina de pollo, para provocar una respuesta anti-survivina en humanos, se llevó a cabo un ensayo de inmunización *in vitro* utilizando células de sangre periférica de un paciente (hu PBMCs). En esencia, se purifican células dendríticas (DCs) y linfocitos T de las células hu PBMCs, las células DCs se cargan con un antígeno de elección y se incuban con linfocitos T, y la respuesta de linfocitos T a la exposición de péptidos de survivina, por ejemplo en forma de células diana que expresan survivina humana, se analiza, empleando métodos estándar familiares para los expertos en el arte.

Por ejemplo, las células DCs (de huPBMCs de HLA-A2+ de pacientes y derivadas utilizando IL-4 y GM-CSF), son pulsadas con una secuencia de péptido de survivina de control que se sabe es un epítipo para alelos HLA-A2+, tal como LMLGEFLKL (SEQ ID NO:6), o son pulsadas con péptidos experimentales, tales como (i) un péptido derivado de survivina de pollo 30-mer GCAFAALQKDPSELMLGEFLKLDREKAKNV(SEQ ID NO:32); (ii) un péptido de survivina de pollo de tipo silvestre; o (iii) un péptido de survivina mutado tal como Survivina-de-pollo(N97E,T99M,V100L,Q101G) (SEQ ID NO:12). De manera alternativa, se introducen en las células DCs constructos de ADN en que expresan estas secuencias. Después de la incubación con los péptidos o proteínas, o expresión del ADN introducido, las células DCs se irradian y se lavan para eliminar el exceso de péptidos añadidos de forma exógena, y se mezclan a continuación con linfocitos T singénicos en presencia de IL-7 y de IL-2. Los linfocitos T se re-estimulan siguiendo cada semana mezclando los linfocitos T cultivados con células Dcs recién tratadas e irradiadas.

En un ensayo, la presencia de linfocitos T reactivos a la survivina es detectada mediante un ensayo ELISpot de IFN γ , esencialmente como se describe en el Ejemplo 7. De manera alternativa, un ensayo convencional de liberación de [51Cr] se utiliza para analizar la actividad funcional de estas células, en las que las células tumorales, que presentan péptidos de survivina en el contexto de moléculas MHC de clase I, se cargan con [51Cr] y se incuban con estos linfocitos T, y se cuantifica la lisis de células tumorales mediante liberación de [51Cr]. Una línea celular diana de control que no expresa survivina se utiliza como control negativo. Se espera que las preparaciones experimentales sean, al menos, tan efectivas como la preparación de control en generar linfocitos T que son receptores a la survivina, lo que indica que las secuencias derivadas de survivina de pollo pueden servir como epítopos que dirigen una respuesta inmune específica a células que expresan la survivina humana.

45 **Ejemplo 9.** Efectos de la vacunación en el cáncer de pulmón.

Para determinar si la respuesta inmune provocada por la vacuna pudo inhibir el crecimiento tumoral metastásico cuando el segundo tratamiento se retrasó hasta después del desafío tumoral, se llevaron a cabo los siguientes experimentos.

En el Día 0, se vacunaron ratones C57B1/6 (n=5 por condición de tratamiento) por vía oral con 100 μ l de bicarbonato de sodio al 10% seguido de 10⁸ SL7207 de Salmonella que contiene: un plásmido que codifica una survivina de pollo mutante (Survivina-de-pollo((N97E, T99M, V100L, Q101G)); un plásmido que codifica muFc-Survivina-de-pollo; o un plásmido con dos unidades transcripcionales, uno codificando Survivina-de-pollo((N97E, T99M, V100L, Q101G)) y una que codifica la proteína de fusión muFc-mull2 como adyuvante. Se trataron ratones de control con PBS.

Se trataron los ratones con una dosis previa de 100 μ l de bicarbonato de sodio al 10%, y se les administró Salmonella SL7207 en PBS (preparado tal como se ha descrito con anterioridad). Diez días después de la

vacunación de cebado, se inyectó a los ratones, por vía intravenosa, una suspensión de célula única de 1×10^6 de células LCC/KSA en 200 μ l de PBS, y se estimularon con una segunda vacuna por vía oral, utilizando la misma concentración de Salmonella. Los ratones se sacrificaron el Día 32.

- 5 Los resultados típicos se muestran en la Tabla que sigue a continuación (Tabla 3). Los resultados indican que la vacuna con Salmonella que lleva un vector de expresión para cualquier constructo de survivina de pollo, proporciona una protección similar contra el cáncer metastásico de pulmón.

Tabla 3. Pesos pulmonares y puntuaciones de metástasis de ratones con cáncer de pulmón tratados con una vacuna de survivina.

| | Media \pm desviación estándar (g) | Puntuación tumoral* |
|--|-------------------------------------|---------------------|
| PBS | 1.12 \pm 0.25 | 3,3,3,3,3 |
| Survivina-de-pollo(N97E,T99M,V100L,Q101G) | 0.23 \pm 0.05 | 1,1,1, 1,1 |
| Survivina-de-pollo(N97E,T99M,V100L,Q101G) + muFc-muLL2 | 0.21 \pm 0.13 | 1,1,2,1,1 |
| muFc-Survivina-de-pollo | 0.24 \pm 0.03 | 1,1,1,1,1 |
| | | |

- 10 En la Tabla 3, (*) la Carga Tumoral fue puntuada en una escala de 0-3 (0= ausencia de tumores en los pulmones, 1=<5% de carga tumoral, 2=5-50% de carga tumoral, 3=>50% de los pulmones cubiertos con tumores). Las puntuaciones tumorales en *italica* y en **negrita** indican ratones en los que se observó un tumor extra pulmonar en la base de la cola.

- 15 **Ejemplo 10.** Vacunación con survivina de pollo SL7207 o survivina murina que retrasa la mortalidad de forma significativa.

- Para determinar si la vacuna con Salmonella SL7207 que lleva plásmidos de expresión de survivina pudo reducir la carga tumoral y mejorar la supervivencia, se dosificaron ratones Balb/c (n=5 por condición de tratamiento) dos veces mediante alimentación por sonda por vía oral tal como se describió con anterioridad, con dos semanas de diferencia, con PBS, con Salmonella SL7207 con un plásmido de expresión de survivina murina, o Salmonella SL7207 con un plásmido de expresión de survivina de pollo de tipo silvestre. Dos semanas después de la segunda vacuna, se inyectó a los ratones por vía intravenosa con 200 μ l de una suspensión de PBS de 5×10^5 de células/ml de células singénicas CT26/KSA (las cuales también expresaban la proteína humana EpCAM, lo que no fue considerado como relevante para el experimento). Se monitorizó la supervivencia de los ratones. Tal como se ilustra en la Figura 7, hubo un perfil de supervivencia mayor en los ratones tratados con survivina de pollo SL7207 en comparación con el tratamiento con PBS o con survivina murina SL7207.

Ejemplo 11. Supervivencia prolongada de mamíferos con metástasis de cáncer como resultado de la vacuna con Salmonella que lleva vectores de expresión de survivina.

- Para abordar si los mamíferos con un cáncer pre-existente podrían vacunarse con Salmonella que lleva plásmidos de expresión de survivina, se llevó a cabo el siguiente experimento. En este experimento, ratones C57B1/6 se trataron previamente con 0.1 ml de bicarbonato de sodio al 10 % y a continuación se vacunaron por vía oral con aproximadamente 100 millones de Salmonella SL7207 que contiene un vector para la survivina murina (n=5) o Survivina-de-pollo(N97E, T99M, V 100L, Q101G) (n=5) en PBS (preparado tal como se ha descrito anteriormente) en el día 0. Ratones de control se alimentaron por sonda con bicarbonato de sodio y PBS (n=5). Diez días después de la vacunación de cebado, se inyectó a los ratones por vía intravenosa con 200 μ l de una suspensión de PBS de 5×10^6 de células/ml de células LLC/KSA (las cuales también expresaban la proteína humana EpCAM, lo que no fue considerado como relevante para el experimento). Todos los ratones fueron estimulados con una segunda vacuna por vía oral administrada 4 horas después de la inyección del tumor utilizando la misma concentración de Salmonella administrada para cebar la respuesta inmune.

- La supervivencia se siguió en el transcurso de un periodo de 12 semanas después del desafío tumoral. Todos los ratones de control fallecieron dentro de los 35 días siguientes a la administración del tumor. Como dato importante,

De acuerdo a la invención, un análisis de esas características puede producir secuencias de survivina que contengan péptidos altamente antigénicos a los que los CTL son menos propensos a ser tolerantes, por ejemplo, promoviendo respuestas a epítotos sub-dominantes.

Ejemplo 13. Tratamiento de cáncer en un paciente humano con una vacuna que contiene un vector para expresar survivina no mamífera.

De acuerdo a la invención, un humano con cáncer es tratado con una vacuna de la invención como sigue a continuación. En primer lugar, los candidatos para el tratamiento se categorizan de manera opcional con un agente diagnóstico que analiza si sus células cancerígenas sobreexpresan survivina. Por ejemplo, una muestra de tumor puede ser analizada mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-survivina. De manera alternativa, una muestra de tumor de un paciente candidato puede ser analizada mediante hibridación de un chip genético que detecta los niveles de ARNm de la survivina, mediante PCR con transcriptasa inversa, o mediante cualquier otro método que detecte los niveles de ARNm de la survivina o de proteínas. Los pacientes pueden ser categorizados como propensos a responder en base a otras pruebas diagnósticas, tales como pruebas para niveles de expresión de MHC, niveles de moléculas de transducción de señal que se sabe están implicadas en la muerte celular mediada por linfocitos T, o en base a los niveles de moléculas cuya función no se comprende pero que se sabe de forma empírica que se correlacionan con la respuesta a la inmunoterapia.

Resulta particularmente útil elegir pacientes humanos que hayan sufrido la resección quirúrgica de la mayor parte del tumor. Esto permite el análisis diagnóstico del tumor tal como se ha descrito anteriormente. Además, sin la intención de estar sujetos a la teoría, resulta ventajoso realizar el tratamiento después de una resección quirúrgica ya que un tumor grande y abultado puede valorar, de forma sencilla, el sistema inmunológico. Además, los tumores secretan factores inmunosupresores difusibles que logran mayores concentraciones en masas grandes que en pequeñas metástasis.

Los pacientes que son elegidos para el tratamiento presentan melanoma, carcinoma de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, y otros tipos de cáncer.

Después de un diagnóstico y selección de pacientes apropiados, un paciente se trata con una cepa de Salmonella que contiene un vector de expresión de survivina no mamífera (un vector para expresar survivina no mamífera en una célula mamífera). Por ejemplo, un paciente puede recibir aproximadamente 10^9 a 10^{13} de Salmonella LT2 viva que lleva un plásmido con expresión de survivina de pollo conducida desde un promotor mamífero. De manera preferente, se utilizan aproximadamente 10^{10} - 10^{12} de bacterias, y de manera más preferente se administra aproximadamente 2×10^{11} de Salmonella. La cepa de Salmonella es preferentemente auxotrófica, y cualquiera de las cepas mencionadas en los Ejemplos puede ser utilizada.

Dos métodos alternativos se utilizan para abordar el tema de la supervivencia de las bacterias de Salmonella en el ambiente ácido del estómago. Mediante el primer método, un paciente ingiere en primer lugar una cantidad segura y efectiva de bicarbonato de sodio para neutralizar el ácido del estómago. Mediante el segundo método, las bacterias de Salmonella son formuladas como una píldora con un recubrimiento entérico que permite su paso a través del estómago y la disolución en el intestino delgado.

Los efectos secundarios pueden incluir ligera diarrea cuando se utilizan las cepas bacterianas de Salmonella typhimurium; la Salmonella typhimurium es, de forma natural, un patógeno de ratón y no es normalmente un patógeno en humanos. Resulta preferente realizar el tratamiento de dicha ligera diarrea sintomáticamente, pero no tratarla con antibióticos, ya que este último tratamiento puede destruir el efecto de la vacuna.

Ejemplo 14. Tiempos de vacunación en relación al desafío tumoral.

Se llevó a cabo un experimento para evaluar la importancia de los tiempos de vacunación con la survivina de pollo en relación con el tiempo del desafío tumoral. Se dosificaron ratones con Salmonella que contiene un plásmido que codifica Survivina-de-pollo(N97E, T99M, V100L, Q101G) por alimentación con sonda por vía oral. La programación de dosificación se muestra en la Figura 9. Como se muestra, la alimentación con sonda por vía oral se llevó a cabo en los días 1 y 13; días 7 y 13; días 10 y 18; o días 13 y 21, en relación a un desafío por vía intravenosa mediante células LLC/KSA en el día 10, y una evaluación de la carga tumoral del pulmón en el día 29. Como se muestra en la Figura 10, la administración con sonda por vía oral con Salmonella que contiene un plásmido que codifica Survivina-de-pollo(N97E, T99M, V100L, Q101G) resultó efectivo para reducir la carga tumoral pulmonar, independientemente del programa de dosificación utilizado. El efecto de la vacuna fue más pronunciado cuando la dosis de vacuna de cebado se administró más de tres días previos al desafío tumoral.

Los efectos de variar la programación de dosificación en la metástasis pulmonar también se evaluaron. La metástasis pulmonar se puntuó como sigue a continuación: un ratón con más del 50% de cobertura de su superficie

pulmonar fue puntuado con una puntuación de 3; un ratón con 5-50% de su superficie pulmonar cubierta con tumor fue puntuado con una puntuación de 2; un ratón con menos del 5% de superficie pulmonar cubierta con tumor fue puntuado con una puntuación de 1; y un ratón con ninguna colonia tumoral pulmonar visible fue puntuado con una puntuación de 0. Tal como se muestra en la Figura 10, las programaciones de dosificación que incluían una primera dosis previa al desafío tumoral tendieron a reducir los valores de metástasis pulmonar en comparación con programaciones de dosificación posteriores o con ratones que no fueron inmunizados por vía oral con Survivina-de-pollo(N97E, T99M, V100L, Q101G).

Ejemplo 15. Multiterapia con vacuna de survivina y quimioterapia.

Los efectos de combinar la vacuna contra la survivina y la quimioterapia también fueron evaluados. El protocolo de pruebas de muestra en la Figura 11. Como se muestra en la figura, los ratones que reciben el tratamiento completo fueron tratados con cebado de Salmonella con un plásmido que codifica survivina de pollo de tipo silvestre en el día 1. Las células LLC/KSA fueron introducidas por vía intravenosa (desafío) en el día 4. La ciclofosfamida (CTX) fue administrada por vía intraperitoneal en el día 11 y la indometacina fue administrada los días 12-15. En el día 15, se administró a los ratones una segunda administración con sonda por vía oral (estimulación) con Salmonella que lleva el plásmido de survivina de pollo de tipo silvestre y se evaluó la carga tumoral pulmonar en el día 28.

Otros ratones recibieron solo porciones del tratamiento, recibiendo por ejemplo: sólo el cebado, el desafío, y la estimulación (PCB); el desafío, la CTX y la indometacina, pero no el cebado o la estimulación (C(CI)); el cebado, el desafío, la CTX y la indometacina, pero no la estimulación (PC(CI)); o el desafío, la CTX, la indometacina, y la estimulación, pero no el cebado (C(CI)B).

Como se muestra en la Figura 12, los ratones que reciben sólo el cebado, desafío y estimulación mostraron una puntuación de carga tumoral reducida y metástasis pulmonar reducida en comparación al control negativo. La CTX y la indometacina tuvieron efectos similares en los resultados de la metástasis pulmonar y mayor reducción total de la carga tumoral. Los resultados de cargas tumorales más bajas y de metástasis pulmonar más baja se observaron en ratones que reciben al menos el cebado y la CTX y la indometacina, lo que demuestra que el tratamiento con vacuna y la quimioterapia pueden cooperar para reducir la carga tumoral y la metástasis pulmonar.

Ejemplo 16. La vacuna basada en Salmonella con ADN que codifica la survivina no mamífera se correlaciona con la aparición de linfocitos T con un fenotipo de memoria activada.

Los linfocitos de sangre periférica se aislaron de ratones sujetos a los tratamientos PCB, CI, PC(CI), C(CI)B, o al tratamiento completo (PC(CI)B) descritos en el ejemplo anterior. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar si los tratamientos habían conducido a la aparición de linfocitos T de memoria activada. La presencia o ausencia de linfocitos T de memoria se determinó mediante la monitorización para células con alta expresión de CD44 y baja expresión de CD3 (CD44^{brillante} CD3^{bajo}). Como se muestra en la figura 13, los ratones tratados con el protocolo cebado-desafío-estimulación (PCB) mostraron linfocitos T con un perfil de expresión de CD44^{brillante} indicativo de la aparición de linfocitos T de memoria. Perfiles similares se observaron en cada uno de los protocolos que incluyeron inmunización con Salmonella que lleva un plásmido que codifica survivina de pollo, pero no en los ratones tratados sólo con quimioterapia (y no en los controles negativos).

Ejemplo 17. Multiterapia con una inmunocitocina y una vacuna con ADN que codifica survivina no mamífera.

Para determinar si una vacuna que utiliza una survivina no mamífera puede mejorar la eficacia de un tratamiento de tumores basado en inmunocitocinas, en el día 1 se proporcionó un desafío a ratones con células LLC/KSA por vía subcutánea y se trataron de acuerdo a la programación que se muestra en la Figura 14. Los ratones que reciben administración con sonda por vía oral con Salmonella que aloja un plásmido que codifica Survivina-de-pollo(N97E, T99M, V100L, Q101G) recibieron dosis en los días 4, 11, 18, y 25. La inmunocitocina seleccionada para usar en este experimento fue una fusión de la IL-2 con un anticuerpo anti-EpCAM desinmunizado, tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense US publication 2003-0157054. Los ratones que reciben la inmunocitocina, recibieron 20 µg de la inmunocitocina por vía intravenosa en los días 8, 9 y 10.

Los volúmenes tumorales resultantes con el tiempo se muestran en la Figura 15. Cualquiera de las vacunas o tratamientos con inmunocitocina fueron suficiente para ralentizar el crecimiento tumoral en el tiempo. A los ratones que reciben tanto la vacuna como la inmunocitocina les fue incluso mejor, lo que demuestra reducciones adicionales en la tasa de crecimiento tumoral en comparación con la vacunación sola o con el tratamiento de inmunocitocinas solo.

Ejemplo 18. Evaluación de la actividad biológica de constructos de survivina de la invención.

Algunas de las variantes de survivina de la invención están diseñadas para ser biológicamente inertes. Por tanto, las propias proteínas no muestran actividad anti-apoptótica cuando se expresan en células bajo condiciones que

normalmente inducen la apoptosis evitable por una proteína survivina de tipo silvestre. De manera similar, las proteínas no interfieren con la actividad de la survivina de tipo silvestre endógena para proteger las células del efecto de los agentes que inducen la apoptosis.

5 La capacidad de ser biológicamente inerte de una proteína survivina puede ser evaluada utilizando células precursoras de linfocitos BaF3. Los linfocitos BaF3 son dependientes de la IL-3 para el crecimiento y experimentan apoptosis después de la inhabilitación del factor de crecimiento, lo que puede ser contrarrestado por la actividad de la survivina (ver, por ejemplo, Ambrosini et al., (1997) Nat. Med. 3:917-921). Los linfocitos BaF3 son transfectados con plásmidos que codifican un constructo de survivina de la invención, una proteína survivina de tipo silvestre o un inserto vacío, y adicionalmente una proteína marcadora tal como GFP, de manera que las células que expresan el ADN introducido de manera exógena pueden ser monitorizadas. Tras la recuperación de la transfección, la IL-3 se extrae del medio y los linfocitos BaF3 se monitorizan para la apoptosis mediante, por ejemplo, la evaluación del porcentaje (%) de viabilidad en los días 1, 2, 3, y 4, o mediante un ensayo indicativo de apoptosis que sea familiar para aquellos expertos en el arte, tales como mediante morfología nuclear (condensación y fragmentación de ADN). Se observó que mientras que los linfocitos BaF3 transfectados con survivina de tipo silvestre permanecen en gran parte viables en un periodo de 4 días, los linfocitos BaF3 transfectados con un plásmido vacío o una variante de survivina de la invención no permanecen viables y muestran en gran medida una morfología nuclear indicativa de apoptosis.

La capacidad de ser biológicamente inerte de una proteína survivina puede ser también evaluada utilizando células HeLa. Las células HeLa expresan survivina endógena en niveles significativos, y se sabe que mutaciones en concreto, tales como huSurvivina(C84A), actúan como una forma dominante negativa de la survivina (DN Survivina) e inducen la apoptosis en estas células (ver por ejemplo Li et al., (1999) Nat. Cell Biology 1:461-466). Las células HeLa son transfectadas con plásmidos que codifican una Survivina DN o un constructo de survivina de la invención, además de una proteína marcadora tal como GFP, de manera que las células que expresan el ADN introducido de manera exógena puedan ser monitorizadas. Después de la recuperación de la transfección, las células HeLa se cultivan durante 48 horas, fijadas, los núcleos se tiñen con DAPI, y la morfología nuclear de las células es analizada mediante microscopía de inmunofluorescencia. Se observa que mientras que las células HeLa transfectadas con Survivina DN habitualmente presentan señales de haber sufrido apoptosis, tales como núcleos condensados y fragmentados, las células HeLa transfectadas con constructos de survivina de la invención crecen normalmente.

Ejemplo 19: Evaluación de la estabilidad de los constructos de survivina de la invención.

30 Para evaluar la estabilidad de un constructo de survivina, éste puede ser expresado de un vector que adicionalmente expresa una proteína marcadora tal como GFP de manera que la cantidad de proteína survivina expresada pueda medirse en relación a un estándar. Las células de cultivo tisular, tales como las células BHK, son transfectadas de manera transitoria y el nivel de expresión del constructo de survivina es analizado en un ensayo Western blot, normalizado con la expresión del marcador. Si los anticuerpos anti-survivina disponibles no reconocen la proteína, las versiones etiquetadas en C-terminal de estas variantes pueden ser utilizadas. Se observa que en comparación con la survivina de tipo silvestre, ciertos constructos de survivina modificada preferentes de la invención, tal como aquellos con mutaciones desestabilizantes múltiples, son detectados en niveles mucho más reducidos.

Además de evaluar los niveles del estado de estabilidad, la tasa de degradación puede ser evaluada en el transcurso de un experimento. Se añade el inhibidor de la traducción cicloheximida a las células en el tiempo 0 y las células se incuban durante 4 horas. En los minutos 0, 2, 5, 10, 20, 60 y 240, las muestras se extraen del análisis Western blot. Para comparar las tasas entre los constructos de survivina modificada y la survivina de tipo silvestre, las cantidades se normalizan al punto del tiempo 0. Se observa que ciertos constructos de survivina modificada preferentes de la invención se degradan más rápidamente que la survivina de tipo silvestre.

45 Para evaluar si la degradación se está desarrollando mediante la vía mediada por el proteosoma, las células se incuban de manera opcional en presencia o ausencia de un inhibidor de proteosoma tal como la lactacistina (2 hrs, 100 μ M), y de nuevo los niveles de survivina se analizan por Western blot. En presencia de lactacistina, se observa que las variantes de survivina de la invención huSurvivina se detectan en niveles similares.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Merck Patent GmbH

<120> Composiciones y Métodos para el tratamiento de tumores que presentan antígenos de survivina

<130> LEX-037

5 <150> EP 06 805 883.3

<151> 2006-09-27

<160> 84

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5

15 <210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu
1 5

20

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 3

Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe
1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

5

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> fragmento de la región bisagra de IgG1 con serina en el lugar de cisteína.

<400> 5

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
1 5

<210> 6

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento modificado de proteína survivina de mamífero

20

<400> 6

Leu Met Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

25

<213> Gallus gallus

<400> 7

Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn
1 5

ES 2 386 411 T3

<210> 8

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 8

```

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
 1          5          10          15
His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
          20          25          30
Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
          35          40          45
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 50          55          60
Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
 65          70          75          80
Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
          85          90          95
Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
          100          105          110
Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala

```

115

120

125

```

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

```

<210> 9

<211> 142

<212> PRT

10 <213> Canis familiaris

<400> 9

ES 2 386 411 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 140

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 10

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

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

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

ES 2 386 411 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Gallus gallus

<400> 11

ES 2 386 411 T3

Met Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu
 1 5 10 15
 Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly
 20 25 30
 Cys Ala Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Ala Ala Gly Phe Val His Cys
 35 40 45
 Pro Ser Glu Asn Ser Pro Asp Val Val Gln Cys Phe Phe Cys Leu Lys
 50 55 60
 Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Leu Glu Glu His Lys
 65 70 75 80
 Lys His Ser Ala Gly Cys Ala Phe Ala Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser
 85 90 95
 Asn Leu Thr Val Gln Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Lys Arg Thr Lys
 100 105 110
 Asn Val Ile Lys Lys Ala Ile Ser Gln Lys Glu Thr Asp Ile Glu Asp
 115 120 125
 Val Ala Lys Gly Val Arg His Ala Ile Glu Asn Met Gly Pro
 130 135 140

<210> 12

<211> 142

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> survivina-de-pollo(N97E, T99M, V100L, Q101G)

<400> 12

ES 2 386 411 T3

Met Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu
 1 5 10 15

Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly
 20 25 30

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

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

Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Leu Glu Glu His Lys
 65 70 75 80

Lys His Ser Ala Gly Cys Ala Phe Ala Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser
 85 90 95

Glu Leu Met Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Lys Arg Thr Lys
 100 105 110

Asn Val Ile Lys Lys Ala Ile Ser Gln Lys Glu Thr Asp Ile Glu Asp
 115 120 125

Val Ala Lys Gly Val Arg His Ala Ile Glu Asn Met Gly Pro
 130 135 140

<210> 13

<211> 157

<212> PRT

5 <213> Xenopus laevis

<400> 13

ES 2 386 411 T3

Met Leu Ser Ile Ser Pro Ile Val Ser Leu Arg Arg Cys Asp Asn Glu
1 5 10 15

Pro Ser Met Pro Asp Glu Trp Arg Leu Tyr Asn Leu Ala Thr Arg Leu
20 25 30

Arg Thr Phe Ser Asn Trp Pro Phe Thr Glu Asp Cys Ala Cys Thr Pro
35 40 45

Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Val His Cys Pro Thr Asp Asn Ser
50 55 60

Pro Asp Val Val Lys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Asp Pro Met Asp Glu His Lys Lys His Ser Pro Ser
85 90 95

Cys Leu Phe Ile Ala Leu Lys Lys Lys Ala Glu Glu Leu Thr Leu Ser
100 105 110

Glu Phe Leu Lys Leu Asp Leu Glu His Thr Lys Ile Lys Met Gln Lys
115 120 125

Gln Met Asn Leu His Ile Glu Arg Phe Gln Ala Lys Ala Asn Glu Val
130 135 140

Arg Gly His Leu Glu Lys Leu Asp Ala Asp Glu Thr Gln
145 150 155

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val
1 5

<210> 15

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Tyr
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Tyr
1 5

<210> 17

<211> 19

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético: cebador sentido exterior

<400> 17

15 gaaaaatggc ggcctatgc 19

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> sintético: cebador antisentido exterior

<400> 18

caccgtagac ccagaggaac c 21

<210> 19

25 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético: cebador sentido interior que incorpora un sitio de restricción de Xba I.

<400> 19

ctctagaatg gcggcctatg ctg 23

<210> 20

<211> 27

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético: cebador antisentido exterior que incorpora una sitio de restricción de Xho I.

<400> 20

10 cctcgagacc taagggccca tgttctc 27

<210> 21

<211> 429

<212> ADN

<213> Gallus gallus

15 <400> 21

| | |
|---|------------|
| atggcggcct atgctgaaat gctgccaag gaatggctgg tctacctcgt ctccacccgc | 60 |
| gccgccacct tccgcaactg gcccttcacc gagggctgcg cctgcacgcc cgagcggatg | 120 |
| gcggcggcgg gcttcgtgca ctgccccagc gagaacagcc ccgacgtggt gcagtgcttc | 180 |
| ttctgcctca aggagctgga gggctgggag cccgacgacg acccgctgga ggaacacaaa | 240 |
| aagcaactccg cgggctgcmc ttttgccgct cttcagaaag atccctctaa cctgacggtg | 300 |
| caggaattct tgaagctgga taaaaagcgg accaaaaacg taattaaaaa agcaatttct | 360 |
| cagaaggaaa ctgatatcga agatgtagcc aagggcgtgc ggcacgcgat agagaacatg | 420 |
| ggcccttag | 429 |

<210> 22

<211> 36

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintético: molécula doble adaptadora sentido oligo

<400> 22

gggtgcagcg gcctatgctg aaatgctgcc caagga 36

<210> 23

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> sintético: molécula doble adaptadora antisentido oligo

<400> 23

ttgggcagca ttcagcata ggccgctgca ccc 33

<210> 24

10 <211> 1337

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia que codifica un proteína de fusión huFc-survivina de pollo

15 <400> 24

ES 2 386 411 T3

| | |
|--|-------------|
| gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag | 60 |
| gcctcgccct ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag | 120 |
| gccccagccg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg | 180 |
| gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac | 240 |
| ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa | 300 |
| ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta | 360 |
| caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg | 420 |
| caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat | 480 |
| ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggt gcgagggcca catggacaga ggccggctcg | 540 |
| gcccaccctc tgccctgaga gtgaccgctg taccaacctc tgtccctaca gggcagcccc | 600 |
| gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cacgggagga gatgaccaag aaccagggtca | 660 |
| gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca | 720 |
| atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct | 780 |
| tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct | 840 |
| catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt | 900 |
| ccccgggtgc agcggcctat gctgaaatgc tgcccaagga atggctggtc tacctcgtct | 960 |
| ccaccgcgc cgccacctc cgcaactggc ccttcaccga gggctgcgcc tgcacgcccg | 1020 |
| agcggatggc ggcggcgggc ttcgtgcaact gccccagcga gaacagcccc gacgtgggtgc | 1080 |
| agtgtcttct ctgcctcaag gagctggagg gctgggagcc cgacgacgac ccgctggagg | 1140 |
| aacacaaaaa gcactccgcg ggctgcgctt ttgccgctct tcagaaagat ccctctaacc | 1200 |
| | |
| tgacggtgca ggaattcttg aagctggata aaaagcggac caaaaacgta attaaaaaag | 1260 |
| caatttctca gaaggaaact gatatcgaag atgtagccaa gggcgtgcgg cacgcgatag | 1320 |
| agaacatggg cccttag | 1337 |

<210> 25

<211> 373

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> proteína de fusión huFc-survivina de pollo

<400> 25

ES 2 386 411 T3

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro
 225 230 235 240
 Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg
 245 250 255
 Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly Cys Ala Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala
 260 265 270
 Ala Ala Gly Phe Val His Cys Pro Ser Glu Asn Ser Pro Asp Val Val
 275 280 285
 Gln Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp
 290 295 300
 Asp Pro Leu Glu Glu His Lys Lys His Ser Ala Gly Cys Ala Phe Ala
 305 310 315 320
 Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser Asn Leu Thr Val Gln Glu Phe Leu Lys
 325 330 335
 Leu Asp Lys Lys Arg Thr Lys Asn Val Ile Lys Lys Ala Ile Ser Gln
 340 345 350
 Lys Glu Thr Asp Ile Glu Asp Val Ala Lys Gly Val Arg His Ala Ile
 355 360 365
 Glu Asn Met Gly Pro
 370

<210> 26

<211> 1125

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia que codifica una proteína de fusión muFc-survivina de pollo

<400> 26

ES 2 386 411 T3

gagcccagag ggcccacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccagc acctaacctc 60
 ttgggtggac catccgtctt catcttcctt ccaaagatca aggatgtact catgatctcc 120
 ctgagcccca tagtcacatg tgtgggtggg gatgtgagcg aggatgacc agatgtccag 180
 atcagctggt ttgtgaacaa cgtggaagta cacacagctc agacacaaac ccatagagag 240
 gattacaaca gtactctccg ggtgggtcagt gccctcccca tccagcacca ggactggatg 300
 agtggcaagg agttcaaatg caaggtcaac aacaaagacc tcccagcgcc catcgagaga 360
 accatctcaa aacccaaagg gtcagtaaga gctccacagg tatatgtctt gcctccacca 420

gaagaagaga tgactaagaa acaggtcact ctgacctgca tggtcacaga cttcatgcct 480
 gaagacattt acgtggagtg gaccaacaac gggaaaacag agctaaacta caagaacact 540
 gaaccagtcc tggactctga tggttcttac ttcatgtaca gcaagctgag agtggaaaag 600
 aagaactggg tggaaagaaa tagctactcc tgttcagtgg tccacgaggg tctgcacaat 660
 caccacacga ctaagagctt ctcccggacc ccgggtgcag cggcctatgc tgaaatgctg 720
 cccaaggaat ggctgggtcta cctcgtctcc acccgcgccg ccaccttccg caactggccc 780
 ttcaccgagg gctgcgctg cacgcccag cggatggcgg cggcgggctt cgtgactgc 840
 cccagcgaga acagccccga cgtgggtgcag tgcttcttct gcctcaagga gctggagggc 900
 tgggagcccg acgacgacct gctggaggaa cacaaaaagc actccgcggg ctgcgctttt 960
 gccgctcttc agaaagatcc ctctaacctg acggtgcagg aattcttgaa gctggataaa 1020
 aagcggacca aaaacgtaat taaaaagca atttctcaga aggaaactga tadcgaagat 1080
 gtagccaagg gcgtgcggca cgcgatagag aacatgggcc cttag 1125

<210> 27

<211> 374

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> proteína de fusión muFc-survivina de pollo

<400> 27

ES 2 386 411 T3

Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
 1 5 10 15
 Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 20 25 30
 Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val
 35 40 45
 Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe
 50 55 60
 Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu
 65 70 75 80
 Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His
 85 90 95
 Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys
 100 105 110
 Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser
 115 120 125
 Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met

ES 2 386 411 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| 130 | | | | | | 135 | | | | | | | | | | 140 |
| Thr 145 | Lys | Lys | Gln | Val | Thr 150 | Leu | Thr | Cys | Met | Val 155 | Thr | Asp | Phe | Met | Pro 160 | |
| Glu | Asp | Ile | Tyr | Val 165 | Glu | Trp | Thr | Asn | Asn 170 | Gly | Lys | Thr | Glu | Leu 175 | Asn | |
| Tyr | Lys | Asn | Thr 180 | Glu | Pro | Val | Leu | Asp 185 | Ser | Asp | Gly | Ser | Tyr 190 | Phe | Met | |
| Tyr | Ser | Lys 195 | Leu | Arg | Val | Glu | Lys 200 | Lys | Asn | Trp | Val | Glu 205 | Arg | Asn | Ser | |
| Tyr | Ser 210 | Cys | Ser | Val | Val | His 215 | Glu | Gly | Leu | His | Asn 220 | His | His | Thr | Thr | |
| Lys 225 | Ser | Phe | Ser | Arg | Thr 230 | Pro | Gly | Ala | Ala | Ala 235 | Tyr | Ala | Glu | Met | Leu 240 | |
| Pro | Lys | Glu | Trp | Leu 245 | Val | Tyr | Leu | Val | Ser 250 | Thr | Arg | Ala | Ala | Thr 255 | Phe | |
| Arg | Asn | Trp | Pro 260 | Phe | Thr | Glu | Gly | Cys 265 | Ala | Cys | Thr | Pro | Glu 270 | Arg | Met | |
| Ala | Ala | Ala 275 | Gly | Phe | Val | His | Cys 280 | Pro | Ser | Glu | Asn | Ser 285 | Pro | Asp | Val | |
| Val | Gln 290 | Cys | Phe | Phe | Cys | Leu 295 | Lys | Glu | Leu | Glu | Gly 300 | Trp | Glu | Pro | Asp | |
| Asp 305 | Asp | Pro | Leu | Glu | Glu 310 | His | Lys | Lys | His | Ser 315 | Ala | Gly | Cys | Ala | Phe 320 | |
| Ala | Ala | Leu | Gln | Lys 325 | Asp | Pro | Ser | Asn | Leu 330 | Thr | Val | Gln | Glu | Phe 335 | Leu | |
| Lys | Leu | Asp | Lys 340 | Lys | Arg | Thr | Lys | Asn 345 | Val | Ile | Lys | Lys | Ala 350 | Ile | Ser | |
| Gln | Lys | Glu 355 | Thr | Asp | Ile | Glu | Asp 360 | Val | Ala | Lys | Gly | Val 365 | Arg | His | Ala | |
| Ile | Glu 370 | Asn | Met | Gly | Pro | | | | | | | | | | | |

- <210> 28
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
<223> sintético: cebador sentido mutagénico Mut1s
<400> 28
cctctgaact gatgtgggg gagtcttga agctggat 38
<210> 29
- 10 <211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> sintético: cebador antisentido mutagénico Mut1a
- 15 <400> 29
aactcccca acatcagttc agagggatct ttctg 35
<210> 30
<211> 41
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> sintético: cebador flanqueador Pr1s
<400> 30
ccgcgccgc cccctcacc atggcgcct atgctgaaat g 41
- 25 <210> 31
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 30 <223> sintético: cebador flanqueador Pr1a
<400> 31

agatctggat ccctaagggc ccatgttctc tatc 34

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido derivado de survivina de pollo

<400> 32

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

Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Val
20 25 30

10 <210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> fragmento de proteína de survivina Humana modificada

<400> 33

Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu Ala
1 5 10

<210> 34

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His
1 5 10

<210> 35

25 <211> 9

<212> PRT

ES 2 386 411 T3

<210> 39

<211> 142

<212> PRT

<213> Sus scrofa

5 <400> 39

```

Met Ser Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp
 1          5          10
His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
 20          25
Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Ala Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
 35          40
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 50          55          60
Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
 65          70          75
Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
 85          90          95
Thr Leu Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Glu Arg Ala Lys Asn Lys
100          105          110
Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
115          120          125
Lys Lys Val Arg Cys Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Ser Glu
130          135          140

```

<210> 40

<211> 142

<212> PRT

10 <213> Bos taurus

<400> 40

ES 2 386 411 T3

Met Ser Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41

<211> 142

5 <212> PRT

<213> Felis catus

<400> 41

ES 2 386 411 T3

Met Gly Ala Ser Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg Val Arg Cys Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Leu Glu
 130 135 140

<210> 42

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 42

ES 2 386 411 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 43

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Pongo pygmaeus

<400> 43

ES 2 386 411 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys

100

105

110

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

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

<210> 44

<211> 135

<212> PRT

5 <213> Gallus gallus

<400> 44

ES 2 386 411 T3

Met Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu
 1 5 10 15

Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly
 20 25 30

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

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

Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Leu Glu Glu His Lys
 65 70 75 80

Lys His Ser Ala Gly Cys Ala Phe Ala Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser
 85 90 95

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

Asn Val Ile Val Arg Thr Pro Arg Gln Arg Gly Gly Ala Pro Cys Pro
 115 120 125

Ala Leu Leu Pro Ala Leu Ala
 130 135

<210> 45

<211> 59

<212> PRT

5 <213> Gallus gallus

<400> 45

ES 2 386 411 T3

Met Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu
1 5 10 15

Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly
20 25 30

Cys Ala Cys Thr Pro Glu Arg Gly Gly Thr Gln Lys Ala Leu Arg Gly
35 40 45

Leu Arg Phe Cys Arg Ser Ser Glu Arg Ser Leu
50 55

<210> 46

<211> 160

<212> PRT

5 <213> Xenopus laevis

<400> 46

ES 2 386 411 T3

Met Tyr Ser Ala Lys Asn Arg Phe Val Gln Ala Val Gln Arg Leu Gln
 1 5 10 15
 Asp Phe Lys Asn Met Tyr Asp Tyr Asp Ala Arg Leu Ala Thr Phe Ala
 20 25 30
 Asp Trp Pro Phe Thr Glu Asn Cys Lys Cys Thr Pro Glu Ser Met Ala
 35 40 45
 Lys Ala Gly Phe Val His Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Val Ala
 50 55 60
 Cys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp
 65 70 75 80
 Asp Pro Trp Thr Glu His Ser Lys Arg Ser Ala Asn Cys Gly Phe Leu
 85 90 95
 Ser Leu Thr Lys Cys Val Asn Asp Leu Thr Met Glu Gly Phe Leu Arg
 100 105 110
 Leu Glu Gly Asp Arg Ile Lys Ser Phe Tyr Arg Lys Phe Ser Thr Val
 115 120 125
 Val Leu Gln Tyr Val Glu Glu Glu Met Thr Ala Ala Thr Lys Arg Leu
 130 135 140
 Leu Glu Tyr Phe Ser Asn Gln His Gln Cys Ser Ile Asp Leu Asp His
 145 150 155 160

<210> 47

<211> 156

<212> PRT

5 <213> Xenopus laevis

<400> 47

Met Ser Ser Cys Ser Ile Val Ser Leu Leu Pro Gly Asp Lys Glu Pro
 1 5 10 15
 Ser Met Pro Asp Glu Trp Arg Leu Tyr Lys Leu Ala Thr Arg Leu Arg

ES 2 386 411 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | 30 | | | |
| Thr | Phe | Ser | Asn | Trp | Pro | Phe | Thr | Glu | Asp | Cys | Ala | Cys | Thr | Pro | Glu |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Arg | Met | Ala | Glu | Ala | Gly | Phe | Val | His | Cys | Pro | Ser | Asp | Asn | Ser | Pro |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Asp | Val | Val | Lys | Cys | Phe | Phe | Cys | Leu | Lys | Glu | Leu | Glu | Gly | Trp | Gln |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Pro | Glu | Asp | Asp | Pro | Met | Asp | Glu | His | Lys | Lys | His | Ser | Pro | Ser | Cys |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Leu | Phe | Ile | Ala | Leu | Lys | Lys | Lys | Ala | Glu | Glu | Leu | Thr | Leu | Ser | Glu |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Phe | Leu | Lys | Leu | Asp | Leu | Glu | Arg | Thr | Lys | Ile | Lys | Met | Gln | Lys | Gln |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Met | Asn | Leu | Arg | Ile | Glu | Cys | Phe | Gln | Ala | Lys | Ala | Asn | Glu | Val | Arg |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Gly | His | Leu | Glu | Gln | Leu | Asp | Ala | Asp | Glu | Thr | Gln | | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | |

<210> 48

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Danio rerio

<400> 48

ES 2 386 411 T3

Met Asp Leu Ala Ser Asp Asp Gln Thr Lys Met Tyr Phe Tyr Glu Asn
 1 5 10 15

Arg Leu Gln Thr Phe Val Gly Trp Pro Phe Glu Glu Gly Cys Val Cys
 20 25 30

Thr Pro Glu Asn Met Ala Lys Ala Gly Phe Ile His Thr Pro Ser Glu
 35 40 45

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

Gly Trp Glu Pro Glu Asp Asp Pro Glu Lys Glu His Lys Ala His Ser
 65 70 75 80

Pro Ser Cys Asp Phe Ile Leu Leu Lys Lys Thr Val Asp Ser Leu Thr
 85 90 95

Val Glu Glu Phe Leu Lys Leu Gln Lys Glu Arg Gln Lys Phe Ile Ile
 100 105 110

Lys Lys Ser Cys Gly His Ala Ile Asp Lys Phe Glu Asp Ala Val Lys
 115 120 125

Leu Lys Arg Asn Gln Ile Ile Gln Thr Ala Met Gly Glu Glu
 130 135 140

<210> 49

<211> 128

<212> PRT

5 <213> Danio rerio

<400> 49

ES 2 386 411 T3

Met Tyr Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Gln Thr Phe Ser Glu Trp Pro Phe
 1 5 10 15
 Arg Glu Asp Cys Gln Cys Thr Pro Glu Leu Met Ala Lys Ala Gly Phe
 20 25 30
 Val His Cys Pro Ser Glu Asn Glu Pro Asp Val Ala Cys Cys Phe Tyr
 35 40 45
 Cys Leu Arg Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asn Pro Trp Ser
 50 55 60
 Glu His Ala Lys Arg Ser Pro Asn Cys Ala Phe Leu His Met Ser Lys
 65 70 75 80
 Thr Phe Asp Glu Leu Thr Ala Ile Glu Tyr Phe His Leu Glu Gln Glu
 85 90 95
 Arg Leu Arg Ile Tyr Ile Lys Lys Met Gly His Arg Lys Ile Ala Tyr
 100 105 110
 Phe Arg Asp Glu Val Glu Ala Thr Ser Lys Asn Leu Arg Ala Leu Ile
 115 120 125

<210> 50

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Tetraodon nigroviridis

<400> 50

Met Asn Pro Tyr Asn Asp Gln His Leu Lys Met Tyr Phe Tyr Glu Asn
 1 5 10 15
 Arg Leu Lys Thr Phe Glu Gly Trp Pro Phe Glu Glu Asp Cys Leu Cys
 20 25 30
 Thr Pro Glu Asn Met Ala Lys Ala Gly Phe Val His Thr Pro Ser Glu
 35 40 45

ES 2 386 411 T3

Asn Ser Pro Asp Thr Ala Met Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu
50 55 60

Gly Trp Glu Pro Asp Asp Glu Pro Lys Lys Glu His Lys Ser His Ser
65 70 75 80

Pro Ser Cys His Phe Ile Ala Leu Lys Lys Lys Val Glu Glu Leu Ser
85 90 95

Val Glu Glu Phe Val Lys Leu Gln Met Glu Arg Gln Lys Phe
100 105 110

<210> 51

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Tetraodon nigroviridis

<400> 51

Met Ala Ser Ile Asp Val Leu Lys Glu Arg Phe Ser Ser Tyr Asp Arg
1 5 10 15

Met Tyr Arg Gln Glu Leu Arg Glu Arg Thr Phe Val Asp Trp Pro Phe
20 25 30

Arg Glu Asp Cys Asn Cys Thr Pro Glu Lys Met Ala Lys Ala Gly Phe
35 40 45

Val His Cys Pro Ser Glu Asn Glu Pro Asp Val Ala Cys Cys Phe Phe
50 55 60

Cys Leu Ile Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Trp Ser
65 70 75 80

Glu His Val Lys Arg Tyr Pro Asn Cys Gly Phe Leu Thr Met Lys Lys
85 90 95

Asp Phe Thr Glu Leu Thr Val Gly Glu Tyr Phe Leu Met Glu Gln Glu
100 105 110

Arg Leu Lys Val
115

<210> 52

<211> 140

ES 2 386 411 T3

<212> PRT

<213> Ictalurus punctatus

<400> 52

Met Glu Leu Met Asn Glu Asp Leu Lys Met Tyr Phe Tyr Glu Asn Arg
1 5 10 15

Leu Ala Ser Tyr Ser Gly Trp Pro Phe Asp Glu Asp Cys Ala Cys Thr
20 25 30

Ser Asp Asn Met Ala Lys Ala Gly Phe Ile His Lys Pro Thr Glu Asn
35 40 45

Ser Pro Asp Val Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly
50 55 60

Trp Glu Pro Glu Asp Asp Pro Leu Lys Glu His Lys Ser His Ser Pro
65 70 75 80

Thr Cys Asn Phe Ile Leu Leu Lys Lys Pro Val Glu Glu Leu Thr Val
85 90 95

Glu Glu Ile Leu Lys Leu Gln Lys Glu Arg Gln Lys Phe His Ile Lys
100 105 110

Met Ala Cys Arg Gln Val Ile Glu Lys Phe Glu Glu Ala Ala Lys Ser
115 120 125

Arg Arg Gly Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Glu Gly
130 135 140

5 <210> 53

<211> 72

<212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

<400> 53

Gln His Arg Val Glu Ser Tyr Lys Ser Trp Pro Phe Pro Glu Thr Ala
 1 5 10 15

Ser Cys Ser Ile Ser Lys Met Ala Glu Ala Gly Phe Tyr Trp Thr Gly
 20 25 30

Thr Lys Arg Glu Asn Asp Thr Ala Thr Cys Phe Val Cys Gly Lys Thr
 35 40 45

Leu Asp Gly Trp Glu Pro Glu Asp Asp Pro Trp Lys Glu His Val Lys
 50 55 60

His Ala Pro Gln Cys Glu Phe Ala
 65 70

<210> 54

<211> 68

<212> PRT

5 <213> Caenorhabditis elegans

<400> 54

Asp Arg Leu Met Thr Phe Lys Asn Phe Glu Tyr Asp Arg Asp Pro Asp
 1 5 10 15

Ala Lys Cys Thr Ser Gln Ala Val Ala Gln Ala Gly Phe Tyr Cys Thr
 20 25 30

Gly Pro Gln Ser Gly Lys Cys Ala Phe Cys Asn Lys Glu Leu Asp Phe
 35 40 45

Asp Pro Glu Asp Asp Pro Trp Tyr Glu His Thr Lys Arg Asp Glu Pro
 50 55 60

Cys Glu Phe Val
 65

<210> 55

<211> 157

10 <212> PRT

ES 2 386 411 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Survivina de Xenopus laevis SIX (T110M, S112G)

<400> 55

Met Leu Ser Ile Ser Pro Ile Val Ser Leu Arg Arg Cys Asp Asn Glu
 1 5 10 15
 Pro Ser Met Pro Asp Glu Trp Arg Leu Tyr Asn Leu Ala Thr Arg Leu
 20 25 30
 Arg Thr Phe Ser Asn Trp Pro Phe Thr Glu Asp Cys Ala Cys Thr Pro
 35 40 45
 Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Val His Cys Pro Thr Asp Asn Ser
 50 55 60
 Pro Asp Val Val Lys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Asp Pro Met Asp Glu His Lys Lys His Ser Pro Ser
 85 90 95
 Cys Leu Phe Ile Ala Leu Lys Lys Lys Ala Glu Glu Leu Met Leu Gly
 100 105 110
 Glu Phe Leu Lys Leu Asp Leu Glu His Thr Lys Ile Lys Met Gln Lys
 115 120 125
 Gln Met Asn Leu His Ile Glu Arg Phe Gln Ala Lys Ala Asn Glu Val
 130 135 140
 Arg Gly His Leu Glu Lys Leu Asp Ala Asp Glu Thr Gln
 145 150 155

5

<210> 56

<211> 142

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Survivina-Humana(R18E, P47L, Q56L, H77A, C84A, A128P, I135P)

<400> 56

ES 2 386 411 T3

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
 1 5 10 15
 His Glu Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
 20 25 30
 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Leu Thr
 35 40 45
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Leu Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 50 55 60
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu Ala Lys Lys His
 65 70 75 80
 Ser Ser Gly Ala Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
 85 90 95
 Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
 100 105 110
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Pro
 115 120 125
 Lys Lys Val Arg Arg Ala Pro Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
 130 135 140

<210> 57

<211> 429

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 57

```

atgggtgcc cgacgttgcc ccctgcctgg cagcccttc tcaaggacca ccgcatctct      60
acattcaaga actggccctt cttggagggc tgcgcctgca ccccgagcg gatggccgag      120
gctggcttca tccactgccc cactgagaac gagccagact tggcccagtg tttcttctgc      180
ttcaaggagc tggaaggctg ggagccagat gacgaccca tagaggaaca taaaaagcat      240
tcgtccggtt gcgctttcct ttctgtcaag aagcagtttg aagaattaac ccttggtgaa      300
tttttgaaac tggacagaga aagagccaag aacaaaattg caaaggaaac caacaataag      360
aagaaagaat ttgaggaaac tgcggagaaa gtgcgccgtg ccatcgagca gctggctgcc      420
atggattga                                     429
  
```

<210> 58

ES 2 386 411 T3

<211> 474

<212> ADN

<213> *Xenopus laevis*

<400> 58

```

atgttgagta tttctccgat tgtttctcta cgtcgctgtg ataatgagcc gtctatgccc 60
gacgaatggc gcctgtataa cttggctacg cgcctcagga ctttctctaa ctggcccttt 120
actgaagact gcgcttgtag cccagagcgg atggcagagg ctggatttgt tcaactgcccc 180
actgacaaca gtccagatgt ggtaagtgt ttcttctgtc tcaaagaact agaaggttgg 240
cagcctgagg atgaccctat ggatgaacac aagaaacatt caccaagctg cttattcatc 300
gcattgaaaa agaaagcaga ggaactgaca ctaagcgagt tcctgaaact ggacttggag 360
catacgtaaa tcaagatgca aaagcagatg aacctgcaca ttgaaagggt ccaggcaaaa 420
gcaaatgagg tgcgggggtca cttggagaaa cttgatgctg acgaaacaca gtga 474

```

5

<210> 59

<211> 483

<212> ADN

<213> *Xenopus laevis*

<400> 59

10

```

atgtactctg ccaagaacag gtttgtgcaa gcagtgcaac gcctgcagga ttttaagaat 60
atgtatgatt atgacgcccg cttgcaaca ttcgcagact ggccctttac tgaaaactgc 120
aagtgcaccc cagaaagtat ggctaaagct ggctttgttc actgccccac tgagaatgaa 180
cccgatgttg cttgctgttt tttctgcttg aaggagctgg agggctggga gccagatgat 240
gacccttggga ctgaacattc caagcgttct gccaaactgtg gtttcctctc cctgacaaag 300
tgtgtcaatg acctcacaat ggaggggttt ctgaggctgg aaggatgatc gatcaagagt 360
ttctatcgca agttttctac tgtcgcttct cagtacgtcg aggaagaaat gactgcagct 420
acaaagcgcc tgctggaata cttctccaac caacaccatt gctccataga tcttgaccac 480
tga 483

```

<210> 60

<211> 429

<212> ADN

15 <213> *Danio rerio*

<400> 60

ES 2 386 411 T3

atggatcttg caagtgatga tcagaccaa atgtactttt acgagaatag acttcaaaca 60
 ttcgtcgggt ggccgtttga agagggctgc gtttgcactc cagaaaacat ggctaaagct 120
 ggatttattc acaccccgtc ggagaacagt ccagatatag cgcagtgttt cttctgtctg 180
 aaagagctgg aaggatggga accggaggat gaccctgaga aagagcataa agcgcattct 240
 cccagctgtg attttatctt gctgaagaag acagtggaca gtctgactgt ggaggaattt 300
 ctaaaacttc agaaagagag acagaagttt attattaaaa aatcatgtgg ccacgcgatt 360
 gataaatttg aagacgcagt gaagctcaag agaaaccaga tcatccagac tgcgatggga 420
 gaggaatga 429

<210> 61

<211> 423

<212> ADN

5 <213> Ictalurus punctatus

<400> 61

atggagctta tgaacgaaga tttaaaaatg tacttttacg agaacagatt agcttcttat 60
 tcaggggtggc cgtttgatga ggactgcgcc tgcacgctcg ataatatggc caaagctggg 120
 ttcattccaca aaccactga aaacagtccg gatgtggccc agtgcttctt ctgctttaa 180
 gagctggagg gttgggagcc tgaggatgat cctctcaagg aacacaagtc tcactctcca 240
 acttgcaatt tcattctgct gaaaaagcca gtggaggagc tcacagtgga ggagattctg 300
 aagctgcaga aagagaggca aaagttccac attaaaatgg cctgcagaca agtaattgag 360
 aagtttgagg aagcagcaaa atcgagaaga ggtgacatta tcaaactagc catggaaggc 420
 tga 423

<210> 62

<211> 429

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia que codifica la survivina de pollo(N97E, T99M, V100L, Q101G)

<400> 62

ES 2 386 411 T3

```

atggcggcct atgctgaaat gctgccaag gaatggctgg tctacctcgt ctccacccgc      60
gccgccacct tccgcaactg gcccttcacc gagggtgctg cctgcacgcc cgagcggatg      120
gcggcggcgg gcttcgtgca ctgccccagc gagaacagcc ccgacgtggt gcagtgcttc      180
ttctgcctca aggagctgga gggctgggag cccgacgacg acccgctgga ggaacacaaa      240
aagcactccg cgggctgctc ttttgccgct cttcagaaag atccctctga actgatgttg      300
ggggagtctt tgaagctgga taaaaagcgg accaaaaacg taattaaaaa agcaatttct      360
cagaaggaaa ctgatatcga agatgtagcc aagggcgtgc ggcacgcgat agagaacatg      420
ggcccttag                                         429
    
```

<210> 63

<211> 72

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 63

```

Asp His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys
1           5           10           15
    
```

```

Ala Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro
                20           25           30
    
```

```

Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu
          35           40           45
    
```

```

Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys
          50           55           60
    
```

```

His Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu
65           70
    
```

<210> 64

<211> 142

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesoión GenBank NM_001168.2

ES 2 386 411 T3

<400> 64

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
1 5 10 15
His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
20 25 30
Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
35 40 45
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
50 55 60
Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
65 70 75 80
Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
85 90
Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
100 105 110
Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
115 120 125
Glu Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
130 135 140

<210> 65

<211> 142

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesoión GenBank 015392

10 <400> 65

ES 2 386 411 T3

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
1 5 10 15
His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
20 25 30
Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
35 40 45
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
50 55 60
Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
65 70 75 80
Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
85 90 95
Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
100 105 110
Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
115 120 125
Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
130 135 140

<210> 66

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Canis familiaris

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesoión GenBank NP_001003019.1

<400> 66

ES 2 386 411 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 67

<211> 142

5 <212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesoión GenBank NP_999306.1

10 <400> 67

ES 2 386 411 T3

Met Ser Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp
1 5 10 15
His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
20 25 30
Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Ala Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
35 40 45
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
50 55 60
Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
65 70 75 80
Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
85 90 95
Thr Leu Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Glu Arg Ala Lys Asn Lys
100 105 110
Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
115 120 125
Lys Lys Val Arg Cys Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Ser Glu
130 135 140

<210> 68

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Bos taurus

<220>

<221> mist feature

<223> Número de accesoión GenBank NP_001001855.2

<400> 68

ES 2 386 411 T3

Met Gly Ala Gln Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp
1 5 10 15
His Arg Val Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
20 25 30
Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Ala Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
35 40 45
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
50 55 60
Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
65 70 75 80
Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
85 90 95
Thr Leu Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Glu Arg Thr Lys Asn Lys
100 105 110
Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
115 120 125
Lys Lys Val Arg Cys Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Leu Glu
130 135 140

<210> 69

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Felis catus

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesión GenBank NP_001009280.1

<400> 69

ES 2 386 411 T3

Met Gly Ala Ser Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp
1 5 10 15
His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
20 25 30
Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
35 40 45
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
50 55 60
Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
65 70 75 80
Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
85 90 95
Thr Leu Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Glu Arg Ala Lys Asn Lys
100 105 110
Ile Ala Lys Glu Thr Asn His Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
115 120 125
Lys Arg Val Arg Cys Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Leu Glu
130 135 140

<210> 70

<211> 140

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesoión GenBank NP_033819.1

<400> 70

ES 2 386 411 T3

Met Gly Ala Pro Ala Leu Pro Gln Ile Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 Tyr Arg Ile Ala Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Asp Cys Ala
 20 25 30
 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
 35 40 45
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 50 55 60
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asn Pro Ile Glu Glu His Arg Lys His
 65 70 75 80
 Ser Pro Gly Cys Ala Phe Leu Thr Val Lys Lys Gln Met Glu Glu Leu
 85 90 95
 Thr Val Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Gln Arg Ala Lys Asn Lys
 100 105 110
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
 115 120 125
 Lys Thr Thr Arg Gln Ser Ile Glu Gln Leu Ala Ala
 130 135 140

<210> 71

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesoión GenBank AAF82586.1

<400> 71

ES 2 386 411 T3

Met Gly Ala Thr Ala Leu Pro Pro Ile Trp Gln Met Tyr Leu Lys Asp
1 5 10 15
His Arg Ile Tyr Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Asp Cys Ser
20 25 30
Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
35 40 45
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
50 55 60
Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asn Pro Ile Glu Glu His Arg Lys His
65 70 75 80
Ser Pro Gly Cys Ala Phe Leu Thr Val Lys Lys Gln Val Glu Glu Leu
85 90 95
Thr Val Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Gln Arg Ala Lys Asn Lys
100 105 110
Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Arg
115 120 125
Arg Thr Val Arg Gln Ser Ile Glu Gln Leu Ala Ala Leu Arg
130 135 140

<210> 72

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Pongo pygmaeus

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesión GenBank CAH91231.1

<400> 72

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

10

ES 2 386 411 T3

His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
20 25 30
Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
35 40 45
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
50 55 60
Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
65 70 75 80
Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
85 90 95
Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
100 105 110
Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
115 120 125
Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
130 135 140

<210> 73

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Gallus gallus

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesión GenBank NP_001012318.1

<400> 73

ES 2 386 411 T3

Met Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu
1 5 10 15

Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly
20 25 30

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

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

Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Leu Glu Glu His Lys
65 70 75 80

Lys His Ser Ala Gly Cys Ala Phe Ala Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser
85 90 95

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

Asn Val Ile Lys Lys Ala Ile Ser Gln Lys Glu Thr Asp Ile Glu Asp
115 120 125

Val Ala Lys Gly Val Arg His Ala Ile Glu Asn Met Gly Pro
130 135 140

<210> 74

<211> 157

<212> PRT

5 <213> Xenopus laevis

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesión GenBank Aha020085.1

<400> 74

ES 2 386 411 T3

Met Leu Ser Ile Ser Pro Ile Val Ser Leu Arg Arg Cys Asp Asn Glu
 1 5 10 15
 Pro Ser Met Pro Asp Glu Trp Arg Leu Tyr Asn Leu Ala Thr Arg Leu
 20 25 30
 Arg Thr Phe Ser Asn Trp Pro Phe Thr Glu Asp Cys Ala Cys Thr Pro
 35 40 45
 Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Val His Cys Pro Thr Asp Asn Ser
 50 55 60
 Pro Asp Val Val Lys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Asp Pro Met Asp Glu His Lys Lys His Ser Pro Ser
 85 90 95
 Cys Leu Phe Ile Ala Leu Lys Lys Lys Ala Glu Glu Leu Thr Leu Ser
 100 105 110
 Glu Phe Leu Lys Leu Asp Leu Glu His Thr Lys Ile Lys Met Gln Lys
 115 120 125
 Gln Met Asn Leu His Ile Glu Arg Phe Gln Ala Lys Ala Asn Glu Val
 130 135 140
 Arg Gly His Leu Glu Lys Leu Asp Ala Asp Glu Thr Gln
 145 150 155

<210> 75

<211> 160

<212> PRT

5 <213> *Xenopus laevis*

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesoión GenBank AAM76714.1

<400> 75

Met Tyr Ser Ala Lys Asn Arg Phe Val Gln Ala Val Gln Arg Leu Gln
 1 5 10 15

Asp Phe Lys Asn Met Tyr Asp Tyr Asp Ala Arg Leu Ala Thr Phe Ala
 20 25 30

Asp Trp Pro Phe Thr Glu Asn Cys Lys Cys Thr Pro Glu Ser Met Ala
 35 40 45

Lys Ala Gly Phe Val His Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Val Ala
 50 55 60

Cys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp
 65 70 75 80

Asp Pro Trp Thr Glu His Ser Lys Arg Ser Ala Asn Cys Gly Phe Leu
 85 90 95

Ser Leu Thr Lys Cys Val Asn Asp Leu Thr Met Glu Gly Phe Leu Arg
 100 105 110

Leu Glu Gly Asp Arg Ile Lys Ser Phe Tyr Arg Lys Phe Ser Thr Val
 115 120 125

Val Leu Gln Tyr Val Glu Glu Glu Met Thr Ala Ala Thr Lys Arg Leu
 130 135 140

Leu Glu Tyr Phe Ser Asn Gln His Gln Cys Ser Ile Asp Leu Asp His
 145 150 155 160

<210> 76

<211> 156

<212> PRT

5 <213> *Xenopus laevis*

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesoión GenBank AAH89271.1

<400> 76

Met Ser Ser Cys Ser Ile Val Ser Leu Leu Pro Gly Asp Lys Glu Pro
 1 5 10 15
 Ser Met Pro Asp Glu Trp Arg Leu Tyr Lys Leu Ala Thr Arg Leu Arg
 20 25 30
 Thr Phe Ser Asn Trp Pro Phe Thr Glu Asp Cys Ala Cys Thr Pro Glu
 35 40 45
 Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Val His Cys Pro Ser Asp Asn Ser Pro
 50 55 60
 Asp Val Val Lys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Asp Pro Met Asp Glu His Lys Lys His Ser Pro Ser Cys
 85 90 95
 Leu Phe Ile Ala Leu Lys Lys Lys Ala Glu Glu Leu Thr Leu Ser Glu
 100 105 110
 Phe Leu Lys Leu Asp Leu Glu Arg Thr Lys Ile Lys Met Gln Lys Gln
 115 120 125
 Met Asn Leu Arg Ile Glu Cys Phe Gln Ala Lys Ala Asn Glu Val Arg
 130 135 140
 Gly His Leu Glu Gln Leu Asp Ala Asp Glu Thr Gln
 145 150 155

<210> 77

<211> 942

5 <212> ADN

<213> Ictalurus punctatus

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesión GenBank CK419466.1

10 <220>

<221> mise feature

<222> (832)..(834)

<223> n es a, c, g, ó t

<400> 77

ES 2 386 411 T3

```

ccacgcgtcc ggaacttctg aactaattag cgcctttttt gtgctttttt caaaaacatg      60
gagcttatga acgaagattt aaaaatgtac ttttacgaga acagattagc ttcttattca      120
gggtggccgt ttgatgagga ctgCGCCTGC acgtcggata atatggccaa agctggtttc      180
atccacaaac ccaactgaaa cagtccggat gtggccagc gcttcttctg ctttaaagag      240
ctggaggggt gggagcctga ggatgatcct ctcaaggaac acaagtctca ctctccaact      300
tgcaatttca ttctgctgaa aaagccagtg gaggagctca cagtggagga gattctgaag      360
ctgcagaaag agaggcaaaa gttccacatt aaaatggcct gcagacaagt aattgagaag      420
tttgaggaag cagcaaaatc gagaagaggt gacattatca aactagccat ggaaggctga      480
atggagattt ctgtcttttc ctcctatgat tgctcttttg ttatcgggtca tggacatggt      540

cccaagctgc actaccatgc ttgtgtttac taaaaaaaga atttattaag agattgacat      600
tattcttcac aacctcttta atggagtttt atatcaactc cccatgatta cagaggtgga      660
ttcatacagc ctggctaagt tccttctctg tattcatgat gttgcatgta taaaacagct      720
agatactgta attggaactg aacagtcctt taagttaaag tttttgtcca tgttttccta      780
gtctgtaatg acatgaaagc tattatgact tggcatatcc tccttattta tnnnatatat      840
tattattata attattattt taatttttat tttttttttt ttttacaag tgtcttcaaa      900
agttcacatt gtctatagag cactcagaca tttgacaatt tt                               942

```

<210> 78

<211> 142

5 <212> PRT

<213> Danio rerio

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesión GenBank NP_919378.1

10 <400> 78

ES 2 386 411 T3

Met Asp Leu Ala Ser Asp Asp Gln Thr Lys Met Tyr Phe Tyr Glu Asn
1 5 10 15
Arg Leu Gln Thr Phe Val Gly Trp Pro Phe Glu Glu Gly Cys Val Cys
20 25 30
Thr Pro Glu Asn Met Ala Lys Ala Gly Phe Ile His Thr Pro Ser Glu
35 40 45
Asn Ser Pro Asp Ile Ala Gln Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu
50 55 60
Gly Trp Glu Pro Glu Asp Asp Pro Glu Lys Glu His Lys Ala His Ser
65 70 75 80
Pro Ser Cys Asp Phe Ile Leu Leu Lys Lys Thr Val Asp Ser Leu Thr
85 90 95
Val Glu Glu Phe Leu Lys Leu Gln Lys Glu Arg Gln Lys Phe Ile Ile
100 105 110
Lys Lys Ser Cys Gly His Ala Ile Asp Lys Phe Glu Asp Ala Val Lys
115 120 125
Leu Lys Arg Asn Gln Ile Ile Gln Thr Ala Met Gly Glu Glu
130 135 140

<210> 79

<211> 128

<212> PRT

5 <213> Danio rerio

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesoión GenBank NP_660196.1

<400> 79

ES 2 386 411 T3

Met Tyr Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Gln Thr Phe Ser Glu Trp Pro Phe
1 5 10 15
Arg Glu Asp Cys Gln Cys Thr Pro Glu Leu Met Ala Lys Ala Gly Phe
20 25 30
Val His Cys Pro Ser Glu Asn Glu Pro Asp Val Ala Cys Cys Phe Tyr
35 40 45
Cys Leu Arg Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asn Pro Trp Ser
50 55 60
Glu His Ala Lys Arg Ser Pro Asn Cys Ala Phe Leu His Met Ser Lys
65 70 75 80
Thr Phe Asp Glu Leu Thr Ala Ile Glu Tyr Phe His Leu Glu Gln Glu
85 90 95
Arg Leu Arg Ile Tyr Ile Lys Lys Met Gly His Arg Lys Ile Ala Tyr
100 105 110
Phe Arg Asp Glu Val Glu Ala Thr Ser Lys Asn Leu Arg Ala Leu Ile
115 120 125

<210> 80

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Tetraodon nigroviridis

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesoión GenBank CAG04432.1

<400> 80

ES 2 386 411 T3

Met Asn Pro Tyr Asn Asp Gln His Leu Lys Met Tyr Phe Tyr Glu Asn
1 5 10 15
Arg Leu Lys Thr Phe Glu Gly Trp Pro Phe Glu Glu Asp Cys Leu Cys
20 25 30
Thr Pro Glu Asn Met Ala Lys Ala Gly Phe Val His Thr Pro Ser Glu
35 40 45
Asn Ser Pro Asp Thr Ala Met Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu
50 55 60
Gly Trp Glu Pro Asp Asp Glu Pro Lys Lys Glu His Lys Ser His Ser
65 70 75 80
Pro Ser Cys His Phe Ile Ala Leu Lys Lys Lys Val Glu Glu Leu Ser
85 90 95
Val Glu Glu Phe Val Lys Leu Gln Met Glu Arg Gln Lys Phe
100 105 110

<210> 81

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Tetraodon nigroviridis

<220>

<221> misc_feature

<223> Número de accesoión GenBank CAG07433.1

<400> 81

Met Ala Ser Ile Asp Val Leu Lys Glu Arg Phe Ser Ser Tyr Asp Arg
 1 5 10 15

Met Tyr Arg Gln Glu Leu Arg Glu Arg Thr Phe Val Asp Trp Pro Phe
 20 25 30

Arg Glu Asp Cys Asn Cys Thr Pro Glu Lys Met Ala Lys Ala Gly Phe
 35 40 45

Val His Cys Pro Ser Glu Asn Glu Pro Asp Val Ala Cys Cys Phe Phe
 50 55 60

Cys Leu Ile Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Trp Ser
 65 70 75 80

Glu His Val Lys Arg Tyr Pro Asn Cys Gly Phe Leu Thr Met Lys Lys
 85 90 95

Asp Phe Thr Glu Leu Thr Val Gly Glu Tyr Phe Leu Met Glu Gln Glu
 100 105 110

Arg Leu Lys Val
 115

<210> 82

<211> 153

<212> PRT

5 <213> Drosophila melanogaster

<220>

<221> misc_feature

<223> número de accesoión GenBank AAF55399.1

<400> 82

10 Met Glu Ser Pro Val Val Asn Glu Val Ala Ala Ser Leu Gly Gly Glu

ES 2 386 411 T3

Met Ala Pro Gly Thr Lys Lys Lys Ser Asp Met Ala Lys Phe Thr Phe
 1 5 10 15

Tyr Lys Asp Arg Leu Met Thr Phe Lys Asn Phe Glu Tyr Asp Arg Asp
 20 25 30

Pro Asp Ala Lys Cys Thr Ser Gln Ala Val Ala Gln Ala Gly Phe Tyr
 35 40 45

Cys Thr Gly Pro Gln Ser Gly Lys Cys Ala Phe Cys Asn Lys Glu Leu
 50 55 60

Asp Phe Asp Pro Glu Asp Asp Pro Trp Tyr Glu His Thr Lys Arg Asp

65 70 75 80

Glu Pro Cys Glu Phe Val Arg Ile Gly Lys Leu Asp Asp Ser Glu Leu
 85 90 95

Thr Ile Asn Asp Thr Val Arg Leu Ser Gln Thr Ala Met Ile Met Thr
 100 105 110

Lys Leu Phe Glu His Glu Met Met Ile Asn Asn Leu Ser Asn His Ser
 115 120 125

Ser Ser Asp Ala Leu Phe Asp Gln Leu Lys Lys Val Pro Asn Thr Ala
 130 135 140

Ser Thr Thr Lys Ser Asn Ser Arg Arg Gly Lys
 145 150 155

<210> 84

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Survivina-Humana(R18E, H77A, c84A, A128P)

<400> 84

ES 2 386 411 T3

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
 1 5 10 15
 His Glu Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
 20 25 30
 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
 35 40 45
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 50 55 60
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu Ala Lys Lys His
 65 70 75 80
 Ser Ser Gly Ala Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
 85 90 95
 Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
 100 105 110
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Pro
 115 120 125
 Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
 130 135 140

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que provoca una respuesta inmune a la survivina humana en un humano, que comprende un péptido derivado de survivina humana modificada o un ácido nucleico que codifica dicho péptido, en donde la survivina humana modificada comprende una mutación dentro del dominio BIR que anula sustancialmente la actividad biológica asignada al dominio BIR, **caracterizada porque** dicho péptido comprende un dominio helicoidal modificado y contiene las siguientes mutaciones de la survivina humana: R18E, P47L, Q56L, H77A, C84A, A128P y 1135P, formando por tanto la secuencia de aminoácidos según se especifica en SEQ ID NO 56.
2. Una vacuna de la reivindicación, en donde el péptido se fusiona con una fracción Fc.
3. Una vacuna de la reivindicación 1 ó 2, en donde la vacuna además codifica o incluye un péptido derivado de una molécula efectora.
4. Una vacuna de la reivindicación 3, en donde la molécula efectora es una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23 y GM-CSF.
5. Una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el ácido nucleico que codifica al péptido comprende un promotor mamífero.
6. Una vacuna de la reivindicación 5, en donde el ácido nucleico es un ADN desnudo.
7. Una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el ácido nucleico se formula con un reactivo que mejora la transfección de las células mamíferas.
8. Una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 7, en donde el ácido nucleico es parte de una partícula vírica.
9. Una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 8, en donde la vacuna comprende una bacteria que comprende el ácido nucleico.
10. Una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 -9, que adicionalmente comprende un adyuvante.
11. Una composición farmacéutica que comprende una vacuna según se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 – 10 de manera opcional, junto con un soporte, diluyente o excipiente aceptable.
12. Una vacuna o una composición farmacéutica según se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 -11 para su uso para inmunizar a un paciente contra células tumorales que sobreexpresan survivina humana.

Figura 2:

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| 98.6 | 98.6 | 98.6 | 98.6 | 100 | 90.3 | 91.7 | 100 | 77.8 | 69.4 | 68.1 | 70.8 | 65.3 | 68.1 | 65.3 | 63.9 | 65.3 | |
| | 97.2 | 97.2 | 97.2 | 98.6 | 88.9 | 90.3 | 98.6 | 76.4 | 68.1 | 66.7 | 69.4 | 66.7 | 66.7 | 63.9 | 62.5 | 63.9 | |
| | | | 97.2 | 98.6 | 88.9 | 90.3 | 98.6 | 76.4 | 68.1 | 66.7 | 70.8 | 65.3 | 68.1 | 65.3 | 63.9 | 65.3 | |
| | | | | 98.6 | 88.9 | 90.3 | 98.6 | 76.4 | 68.1 | 66.7 | 69.4 | 63.9 | 66.7 | 65.3 | 62.5 | 63.9 | |
| | | | | | 90.3 | 91.7 | 100 | 77.8 | 69.4 | 68.1 | 70.8 | 65.3 | 68.1 | 65.3 | 63.9 | 65.3 | |
| | | | | | | 94.4 | 90.3 | 75.0 | 69.4 | 68.1 | 69.4 | 66.7 | 65.4 | 69.4 | 65.3 | 66.7 | |
| | | | | | | | 91.7 | 72.2 | 68.1 | 66.7 | 69.4 | 63.9 | 65.3 | 69.4 | 65.3 | 66.7 | |
| | | | | | | | | 77.8 | 69.4 | 68.1 | 70.8 | 65.3 | 68.1 | 65.3 | 63.9 | 65.3 | |
| | | | | | | | | | 76.4 | 77.8 | 72.2 | 65.3 | 69.4 | 66.7 | 68.1 | 66.7 | |
| | | | | | | | | | | 98.6 | 68.1 | 68.1 | 69.4 | 65.3 | 69.4 | 65.3 | |
| | | | | | | | | | | | 66.7 | 66.7 | 70.8 | 66.7 | 70.8 | 66.7 | |
| | | | | | | | | | | | | 62.5 | 65.3 | 76.4 | 66.7 | 79.2 | |
| | | | | | | | | | | | | | 76.4 | 61.1 | 73.6 | 59.7 | |
| | | | | | | | | | | | | | | 66.7 | 83.3 | 66.7 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | 69.4 | 81.9 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | 68.1 | 16 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | 17 |

Figura 3:

```

      20      30      40      50      60
  -+-----+-----+-----+-----+-----+
16 DHRISTFKNWPFLG--CACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFKKELEGWE humano
29 Q..VESY.S...P.T--AS.SISK.....YWTG.KR.N.T.T..V.G.T.D... BIR mosca
19 -D.LM....FEYDRDPDAK..SQAV.Q...YCTGPQS---GK.A..N...D-FD BIR gusano

      70      80
  -+-----+-----+
69 PDDDPiEEHKKHSSGCAFL humano SEQ ID NO: 63
82 .E...WK..V..APQ.E.A BIR mosca SEQ ID NO: 53
68 .E...WY..T.RDEP.E.V BIR gusano SEQ ID NO: 54

```

Figura 4

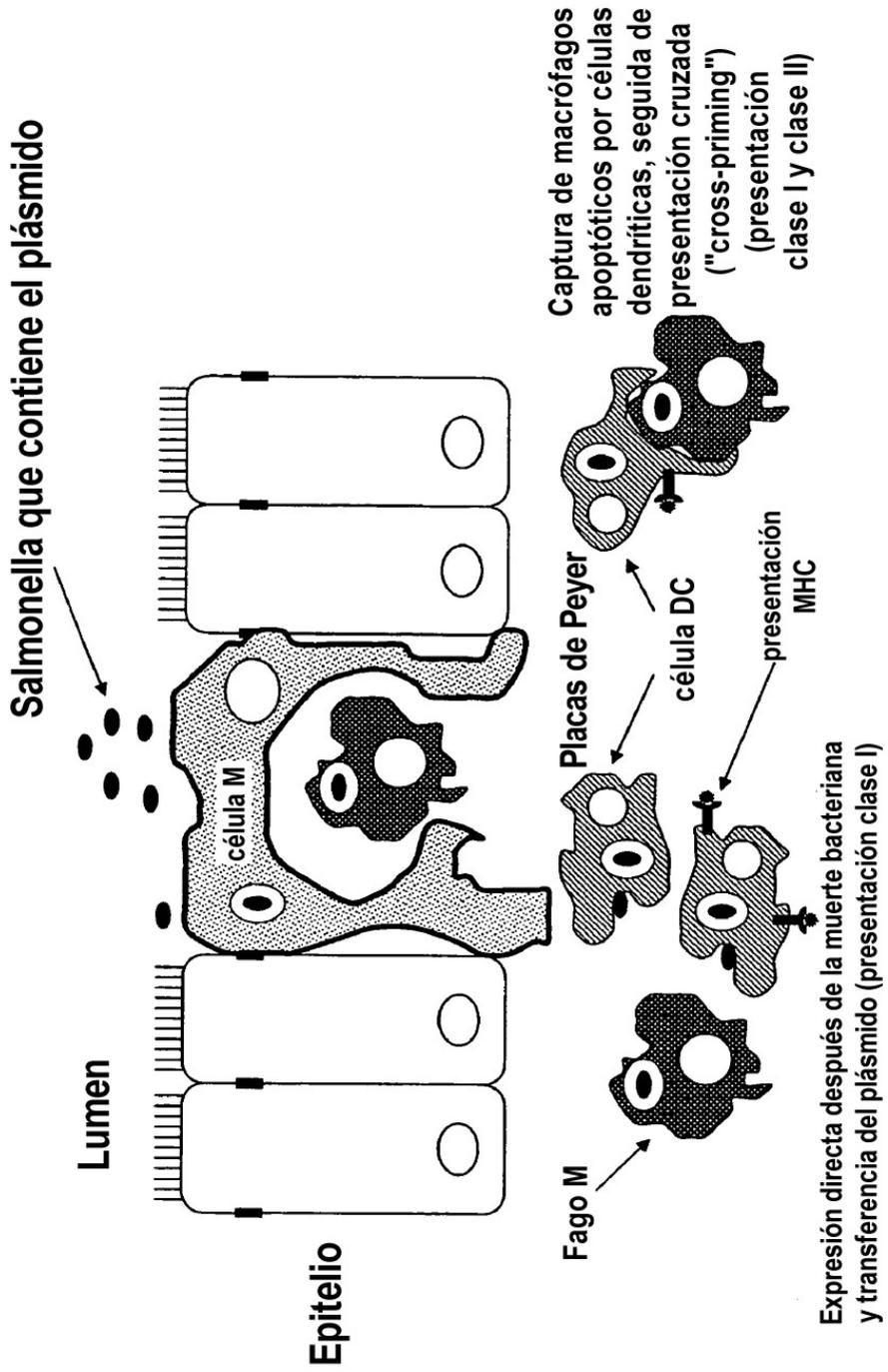


Figura 5:

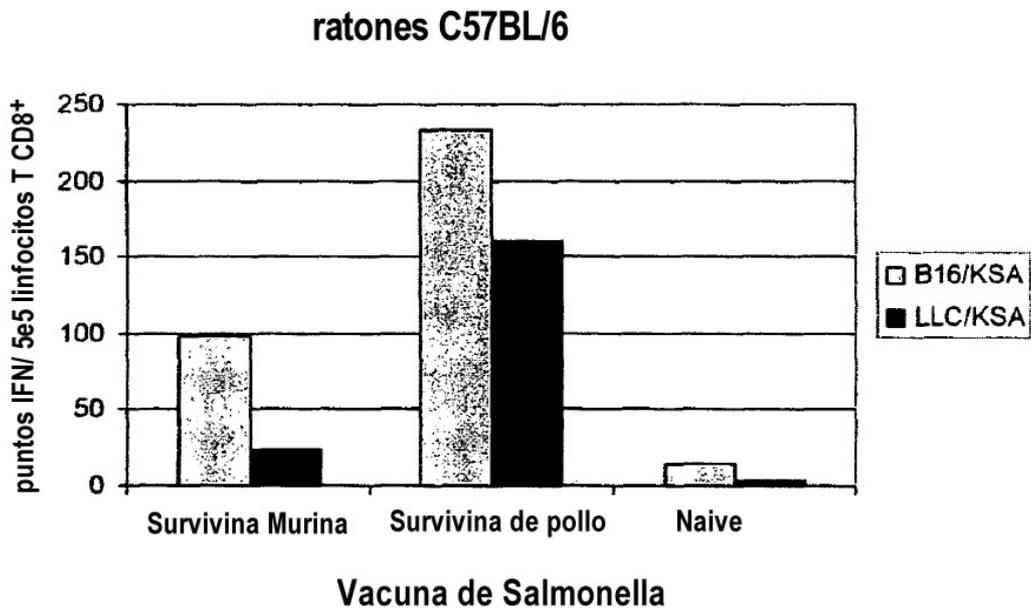


Figura 6:

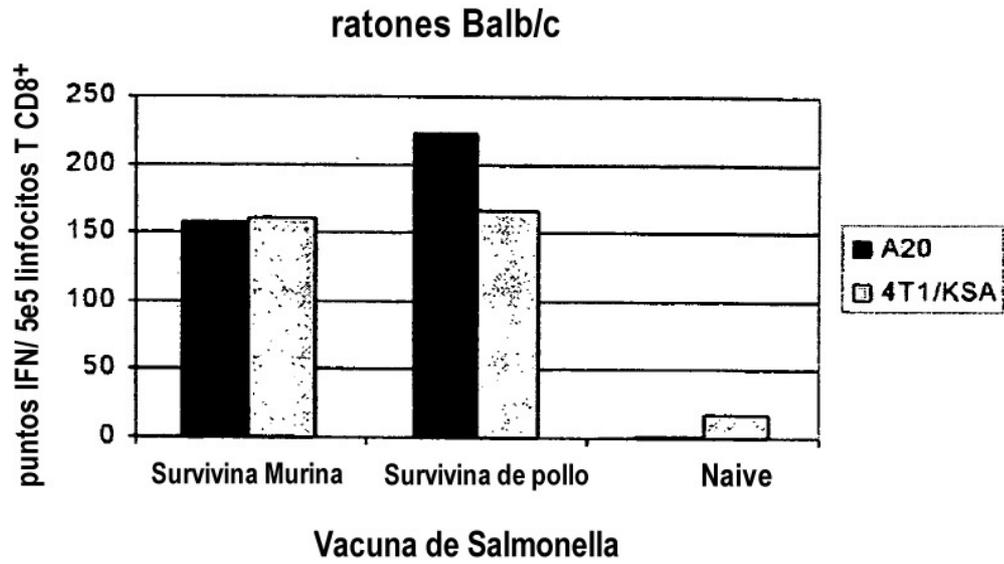


Figura 7:

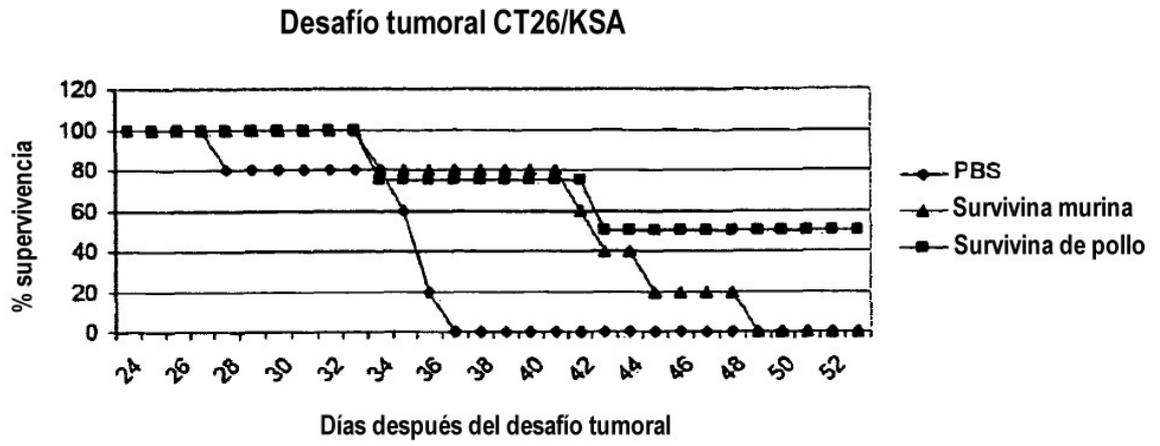


Figura 8:

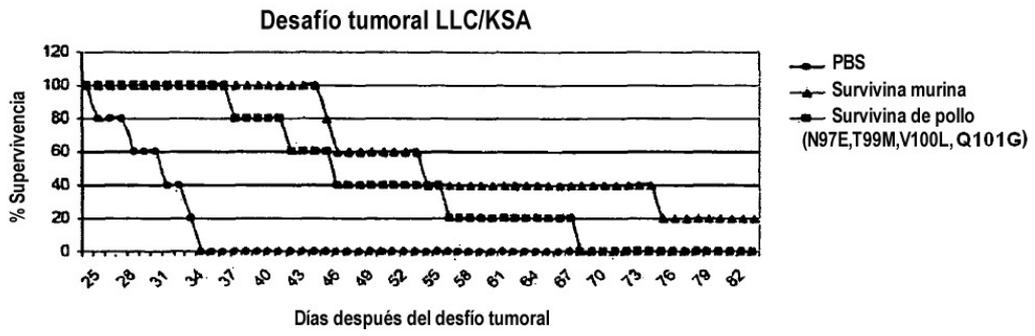


Figura 9:

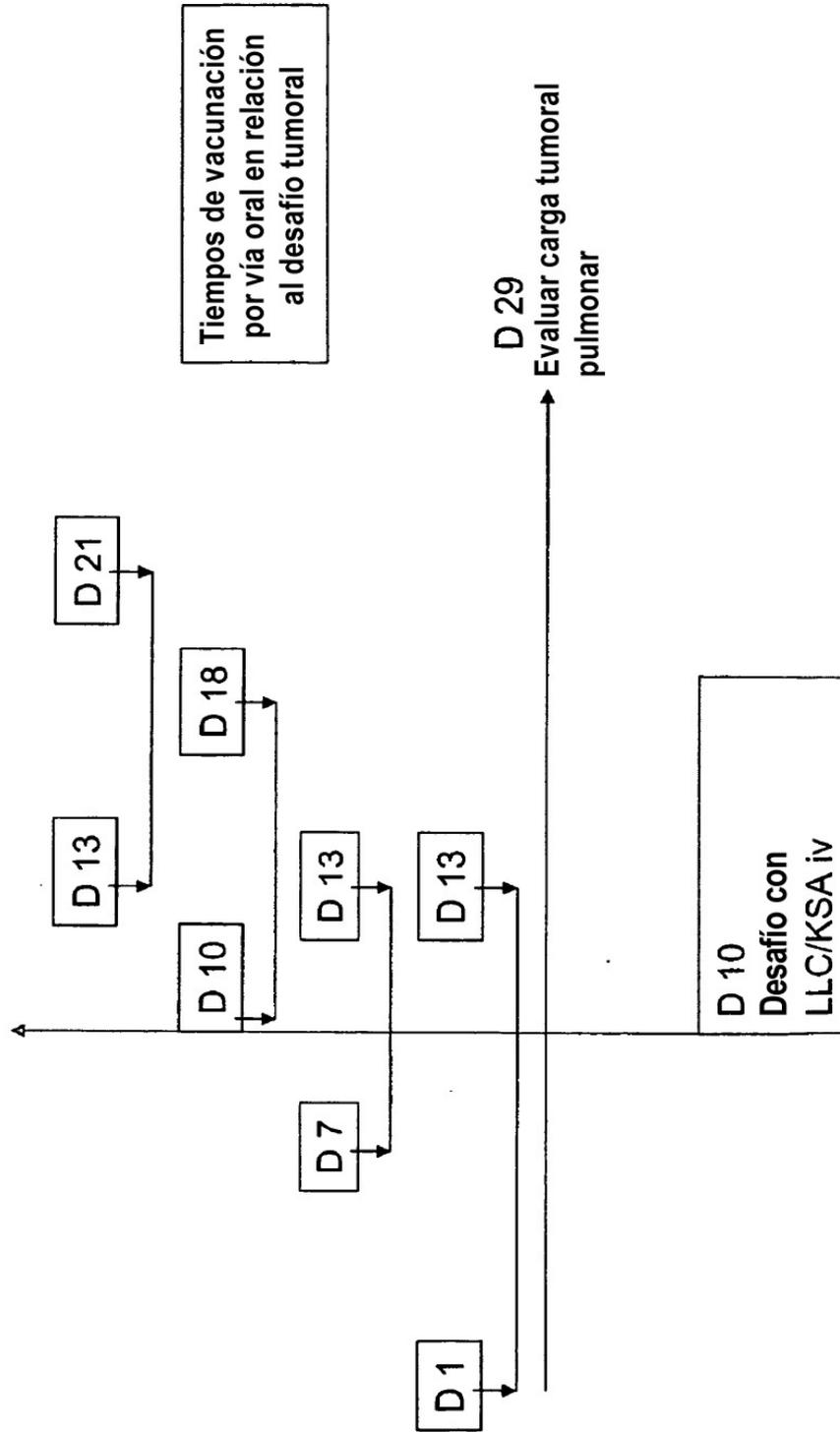
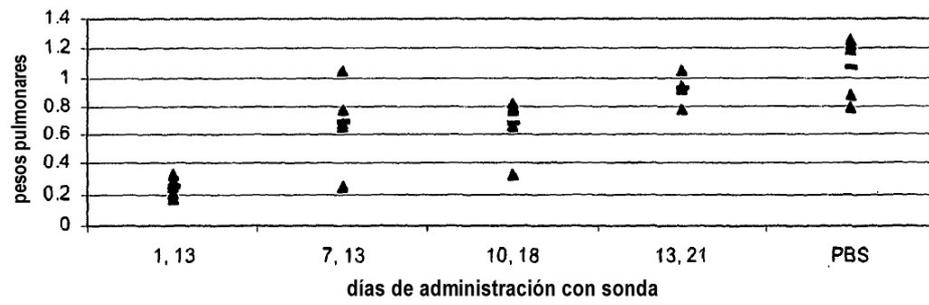


Figura 10

Desafío LLC/KSA iv en el día 10



| días administración con sonda | puntuación de metástasis pulmonar |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| 1, 13 | 0, 0, 1, 1, 1 |
| 7, 13 | 1, 2, 2, 2, 3 |
| 10, 18 | 2, 2, 3, 3, 3 |
| 13, 21 | 3, 3, 3, 3, 3 |
| PBS | 2, 2, 3, 3, 3 |

| Puntuación | Descripción |
|------------|--|
| 3 | Más de 50% de pulmón cubierto con tumor |
| 2 | Entre 5 y 50% de pulmón cubierto con tumor |
| 1 | Menos de 5% de superficie cubierta con tumor |
| 0 | Ninguna colonia tumoral visible |

Figura 11

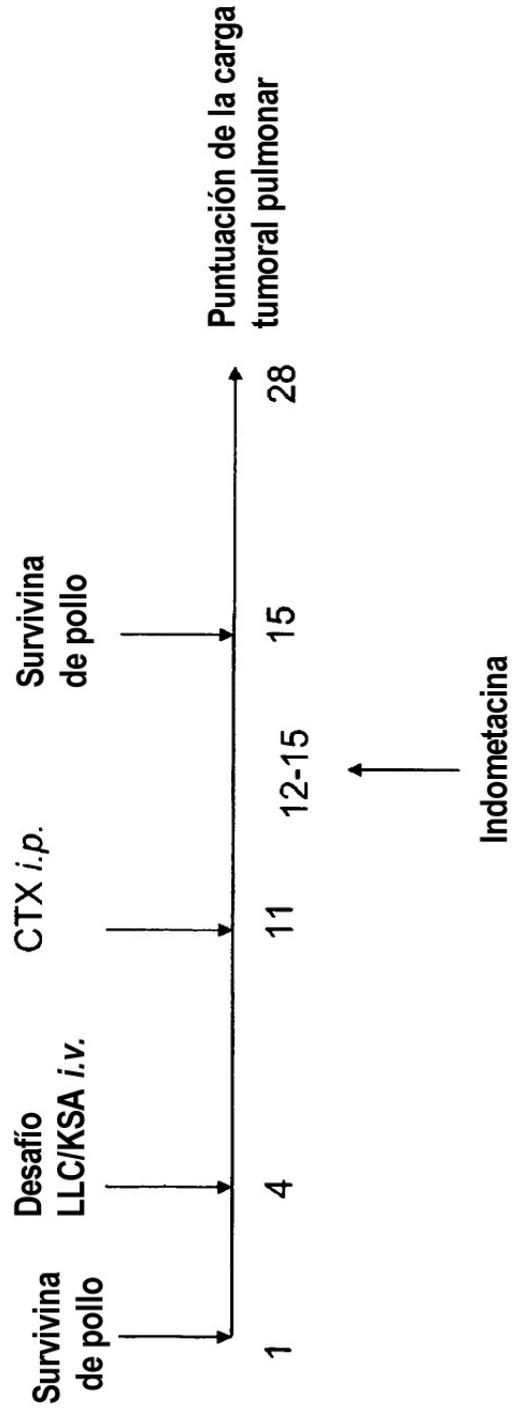
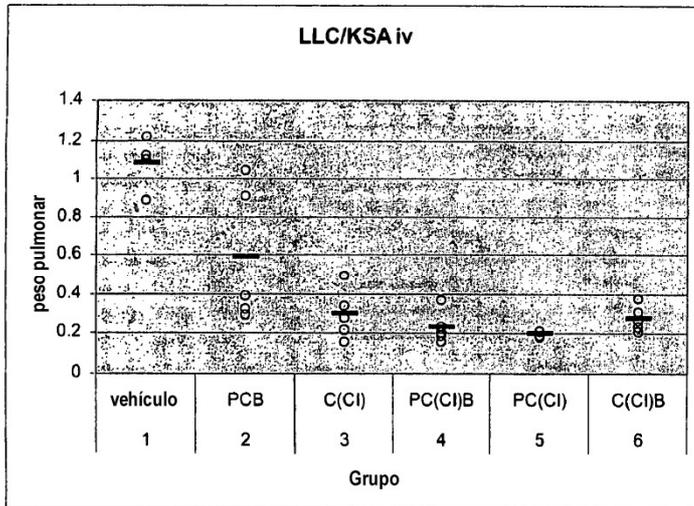


Figura 12



| Protocolo | Puntuación de metástasis pulmonar |
|--|-----------------------------------|
| Control de vehículo | 3, 3, 3, 3, 3 |
| Cebado-desafío-estimulación | 1, 2, 2, 3, 3 |
| CTX + Indo | 1, 1, 2, 3, 3 |
| Cebado-desafío-CTX + Indo-estimulación | 0, 1, 1, 1, 1 |
| Cebado-desafío-CTX + Indo | 1, 1, 1, 1, 1 |
| desafío-CTX + Indo-estimulación | 1, 1, 2, 2, 2 |

Figura 13

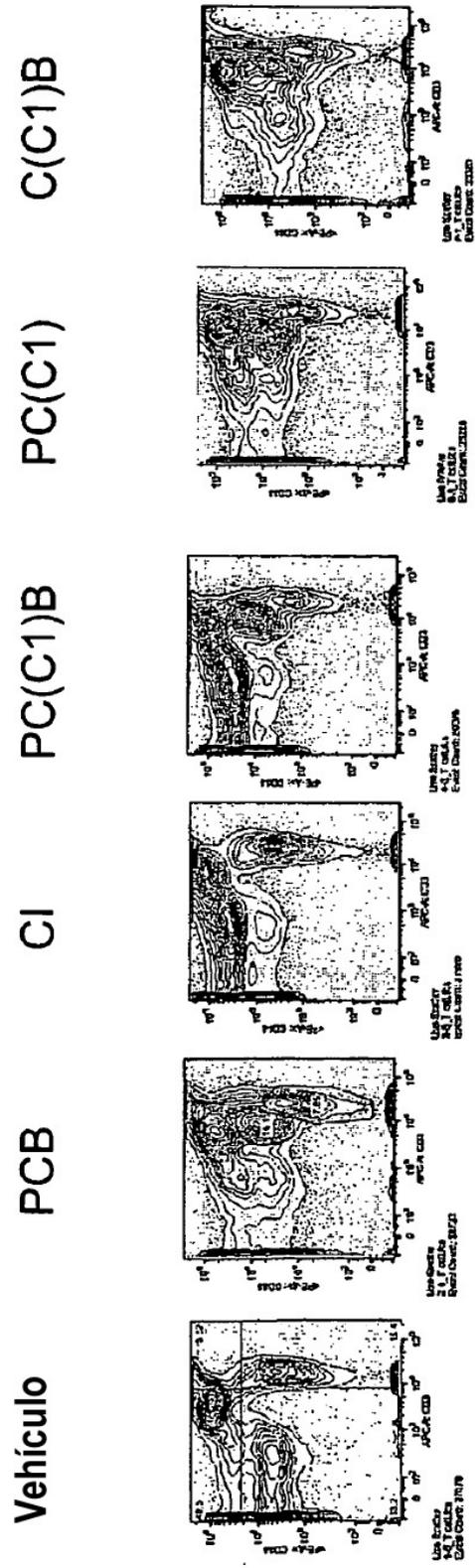


Figura 14

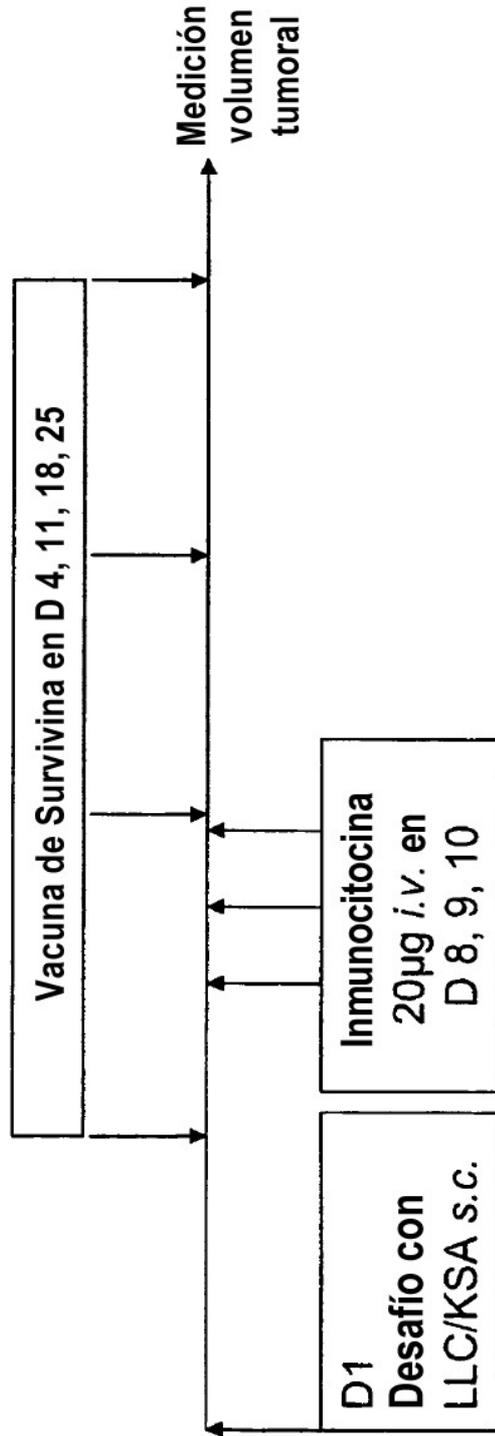


Figura 15

