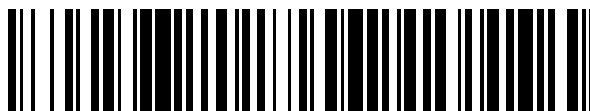


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 510 493**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)	
A61K 38/16	(2006.01)	
C07K 7/08	(2006.01)	
C07K 14/705	(2006.01)	
C07K 19/00	(2006.01)	
C12N 15/12	(2006.01)	
C12N 15/63	(2006.01)	
G01N 33/574	(2006.01)	
G01N 33/68	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2006** **E 06808209 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014** **EP 1931377**

54 Título: **Epítomos T CD4+ de la Survivina y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

30.09.2005 FR 0510013

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

21.10.2014

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
25, rue Leblanc, Immeuble "Le Ponant D"
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**WANG, XIAOFEI;
MUNIER, GAÉTAN;
MORATILLE, SANDRA;
NUYTTENS, HÉLÈNE y
MAILLÈRE, BERNARD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 510 493 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

Epítomos T CD4+ de la Survivina y sus aplicaciones

La presente invención se refiere a péptidos que representan epítomos T CD4+ de la survivina aptos para ser presentados por moléculas HLA II preponderantes, principalmente entre la población caucásica, y a sus aplicaciones vacunales y diagnósticas.

Los antígenos tumorales agrupan un conjunto de proteínas expresadas por las células tumorales y que las células sanas expresan poco o nada, o que no se encuentran más que en algunos tipos celulares. Estos antígenos se clasifican en cinco categorías en función de su perfil de expresión: (1) antígenos específicos del paciente, que resultan de mutaciones puntuales ligadas a la tumorigénesis (MUM-1, CDK4, beta-catenina, HLA-A2, BCR-ABL, CASP-8), (2) antígenos de tumores o antígenos CT (*cancer testis*), que se expresan en muchos tumores y algunos tejidos sanos desprovistos de moléculas HLA convencionales (testículos, placenta, ovarios; antígenos MAGE, BAGE, GAGE, RAGE, NY-ESO1), (3) antígenos de diferenciación que se expresan sea en el curso de la embriogénesis, o sea en tipos celulares muy particulares (tirosinasas, gp-100, Melan-A/mart-1, tiroglobulina, alfa-fetoproteína, CEA), (4) antígenos sobre-expresados por los tumores (survivina, gp75, PSA, HER2/neu, p53, telomerasa) y (5) antígenos víricos (EBV, HPV).

Todas estas proteínas pueden reconocerlas los Linfocitos T CD4+ y CD8+ y sirven para inducir una inmunidad celular representando dianas para la vacunación anti-tumoral (Solicitud Internacional PCT WO 2004/055183).

Las dianas que se han estudiado particularmente bien son principalmente los antígenos específicos de tumores (MAGE, NY-ESO-1). Sin embargo, estas dianas pueden ser ineficaces para la vacunación anti-tumoral, debido a que la mayoría no son esenciales para la supervivencia de las células tumorales que pueden escapar a la vigilancia inmunológica disminuyendo o reprimiendo la expresión de estos antígenos.

La survivina (16,5 kDa), también llamada BIRC5 (Proteína que contiene una PIA repetida Baculovírica 5), PIA4 (Proteína inhibidora de apoptosis 4) o IAP4 (Inhibidora de apoptosis 4) es el miembro más pequeño de la familia de los inhibidores de apoptosis (IAP); contiene un motivo en dedo de zinc de 70 aminoácidos (dominio repetido de la proteína inhibidora de apoptosis de baculovirus BIR), característica de todos los miembros IAP y un extremo C que comprende una hélice alfa superenrollada. El gen que codifica la survivina se localiza en el cromosoma 17 humano (17q25) u 11 murino (11 E2); el empalme alternativo de un pre-ARNm que comprende los exones 1, 2, 2B, 3 y 4, produce tres transcripciones: (1) una transcripción que comprende los exones 1, 2, 3, y 4 que codifica la isoforma alfa de la survivina (142 aminoácidos GenBank AAC51660 o SwissProt 015392), (2) una transcripción que comprende los exones 1, 2, 2B, 3 y 4, que codifica la isoforma beta o survivina-2B (165 aminoácidos) que se produce como resultado de la inserción de la secuencia GPGTVAYACNTSTLGGRGGRITR (23 aminoácidos, SEC ID N° 40), entre las posiciones 74 y 75 de la secuencia de la isoforma alfa y (3) una transcripción que comprende los exones 1, 2, y 4, que codifican la survivina ΔEx3.

La survivina se sobre-expresa en la mayoría de los tumores, principalmente en aquellos que se asocian con los cánceres de mama, hígado, colon, pulmón, ovario, útero, esófago, estómago, páncreas, hígado y próstata, con la enfermedad de Hodgkin, con el síndrome mielodisplásico refractario con anemia, con melanomas, linfomas no Hodgkin, leucemias, neuroblastoma, feocromocitomas, sarcomas de tejidos blandos y tumores cerebrales. La sobre-expresión de esta proteína no redundante entraña una insensibilidad a la apoptosis y favorece la división celular. Por otra parte, esta sobre-expresión de la survivina es esencial para la supervivencia de las células tumorales; la supresión de la expresión de la survivina en las líneas celulares tumorales humanas por métodos antisentido, o mutantes negativos dominantes de la survivina da como resultado la detención de la división celular, y apoptosis (Yang y col., P.N.A.S., 2004, 101, 15100-15105; Altieri y col., Oncogene, 2003, 22, 8581-8589).

Este antígeno tumoral es un buen indicador del pronóstico del cáncer, una tasa elevada de survivina (ARNm) se correlaciona con un pronóstico desfavorable (Takeuchi y col., Int. J. Cancer, 2005; Rodel y col., Cancer Rés., 2005, 65, 4881-4887; Muzio y col., CancerLett., 2005, 225, 27-33; Kim y col., Cancer Lett., 2005, 224, 253-261).

Por el contrario, la survivina es prácticamente indetectable en los tejidos normales diferenciados. Posee una vida muy corta y está presente únicamente durante la mitosis donde participa en la formación del complejo CPP (Proteínas cromosómicas pasajeras) que comprende la Aurora quinasa B, la proteína INCENP (proteína interna del centrómero) y TD60 (Antígeno de disco de la telofase), y está igualmente implicada en la inhibición de la apoptosis reprimiendo la actividad de las caspasas 3, 7, 9 (Schimmer, A.D., Cancer Research, 2004, 64, 7183-7190; Fortugno y col. J. Cell. Science, 2002, 115, 575-585).

El estudio de la respuesta inmunitaria dirigida contra la survivina, en los individuos que padecen un cáncer, indica que este antígeno tumoral puede inducir una respuesta celular que implica a los linfocitos T CD4+ y T CD8+ específicos (Andersen y col., Cancer Research, 2001, 61, 869-872 y 5964-5968; Schmidt y col., Blood, 2003, 102, 571-576; Casati y col., Cancer Research, 2003, 63, 4507-4515; Ichiki y col., Lung Cancer, 2005, 48, 281-289).

Casati y col., Cancer Research, 63, 4507-4515, 2003 desvelan que los pacientes que padecen cáncer colorrectal poseen células T CD4+ específicas de survivina. Se detectan igualmente anticuerpos específicos; la tasa elevada de

anticuerpos anti-survivina detectada en los casos de cáncer de pronóstico desfavorable indica sin embargo que la respuesta humoral no parece que esté implicada en el rechazo de tumores que expresan la survivina (Ichiki y col., ya citado).

En consecuencia, la survivina representa una diana particularmente interesante para la vacunación antitumoral ya que induce una respuesta T CD4+ y T CD8+ específica de tumores, que se expresa en la mayor parte de los tumores y que su expresión es esencial para la supervivencia de los tumores. En efecto, la utilización de un antígeno esencial para la supervivencia de los tumores, como diana para la vacunación anti-tumoral permite evitar los problemas del escape de los tumores al reconocimiento por el sistema inmunitario. Además, la mayor parte de los cánceres se pueden tratar con una sola vacuna, ya que la survivina se expresa en la mayoría de los tumores.

Por lo tanto, se ha propuesto utilizar la survivina (proteína recombinante), un vector de expresión de este antígeno o las células dendríticas transfectadas por tal vector de expresión, como una vacuna anti-tumoral (Solicitud Internacional PCT WO 00/03693; Pisarev y col., Clin. Cancer Res., 2003, 9, 6523-6533; Siegel y col., J. Immunol., 2003, 170, 5391-5397; Schaft y col., J. Immunol., 2005, 174, 3087-3097). Sin embargo, para inducir a la vez una respuesta T CD4+ y una respuesta TCD8+ eficaces contra un antígeno, es preferible utilizar péptidos que representan epítomos T CD4+ y T CD8+ de este antígeno, más que la proteína entera.

Se han identificado epítomos T CD8+ de la survivina limitados a las moléculas HLA-A1, A2, A3, A11, A24, B7, B8, B15, B35 del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, (moléculas HLA I o Antígenos de leucocitos humanos clase I) (péptidos 95-104 y 96-104 limitados a HLA-A2 (Andersen y col., Cancer Res., 2001, 61, 869-872 ; Schmitz y col., Cancer Res., 2000, 60, 4845-4849 ; Schmidt y col., 2003, citado anteriormente; <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/tumorspecific.htm> ; Solicitud Internacional PCT WO 2004/067023); el péptido survivina 2B 80-88 se limitan a HLA-A24 (Hirohashi y col., Clin. Cancer Res., 2002, 8, 1731-1739); Recker y col., Int. J. Cancer 2004, 108, 937-941 y Cancer Biol. Ther., 2004, 3, 173-179; Bachinsky y col., Cancer Immun., 2005, 5, 6). Se han utilizado células dendríticas autólogas cargadas con el péptido 96-104 para vacunar pacientes con melanoma (Andersen y col., Vaccine, 2005, 23, 884-889).

Sin embargo, la inmunización con epítomos T CD8+ solos, inducen linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno tumoral, con una frecuencia muy débil (de aproximadamente 10^{-4} a 10^{-7} células CD8+; Zhang y col., Eur. J. Immunol., 2005, 35, 776-785). De hecho, la inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL) depende de la activación de linfocitos T CD4+ que intervienen en particular en el reclutamiento y mantenimiento de los CTL. Se ha demostrado que los linfocitos T CD4+ tienen un papel esencial en el control de los tumores. Por la intermediación de contactos celulares y la secreción de muchas citoquinas, los linfocitos T CD4 inducen la activación de células presentadoras de antígeno (APC, por Células Presentadoras de Antígeno) que a su vez reclutan linfocitos T CD8+ específicos de tumores. Intervienen igualmente en la maduración de células efectoras que son los linfocitos T citotóxicos. Además, los resultados observados en ratones que no expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, indican igualmente que los linfocitos T CD4+ ejercen un control de los tumores por medio de mecanismos independientes de los CTL probablemente por medio de los macrófagos. Por último, los linfocitos T CD4+ pueden ser citotóxicos por sí mismos.

Los linfocitos T CD4+ reconocen los péptidos de los tumores que presentan las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II; que en el ser humano, se denominan moléculas HLA II por Antígeno leucocitario humano clase II. El reconocimiento puede tener lugar de manera directa (es decir, que el tumor presenta por sí mismo estos péptidos a los linfocitos T) pero es más verosímil que la vía principal de activación se haga por medio de las células dendríticas. En efecto estas células son las principales células de presentación del antígeno aptas para reclutar los linfocitos T intactos *in vivo*. Estos péptidos antigénicos, llamados epítomos T, se producen por la degradación proteolítica de antígenos por las células presentadoras de antígeno. Son de longitudes variables, generalmente de 13 a 25 aminoácidos y poseen una secuencia que les hace capaces de unirse a moléculas HLA II. Es bien conocido que a igual título que el antígeno nativo, un péptido que comprende un epítomo T CD4+ es capaz de estimular las células T CD4+ que son específicas de los mismos o de reclutarlas *in vivo*. Con lo cual son suficientes para inducir una respuesta T CD4+.

Estas observaciones están a favor de la utilización de tales péptidos antigénicos específicos de la survivina, y capaces de estimular una fuerte respuesta T CD4+, para la preparación de una composición vacunal antitumoral para el ser humano, principalmente en asociación con epítomos T CD8+ específicos del mismo antígeno.

Además de tales péptidos que son reconocidos por los linfocitos T CD4+ específicos de un antígeno tumoral también son útiles como reactivos en un ensayo diagnóstico, de evaluación del pronóstico o de seguimiento del tratamiento de un cáncer humano, que se basa en la detección de dichas células T CD4+, sea de manera directa, principalmente por citometría de flujo en presencia de multímeros de complejos de moléculas de clase II/péptido, o sea de manera indirecta principalmente por un ensayo de proliferación linfocitaria, o bien por la medición de anticuerpos o de citoquinas.

Sin embargo, no se ha identificado ningún epítomo T CD4+ de la survivina. De hecho, uno de los mayores problemas que limita la utilización de estos péptidos como antígenos es la identificación de los epítomos T CD4+, debido a que su secuencia varía de un individuo a otro debido al polimorfismo de las moléculas HLA II. Las moléculas HLA II son

heterodímeros constituidos por una cadena alfa (α) y de una cadena beta (β) polimorfas. Existen cuatro tipos de moléculas HLA II por individuo (HLA-DR, 1 HLA-DQ y 1 HLA-DP), denominadas en función del alelo que codifica la cadena beta que es la más polimorfa. La molécula HLA-DR es muy polimorfa. De hecho, mientras que su cadena alfa no cuenta más que con 3 alelos, la cadena beta (β) codificada por el gen DRB1, que es la más expresada, cuenta hasta hoy con 458 alelos. Para las moléculas HLA-DQ y HLA-DP, las dos cadenas (α y β) que las constituyen son polimorfas pero presentan menos alelos. Se han contado 28 alelos DQA1 (cadena α de HLA-DQ), 60 alelos DQB1 (cadena β de HLA-DQ), 22 alelos DPA1 (cadena α de HLA-DP) y 116 alelos DPB1 (cadena β de HLA-DP). Sin embargo, la combinación entre las dos cadenas α y β codificadas por estos alelos da lugar a numerosas moléculas HLA-DQ y HLA-DP.

Por el hecho de este polimorfismo, estas isoformas poseen propiedades de unión diferentes entre ellas, lo que implica que las mismas pueden unirse a diferentes péptidos de un mismo antígeno. Por lo tanto, el modo de unión de los péptidos a las moléculas HLA II es más complejo que el de las moléculas HLA I y no existen programas fiables de predicción de péptidos capaces de unirse a las moléculas HLA II. En efecto, las moléculas HLA poseen una estructura tridimensional muy próxima, pero el sitio de fijación de las moléculas HLA II es un cuello abierto en los dos extremos. Por esta razón, las moléculas HLA II aceptan péptidos restringidos a las moléculas HLA II de tamaño variable, que en general comprenden entre 13 y 25 aminoácidos. Este cuello se caracteriza por cinco bolsillos de especificidad (P1, P4, P6, P7 y P9 que corresponden a las posiciones del péptido al que se unen) que alojan restos polimorfos. Como las diferencias de secuencias entre las diferentes moléculas HLA II están esencialmente localizadas en los bolsillos del sitio de fijación de los péptidos, intervienen directamente en el repertorio de péptidos que se unen a cada molécula.

Por lo tanto, cada individuo reconoce en un antígeno un grupo de péptidos cuya naturaleza depende de las moléculas HLA II que le caracteriza. Como existe un gran número de alelos HLA II, existe por tanto en una secuencia determinada un repertorio importante de epítomos T de secuencias muy diferentes, cada uno específico de un alelo diferente. Un péptido capaz de estimular una respuesta T CD4+ específica contra un antígeno tumoral en algunos individuos puede por tanto ser inactivo en la mayoría de otros individuos, porque estos últimos no reconocen el antígeno tumoral por los mismos epítomos.

Sin embargo, las moléculas HLA II no parecen utilizarse de manera uniforme, para el reconocimiento de los tumores. De hecho los epítomos T que resultan de antígenos tumorales se restringen en su mayoría a las moléculas HLA-DR sugiriendo que al parecer las moléculas HLA-DQ no se utilizan para el reconocimiento de tumores.

Además, los alelos HLA II no se reparten por el mundo de manera uniforme. De esta manera diez moléculas HLA-DR son preponderantes en Europa y en los Estados Unidos y cubren la población fundamental; se trata de moléculas en las que la cadena beta está codificada por los siete alelos del locus HLA-CRB1: *0101, *0301, *0401, *0701, *1101, *1301, *1501, y los alelos DRB3*0101, DRB4*0101 y DRB5*0101 (Tabla I).

Tabla I: Frecuencia genética (alélica*)/fenotípica de HLA II

Alelos	Europa		EE. UU.		África	Asia	
	Francia	Alemania	Caucásico	Afroamericano	Senegal	India	Japón
DRB1*0101	9,3/17,7	6,7/13	7,3/14,1	1,9/3,8	0,6/1,2	3,8/7,5	4,9/9,6
DRB1*0401	5,6/10,9	8,1/15,5	6,7/13	1,5/3,0	0/0	0,9/1,8	0/0
DRB1*1101	9,2/17,6	9,2/17,6	4,4/8,6	8,2/15,7	9,3/17,7	0,9/1,8	2/4
DRB1*0701	14,0/26	12,3/23,1	14,4/26,7	9,8/18,6	7,8/15	13/24,3	0,6/1,2
DRB1*0301	10,9/20,6	9,4/17,9	9,5/18,1	7/13,5	10,2/19,4	5,3/10,3	0,4/0,8
DRB1*1301	6,0/11,6	4,5/8,8	5,1/9,9	4,2/8,2	4,7/9,2	6,3/12,2	0,7/1,4
DRB1*1501	8,0/14,4	7,8/15	10,3/19,5	8,6/16,5	0/0	12,1/22,7	9,1/17,4
TOTAL	63,0/86,3	58,0/82,4	57,7/82,1	41,2/65,4	32,5/54,66	42,3/66,7	17,7/32,3
DRB5*0101	7,9/15,2	4,6/9	2,4/4,7	10,4/19,7	0/0	0/0	5,6/10,9
DRB3*0101	9,2/17,6	9,8/18,6	10,4/19,7	15,1/27,9	6,9/13,3	4,9/9,6	6,5/12,6
DRB4*0101	28,0/48,2	21,1/37,7	19,8/35,7	16,5/30,3	6,9/13,3	24,8/43,4	28,9/49,4
TOTAL	45,1/69,9	35,5/58,4	32,6/54,6	42,0/66,4	13,8/25,7	29,7/50,6	41,0/65,2

(continuación)

Alelos	Europa		EE. UU.		África	Asia	
	Francia	Alemania	Caucásico	Afroamericano	Senegal	India	Japón
DPB1*0101	7,1/13,7	2,2/4,4	3,2/6,3	27,7/47,7	18,2/33,1	nd	0,1/0,2
DPB1*0201	11,9/22,4	8,5/16,3	9,8/18,6	12,9/24,1	13,8/25,7	nd	20,6/37
DPB1*0301	17,0/31,1	3,8/7,5	7,4/14,3	3,3/6,5	3,8/7,5	nd	3/5,9
DPB1*0401	40,0/64	38,1/61,7	25,1/43,9	11/20,8	4,8/9,4	nd	4,7/9,2
DPB1*0402	11,0/20,8	15,4/28,4	12,6/23,6	9/17,2	25,5/44,5	nd	36,8/60,1
TOTAL	87,0/98,3	68,0/89,8	58,1/82,4	63,9/87,0	66,1/88,5	nd	65,2/87,9
Total DP401+402	51/76	53,5/78,4	37,7/61,2	20/36,0	30,3/51,4	nd	41,5/65,8
* las moléculas HLA II preponderantes (frecuencia genética > 5 %) se indican en negrita							

Por ejemplo, en la población francesa que es una población característica de población caucásica (EE. UU., Europa), solo los 7 alelos del locus DRB1 tienen una frecuencia alélica superior al 5%; estos 7 alelos DRB1 representan por sí mismos el 63% de la población. Estos mismos alelos DRB1 son los alelos HLA-DR más abundantes en las otras poblaciones caucásicas. Su frecuencia varía entre el 53% (en España) y el 82% (en Dinamarca). En los Estados Unidos y Canadá, representan respectivamente el 58 y el 55% de alelos de la población.

Además, ciertos alelos DRB1, los más frecuentes en la población caucásica son igualmente frecuentes en la población africana (DRB1*0301, *0701 y *1101), india (DRB1*0301, *0701, *1301 y *1501) y japonesa (DRB1*1501).

Las moléculas HLA-DRB3, -DRB4 y DRB5 que son moléculas HLA-DR en las que la cadena β no está codificada por el gen DBR1 son igualmente preponderantes en Europa, en Estados Unidos y en Japón, puesto que son menos polimórfas que las moléculas DRB1 (Tabla I). Por ejemplo, en Francia, su frecuencia alélica es del 9,2% para DRB3*0101, del 28 % para DRB4*0101 y del 7,9 % para DRB5*0101. Por sí solas cubren el 45% de la frecuencia alélica en Francia.

Además, los motivos de unión de ciertas moléculas HLA-DR son idénticos de tal forma que un péptido se puede unir a varias moléculas HLA-DR. Además, no es raro que los epítomos T CD4+ estén imbricados unos en otros de forma que una secuencia peptídica puede contener varios epítomos T CD4+.

Finalmente, dos moléculas HLA-DP4 (DP401 y DP402) cubren ellas solas la mayoría de la frecuencia alélica de HLA-DP en la población caucásica (de aproximadamente el 50% en Europa y el 80% en América del Norte) y también están presentes como frecuencias no despreciables en las otras poblaciones (frecuencia alélica de aproximadamente el 60% en América del Sur, el 60% en India, el 30% en África y el 40% en Japón; Tabla I). Cada una de estas moléculas DP4 comprenden una cadena alfa codificada, sea por el alelo DPA1*0103 que es el más frecuente (un 78,2%), o sea por el alelo DPA1*0201 (20,2 %) y una cadena beta codificada por el alelo DPB1*0401 (molécula HLA-DP401) o DPB1*0402 (molécula HLA-DP402).

Como las moléculas HLA-DR, las moléculas HLA-DP4 son perfectamente aptas para presentar péptidos a los linfocitos T ya que se han aislado numerosos clones T limitados a HLA-DP4 a partir de antígenos muy variados tales como la toxina tetánica, el virus de la hepatitis B y el alérgeno mayor de *Dermatophagoides pteronissimus*.

Los péptidos, que se unen a moléculas HLA II codificadas por los alelos más frecuentes en la población (moléculas HLA II preponderantes), incluyen por tanto los epítomos T de la mayoría de la población.

Los inventores han identificado tres regiones de la survivina que contienen epítomos T CD4+ limitadas a las 12 moléculas HLA II preponderantes en la población caucásica. Estos péptidos representan candidatos potenciales para la vacunación profiláctica o terapéutica contra los cánceres, debido a que son susceptibles de inducir una respuesta T CD4+ dirigida contra el tumor, en la mayoría de los pacientes, siempre y cuando que: (i) sean el resultado de un antígeno expresado por la mayoría de las células tumorales, (ii) sean aptos para inducir linfocitos T CD4+ específicos de este antígeno, y (iii) tengan en cuenta el polimorfismo de las moléculas HLA II.

Además, estos péptidos que son reconocidos por los linfocitos T CD4+ específicos de un antígeno tumoral expresado por la mayoría de las células tumorales, son útiles para el establecimiento de un pronóstico y el seguimiento de la evolución de los cánceres.

La presente invención tiene por objetivo en consecuencia un péptido derivado de la isoforma alfa de la survivina para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica, el diagnóstico, el pronóstico o el seguimiento terapéutico de un cáncer tal como se define en las reivindicaciones. Siendo seleccionado el péptido de entre el grupo constituido por:

- a) los péptidos de 13 a 18 aminoácidos consecutivos situados entre las posiciones 17 y 34 de la isoforma alfa de la survivina,
- b) los péptidos de 13 a 30 aminoácidos consecutivos situados entre las posiciones 84 y 113 de la isoforma alfa de la survivina, y
- c) los péptidos de 13 a 21 aminoácidos consecutivos situados entre las posiciones 122 y 142 de la isoforma alfa de la survivina,

presentando los péptidos de a), b) y c) una actividad de unión con al menos cuatro moléculas HLA-II preponderantes en la población caucásica, inferior a 1000 nM, y siendo capaces de inducir linfocitos T CD4+ específicos de la survivina.

Definiciones

Se entiende por "péptido apto para ser presentado por al menos una molécula HLA II" un péptido que posee una actividad de unión con al menos una molécula HLA-II, inferior a 1000 nM.

Se entiende por "survivina", las tres isoformas de la survivina: isoforma alfa, survivina 2B y survivina Δ Ex-3. Estas isoformas pueden derivarse de cualquier mamífero; de preferencia, se trata de isoformas humanas. La isoforma alfa de la survivina corresponde con la survivina de 142 aminoácidos; las posiciones se indican en referencia a la secuencia humana (Genbank AAC51660 o SwissProt O15392).

Se entiende por "molécula HLA II preponderante en la población caucásica" o "molécula HLA II preponderante" una molécula HLA II que comprende una cadena beta codificada por un alelo en el que la frecuencia es superior al 5% en la población caucásica, como se muestra en la Tabla I anterior. Ciertas moléculas HLA II preponderantes en la población caucásica y principalmente las moléculas HLA-DP401 y HLA-DP402 son también preponderantes en otras poblaciones (América del Sur, India, Japón, África; Tabla I). En consecuencia, los péptidos de acuerdo con la invención no se limitan a su utilización en la población caucásica, y también pueden utilizarse para vacunar individuos de otros países que no sean de América del Norte y de Europa, en los que las dichas moléculas HLA II son preponderantes, como se muestra en la Tabla I.

Se entiende por "cáncer", un cáncer asociado con la sobre-expresión de la survivina tales como, de manera no limitante: los cánceres de mama, hígado, colon, pulmón, ovario, útero, esófago, estómago, páncreas, hígado y próstata, los melanomas, la enfermedad de Hodgkin, los linfomas no de Hodgkin, las leucemias, el síndrome mielodisplásico refractario con anemia, los neuroblastomas, los feocromocitomas, los sarcomas de tejidos blandos y los tumores cerebrales.

Los péptidos de acuerdo con la invención comprenden un epítipo T CD4+ de la survivina apto para presentarse al menos a una molécula HLA II preponderante, en el que el epítipo está constituido por una secuencia de 9 aminoácidos incluyendo restos de anclaje a las moléculas HLA II, flanqueados en uno de sus extremos, preferentemente en los dos extremos, por al menos 2 aminoácidos, preferentemente 3 aminoácidos.

Los péptidos de acuerdo con la invención presentan las siguientes propiedades:

- actividad de unión con las moléculas HLA II: los péptidos de acuerdo con la invención poseen una buena afinidad por las moléculas HLA II preponderantes, sobre todo en la población caucásica (actividad de unión < 1000 nM); la actividad de unión se define por los ensayos descritos en la reivindicación 1. La actividad puede medirse por un ensayo de unión HLA II/péptido, de competición, con una revelación inmunoenzimática, según el principio descrito en la patente americana US 6.649.166 y la Solicitud Internacional PCR WO 03/040299, respectivamente para las moléculas HLA-DR y HLA-DP4.
- inmunogenicidad: Estos péptidos también son capaces de inducir linfocitos T CD4+ específicos de la survivina a partir de precursores presentes en la mayoría de los individuos intactos o bien de estimular tales células en la mayoría de los individuos que padecen un cáncer asociado con la sobre-expresión de survivina. La inmunogenicidad de los péptidos se puede determinar, sobre todo a partir de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC), por medio de cualquier ensayo apropiado conocido por un experto en la técnica por ejemplo: un ensayo de proliferación celular, un ensayo ELISPOT (cantidad de células productoras de citoquinas) o la cantidad de citoquinas intracelulares (IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10).

La presente descripción desvela variantes naturales o sintéticas obtenidas por mutación (inserción, eliminación, sustitución) de uno o más aminoácidos en la secuencia de la isoforma alfa de la survivina humana, siempre y

- cuando dicha variante conserve una buena afinidad por al menos una molécula HLA II preponderante, sobre todo en la población caucásica (actividad de unión < 1000 nM) y sea inmunogénica. Las variantes naturales resultan sobre todo del polimorfismo de la survivina. Además, se pueden construir fácilmente otros variantesya que los restos de aminoácidos implicados en la unión con las moléculas HLA-DR y HLA-DP4 (restos de anclaje) y el efecto de las modificaciones de estos restos sobre la unión de las moléculas HLA-DR y HLA-DP4 son conocidos por los expertos en la técnica; la Solicitud Internacional PCR WO 03/040299 enseña principalmente que para unirse a HLA-DP4, es resto en P6 tiene que ser aromático o hidrófobo o consistir en un resto de cisteína (C), y al menos uno de los restos P1, P9 es tal que P1 es aromático o hidrófobo y/o P9 es aromático o hidrófobo o consiste en un resto C, D, Q, S, T o E, mientras que el resto P4 puede ser cualquier resto de aminoácido. La Patente americana US 6.649.166 describe un procedimiento general que permite determinar los restos de anclaje a las moléculas HLA-DR (P1, P4, P6, P7 y P9) y la naturaleza de las mutaciones de estos restos que permiten modificar la afinidad para las moléculas HLA DR. Los motivos de unión a las moléculas HLA DR se describen principalmente en Sturnolio y col., Nat. Biotech, 1999, 17, 533-534 y Rammensee y col., Immunogenetics, 1995, 41, 178-228.
- La presente descripción también engloba los péptidos modificados derivados de los precedentes por introducción de todas las modificaciones a nivel de los restos de aminoácidos, de la unión peptídica o de los extremos de los péptidos, siempre y cuando el dicho péptido modificado conserve una buena afinidad para al menos una molécula HLA II preponderante, sobre todo en la población caucásica (actividad de unión < 1000 nM) y sea inmunogénica. Estas modificaciones que se introducen en los péptidos por los métodos clásicos conocidos por los expertos en la técnica, incluyen de manera no limitante: la sustitución de un aminoácido por un aminoácido no proteinogénico (aminoácido D o análogo de aminoácido); la adición de un grupo químico (lípidos, oligo o polisacárido) a nivel de un grupo funcional reactivo, sobre todo de la cadena lateral R; la modificación de la unión peptídica (-CO-NH-) principalmente por una unión de tipo retro o retro inversa (-NH-CO-) o una unión diferente de la unión peptídica: el ciclado; la fusión de un péptido (el epítipo de interés para la vacunación; una marca útil para la purificación del péptido, principalmente bajo la forma escindible por una proteasa); la fusión de la secuencia de dicho péptido con la de una proteína, principalmente una cadena α o β de una molécula HLA II o el dominio extracelular de dicha cadena o bien también una secuencia de dirección al endosoma derivada principalmente de la cadena invariante li o de la proteína LAMP-1; el acoplamiento con una molécula adecuada, sobre todo a un marcador, por ejemplo un fluorocromo.
- Dicha molécula HLA II preponderante en la población caucásica se selecciona de entre las moléculas HLADRB1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR7, HLA-DR11, HLA-DR13, HLA-DR15, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5 y HLADP4, preferentemente entre las moléculas HLA-DR1, HLA-DR4, HLA-DR7, HLA-DR11, HLA-DR13, HLA-DR15, HLADRB5, HLA-DP401 y HLA-DP402.
- Dichas moléculas HLA II se codifican respectivamente por los alelos HLA DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DR1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301, DRB1*1501, DRB3*0101, DRB4*0101, DRB5*0101, DP*0401 y DP*0402.
- Entre las moléculas HLA II preponderantes en la población caucásica, las moléculas HLA-DP401 y HLA-DP402 son igualmente preponderantes en América del Sur, en India, en África y en Japón.
- De manera particularmente ventajosa, dicho péptido es apto para ser presentado por al menos una molécula HLA-DP401 o HLA-DP402.
- El péptido se selecciona de entre en grupo constituido por los péptidos: 17-31, 19-33, 20-34, 84-98, 90-104, 91-105, 93-107, 96-110 y 128-142 que poseen una buena afinidad (actividad de unión < 1000 nM) por al menos cuatro moléculas HLA II preponderantes en la población caucásica.
- De manera remarcable, la unión de los péptidos que poseen una buena afinidad para al menos cuatro moléculas HLA II preponderantes en la población caucásica, a excepción del péptido 128-142, poseen igualmente una buena afinidad para al menos una molécula HLA-DP401 o HLA-DP402.
- Dicho péptido se selecciona ventajosamente de entre el grupo constituido por las secuencias SEC ID N° 5, 6, 7, 17, 19, 20, 21, 23 y 28.
- Tales péptidos permiten a la vez obtener una buena cobertura vacunal en los individuos de la población caucásica y de extender la cobertura vacunal a los individuos de otras poblaciones (América del Sur, África, India y Japón).
- De manera preferida, dicho péptido se selecciona de entre el grupo constituido por los péptidos: 17-31, 19-33, 90-104, 93-107, 96-110 y 128-142.
- De manera aún más preferida, dicho péptido se selecciona de entre el grupo constituido por los péptidos: 19-33, 90-104 y 93-107.
- De acuerdo con otro modo de realización ventajoso de dicho péptido, presenta una secuencia de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos.
- La divulgación describe una variante de uno de los péptidos precedentes, obtenido por la sustitución de al menos un

resto P1, P6 y/o P9 de anclaje a las moléculas HLA II, por un aminoácido aromático o hidrófobo, del resto P6 por una cisteína (C), del resto P9 por C, D, Q, S, T o E y/o del resto P4 por otro aminoácido natural o sintético.

5 Se entiende por aminoácido natural o sintético, los 20 α -aminoácidos naturales que se encuentran comúnmente en las proteínas (A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V), ciertos aminoácidos que se encuentran rara vez en las proteínas tales como β -alanina, ácido γ -aminobutírico, homocisteína, ornitina, citrulina, canavanina, norleucina, ciclohexilalanina..., así como los enantiómeros y diaestereoisómeros de los aminoácidos anteriores.

Se entiende por un aminoácido hidrófobo, un aminoácido seleccionado de entre (con código de una letra): A, V, L, I, P, W, F y M.

Se entiende por aminoácido aromático, un aminoácido seleccionado de entre (con código de una letra): F, W e Y.

10 De acuerdo con otro modo de realización ventajosa de dicho péptido, está marcado o formando un complejo; puede principalmente formar complejos con moléculas HLA II marcados, por ejemplo biotinilados, para formar complejos HLA II/péptidos, en particular complejos multiméricos como los tetrámeros.

15 La presente invención igualmente tiene como objetivo un fragmento poliepitópico que comprende la concatenación de al menos dos epítopos idénticos o diferentes en el que uno al menos es un epítipo T CD4+ de la survivina incluido en un péptido de la invención, para su uso como un antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica, el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de la terapia del cáncer.

Preferentemente, dicho fragmento poliepitópico presenta una longitud de 20 a 1000 aminoácidos, preferentemente de 20 a 100 aminoácidos.

20 Dicho fragmento poliepitópico comprende ventajosamente un marcador fusionado en uno de sus extremos, para la purificación o la detección de dicho fragmento. El marcador, es principalmente una secuencia polihistidina o un epítipo B de un antígeno, preferentemente se separa de la secuencia poliepitópica por un sitio de escisión de una proteasa, de forma que se aísle la secuencia poliepitópica, a partir de la fusión.

25 De acuerdo con un modo de realización ventajosa de dicho fragmento poliepitópico, comprende la concatenación de al menos un epítipo T CD4+ de la survivina incluido en un péptido de la invención y al menos un epítipo seleccionado de entre el grupo constituido por:

- un epítipo T CD8+ de la survivina, presentado por una molécula HLA I y reconocido por linfocitos T citotóxicos específicos de dicho antígeno; tales epítopos T CD8+ se describen principalmente en el sitio de internet <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/tumorspecific.htm> preferentemente el epítipo T CD8+ se elige de entre la survivina 96-104 (LTLGEFLKL, SEQ ID NO : 37) o 95-104 (ELTLGEFLKL, SEC ID N° 38), survivina-2B 80-88 (AYACNTSTL, SEQ ID NO : 39) y los péptidos que se describen en la Tabla I de Bachinsky y col., Cancer Immun., 2005, 5, 6.
- 30 - un epítipo T CD4+ universal natural o sintético tal como el péptido de la toxina tetánica TT 830-846 (O'SULLIVAN y col., J. Immunol., 1991, 147, 2663-2669), péptido de la aglutinina del virus de la gripe HA 307-319 (O'Sullivan y col., citado anteriormente), el péptido PADRE (KXVAAWTLKAA, SEQ ID NO : 41; Alexander y col., Immunity, 1994, 1, 751-761) y péptidos derivados de los antígenos de *Plasmodium falciparum* tales como el péptido CS.T3 (Sinigaglia y col., Nature, 1988, 336, 778-780) y los péptidos CSP, SSP2, LSA-1 y EXP-1 (Doolan y col., J. Immunol., 2000, 165, 1123-1137),
- 35 - un epítipo B constituido por un azúcar (Alexander y col., citado anteriormente), dicho epítipo B será preferentemente bajo la forma de un glucopéptido, y
- 40 - un epítipo B de la survivina reconocido específicamente por los anticuerpos dirigidos contra dicho antígeno tumoral.

La combinación del epítipo T CD4+ con el al menos uno de los epítopos de la invención permite ventajosamente desencadenar o modular una respuesta inmunitaria anti-tumoral.

45 La presente invención tiene igualmente por objetivo un lipopéptido que comprende un péptido o un fragmento poliepitópico de la invención, para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica, el diagnóstico, pronóstico o el seguimiento de la terapia del cáncer.

50 Dicho lipopéptido se obtiene por la adición de un lípido sobre un grupo funcional α -aminado o un grupo funcional reactivo de la cadena lateral de un aminoácido de dicho péptido o fragmento poliepitópico de la invención.; puede comprender una o más cadenas derivadas de ácidos grasos en C₄₋₂₀, eventualmente ramificados o insaturados (ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido 2-amino hexadecanoico, pimeláutido, trimetauxida) o un derivado de un esteroide. La parte lipídica preferida está representada principalmente por un grupo N^α-acetil-lisina N^ε (palmitoil), también llamado Ac-K (Pam).

55 La presente invención también tiene por objetivo una proteína de fusión constituida por una proteína o un fragmento de proteína, que se fusiona con un péptido o un fragmento poliepitópico de la invención, para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica, el diagnóstico, pronóstico o el seguimiento terapéutico del

cáncer.

El péptido o el fragmento poliepitópico pueden fusionarse con el extremo NH₂ o COOH de dicha proteína o se pueden insertar en la secuencia de dicha proteína.

5 De acuerdo con un modo de realización ventajosa de dicha proteína de fusión, está constituida por un péptido de la invención, fusionado con una secuencia de dirección al endosoma, derivado preferentemente de una cadena invariante humana Ii o de la proteína LAMP-1. Las secuencias dirigidas al endosoma y su utilización para la dirección de antígenos al endosoma están descritas principalmente en Sanderson y col. (P.N.A.S., 1995, 92, 7217-7222), Wu y col. (P.N.A.S., 1995, 92, 11671-11675) y Thompson y col. (J. Virol., 1998, 72, 2246-2252).

10 De acuerdo con otro modo de realización ventajosa de dicha proteína de fusión, está constituida por un péptido tal como el que se define en la reivindicación 1, fusionado con una de las cadenas de una molécula HLA II, preferentemente la cadena beta, o bien con un fragmento de la misma correspondiente a una molécula HLA II soluble, principalmente un fragmento correspondiente al dominio extracelular precedido del péptido de señal homólogo o de un péptido de señal heterólogo. Dicho péptido está insertado ventajosamente entre el péptido de señal y el extremo NH₂ del dominio extracelular de la cadena β, como se ha descrito para la molécula HLA-DR
15 (Kolzin y col., PNAS, 2000, 97, 291-296).

De manera alternativa, el péptido o el fragmento poliepitópico de la invención se fusionan con una proteína para facilitar su purificación o detección, conocido por un experto en la técnica principalmente como el glutatión-S-transferasa (GST) y las proteínas fluorescentes (GFP y derivadas). En este caso, la secuencia del péptido o del fragmento poliepitópico de interés preferentemente está separado del resto de la proteína por un sitio de escisión de proteasa, para facilitar la purificación de dicho péptido o de dicho fragmento poliepitópico.
20

La presente invención también tiene por objetivo un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un péptido, un fragmento poliepitópico o una proteína de fusión de la invención, bajo el control de secuencias reguladoras adecuadas, de la transcripción y eventualmente de la traducción, para la utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica, el diagnóstico o el pronóstico del cáncer.

25 De acuerdo con la invención, la secuencia de dicho polinucleótido es la del ADNc que codifica dicho polipéptido o fragmento poliepitópico o dicha proteína de fusión. Dicha secuencia se puede modificar ventajosamente de forma que el uso de los codones sean óptimos en el huésped en el que se expresa. Además, dicho polinucleótido puede estar unido a al menos una secuencia heteróloga.

30 En el sentido de la presente invención, se entiende por secuencia heteróloga con respecto a una secuencia de ácido nucleico que codifica la survivina, toda secuencia de ácido nucleico distinta de las que, en la naturaleza, están inmediatamente adyacentes a dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dicho péptido de la survivina.

De acuerdo con la invención dicho vector recombinante comprende un casete de expresión que incluye al menos un polinucleótido tal como el que se define anteriormente, bajo el control de secuencias reguladoras de la transcripción y eventualmente de la traducción apropiados (promotor, activador, intrón, codón de iniciación (ATG), codón de parada, señal de poliadenilación).
35

Se conocen muchos vectores en los que se puede insertar una molécula de ácido nucleico de interés con el fin de introducirla y mantenerla en una células huésped eucariota o procariota: la elección de un vector apropiado depende de la utilización prevista para ese vector (por ejemplo la replicación de la secuencia de interés, la expresión de esta secuencia, el mantenimiento de esta secuencia en su forma extracromosómica, o bien la integración en el material cromosómico del huésped) según la naturaleza de la células huésped. Por ejemplo, se puede utilizar entre otros vectores víricos, tales como adenovirus, retrovirus, lentivirus, los AAV y los baculovirus en los que se ha insertado previamente la secuencia de interés, o también se puede asociar dicha secuencia (aislada o insertada en un vector plásmido) con una sustancia que le permita penetrar la membrana de las células huésped, tal como un portador como un nanoportador o una preparación de liposomas, o de polímeros catiónicos, o bien introducirla en dicha célula huésped utilizando procedimientos físicos tales como electroporación o microinyección. Además, se pueden combinar ventajosamente estos procedimientos, por ejemplo utilizando la electroporación asociada a liposomas.
40
45

La presente invención también tiene como objetivo una composición inmunógena o vacunal, que se caracteriza por que comprende al menos un péptido, un fragmento poliepitópico, una proteína de fusión, un lipopéptido o un vector tales como los que se definen en la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, un vehículo o un adyuvante.
50

La composición inmunogénica según la invención se presenta bajo una forma de dosificación adaptada a una administración por vía parenteral (subcutánea, intramuscular, intravenosa), enteral (oral, sublingual), o local (rectal, vaginal).

55 Los vehículos farmacéuticamente aceptables, las sustancias portadoras y los adyuvantes son los que se utilizan clásicamente.

Los adyuvantes se seleccionan ventajosamente de entre el grupo constituido por: emulsiones oleosas, sustancias minerales, extractos bacterianos, saponina, hidróxido de aluminio, monofosforil- lípido A y escualeno.

Las sustancias portadoras se seleccionan ventajosamente de entre el grupo constituido por: los liposomas unilamelares o multilamelares, los ISCOMS, virosomas, pseudopartículas víricas, micelas de saponina, microsferas sólidas de naturaleza sacárida (poli (láctico- co-glicólido)) o aurífera, y las nanopartículas.

5

De acuerdo con un modo de realización ventajosa de dicha composición, comprende al menos un epítipo T CD4+ y un epítipo T CD8+ de la survivina, en forma de mezcla de péptidos, de un fragmento poliepitópico y/o de un vector de expresión que codifica dichos péptidos o dicho fragmento, tales como los que se definen en las reivindicaciones.

De acuerdo con una disposición ventajosa de este modo de realización de dicha composición, el epítipo T CD8+ se elige de entre: survivina 96-104 (LTLGEFLKL) o 95-104 (ELTLGEFLKL), survivina-2B 80-88 (AYACNTSTL) y los péptidos tales como los descritos en la Tabla I de Bachinsky y col., Cancer Immun., 2005, 5, 6.

10

De acuerdo con otro modo de realización ventajosa de dicha composición, comprende al menos dos péptidos de la survivina que incluyen un epítipo T CD4+ tales como los que se han definido anteriormente, seleccionados de entre el grupo constituido por una de las combinaciones siguientes:

15

- el péptido 17-31 y al menos uno de los péptidos 19-33, 90-104 o 128-142,
- el péptido 19-33 y el péptido 96-110,
- el péptido 90-104 y el péptido 17-31,
- el péptido 96-110 y el péptido 90-104, y
- los péptidos 93-107 y 128-142, y al menos uno de los péptidos 17-31, 19-33, 96-110 o 90-104.

20

Tales combinaciones permiten ventajosamente inducir a los linfocitos T CD4+ de casi la totalidad de los individuos vacunados.

De acuerdo con otro modo más de realización ventajosa de dicha composición, comprende un péptido que incluye un epítipo T CD4+ universal, tal como se ha definido anteriormente.

25

La presente invención tiene también por objetivo la utilización de al menos un péptido, un fragmento poliepitópico, una proteína de fusión, un lipopéptido y/o un vector tales como los que se definen en las reivindicaciones para la preparación de una vacuna destinada a la prevención o al tratamiento del cáncer.

Los péptidos de acuerdo con la presente invención y los productos derivados (fragmento poliepitópico, proteína de fusión, lipopéptido, vector recombinante) se pueden utilizar en inmunoterapia en el tratamiento de tumores que sobre-expresan la survivina. Dichos péptidos o productos derivados se utilizan sea como una vacuna, sea en terapia celular o bien también por una combinación de las dos estrategias.

30

La terapia celular comprende la preparación de células presentadoras de antígenos (células dendríticas) por un protocolo clásico que comprende el aislamiento de las células mononucleares de la sangre periférica (PMBC) de un paciente a tratar y cultivar las células dendríticas en presencia de péptido(s). En una segunda etapa las células presentadoras de antígeno cargadas con el péptido se reinyectan en el paciente.

35

La presente invención también tiene como objetivo la utilización de al menos un péptido, un fragmento poliepitópico, una proteína de fusión, un lipopéptido y/o un vector de la invención para la preparación de un reactivo de diagnóstico, de evaluación del pronóstico o de seguimiento del tratamiento de un cáncer. Dicho reactivo comprende un péptido o una proteína de fusión tales como los que se han definido en las reivindicaciones, marcados o formando complejos eventualmente, principalmente formando complejo con moléculas HLA II marcados, por ejemplo biotinilados, bajo la forma de complejos multiméricos como los tetrámeros.

40

La presente invención también tiene por objetivo un procedimiento *in vitro*, de diagnóstico, de evaluación del pronóstico o de seguimiento del tratamiento de un cáncer en un individuo, que se caracteriza porque comprende:

- poner en contacto una muestra biológica de dicho individuo con un péptido de la invención, y
- la detección de linfocitos T CD4+ específicos de la survivina, por cualquier procedimiento adecuado.

45

La presente invención tiene también por objetivo un kit de diagnóstico, de evaluación del pronóstico o de seguimiento del tratamiento de un cáncer, caracterizado por que comprende al menos un péptido tal como el que se define en la invención y eventualmente un reactivo de detección de linfocitos T CD4+.

El procedimiento de acuerdo con la invención permite seguir la evolución de la respuesta T CD4+ dirigida contra la survivina en el curso de un cáncer o bien de un tratamiento anti-tumoral, principalmente de una inmunoterapia anti-tumoral; los linfocitos T CD4+ específicos de la survivina pueden ser de tipo TH1 (secreción de IFN- γ), TH2 (secreción de IL-4) y regulador T (secreción de IL-10 l de TGF- β), se espera que la respuesta T de tipo TH1 es signo de una evolución favorable del cáncer mientras que la respuesta T reguladora es un signo de una evolución desfavorable de ese cáncer. La detección se efectúa a partir de una muestra biológica que contiene las células T

50

CD4+, principalmente una muestra de células mononucleares aisladas a partir de una extracción de sangre periférica (PBMC).

Los linfocitos T CD4+ específicos de la survivina se detectan por cualquier medio que se conozca. Por ejemplo se pueden utilizar medios directos como la citometría de flujo en presencia de complejos multiméricos tales como los que se han descrito anteriormente, o bien por medios indirectos como los ensayos de proliferación linfocitaria y las cantidades de citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ , principalmente por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA, RIA, ELISPOT) o por citometría de flujo (cantidad de citoquinas intracelulares).

De manera más precisa:

Una suspensión de células (PBMC, PBMC sin células CD8+, linfocitos T extraídos enriquecidos por una etapa de cultivo *in vitro* con los péptidos tales como los que se han definido anteriormente o linfocitos T clonados) se cultiva durante 3 a 5 días en presencia de los dichos péptidos y con las células presentadoras de antígeno necesarias, tales como células dendríticas, PBMC autólogas o heterólogas, células linfoblastoides tales como la que se obtienen tras la infección por el virus EBV o las células modificadas genéticamente. La presencia de células T CD4+ específicas de la survivina, en la suspensión inicial se detecta con la ayuda de los péptidos, según uno de los procedimientos siguientes:

* Ensayo de proliferación:

La proliferación de las células T CD4+ específicas de la survivina se mide por la incorporación de timidina tritilada en el ADN de las células

* Ensayo ELISPOT:

El ensayo ELISPOT permite revelar la presencia de linfocitos T que segregan citoquinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ), específicos de un péptido tal como el que se ha definido anteriormente. El principio de este ensayo está descrito en Czerkinsky y col., J. Immunol. Methods, 1983, 65, 109-121 y Schmittl y col., J. Immunol. Methods, 1997, 210, 167-174, y cómo se lleva a cabo se ilustra en la Solicitud Internacional WO 99/51630 o en Gahéry-Ségard y col., J. Virol., 2000, 74, 1694-1703.

* Detección de citoquinas:

La presencia de linfocitos T específicos de la survivina, que segregan citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ se detecta, bien por la cantidad de citoquinas presentes en el sobrenadante del cultivo, por un ensayo inmunoenzimático, principalmente con la ayuda de un kit comercial, o bien por detección de citoquinas intracelulares en un citómetro de flujo. El principio de detección de citoquinas intracelulares se describe en Goulder y col., J. Exp. Med., 2000, 192, 1819-1832 y Maecker y col., J. Immunol. Methods, 2001, 255, 27-40 y cómo se lleva a cabo se ilustra en Draenert y col., J. Immunol. Methods, 2003, 275, 19-29.

* Complejos multiméricos:

- una muestra biológica, preferentemente células mononucleares de sangre periférica (PBMC), se pone en contacto con los complejos multiméricos marcados, principalmente por un fluorocromo, formados por la unión entre moléculas HLA II solubles y los péptidos tales como los que se han definido anteriormente, y
- se analizan las células marcadas por los dichos complejos multiméricos, principalmente por citometría de flujo.

De manera ventajosa, antes de la puesta en contacto de la muestra biológica con dichos complejos, se enriquecen los linfocitos T CD4+, poniéndolos en contacto con anticuerpos anti-CD4.

Los complejos multiméricos HLA II/péptido pueden prepararse a partir de moléculas nativas extraídas de células que expresan una molécula HLA II o de moléculas recombinantes producidas en las células huésped adecuadas como se precisa, por ejemplo en NOVAK y col. (J. Clin. Investig., 1999, 104, R63-R67) o en KURODA y col. (J. Virol., 2000, 74, 18, 8751-8756). Estas moléculas HLA II pueden ser truncadas principalmente (eliminación del dominio transmembranario) y su secuencia se puede modificar con el fin de hacerlas solubles o bien de facilitar el alojamiento de las cadenas alfa y beta (Novak y col., citado anteriormente).

La carga de las moléculas HLA II con el péptido se puede hacer poniendo en contacto una preparación de moléculas HLA II como anteriormente, con el péptido. Por ejemplo, las moléculas HLA II solubles y biotiniladas se incuban durante 72 horas a 37 °C, con un exceso de un factor 10 de péptidos tales como los que se han definido anteriormente, en un tampón de fosfato-citrato 10 mM, NaCl 0,15 M a un pH comprendido entre 4,5 y 7.

De manera alternativa, la secuencia del péptido puede introducirse en una de las cadenas de la molécula HLA II bajo la forma de una proteína de fusión que permite la preparación de complejos multiméricos HLA II/péptidos a partir de células huésped apropiadas que expresan dicha proteína de fusión. Dichos complejos pueden marcarse a continuación, principalmente por biotina.

Los complejos multiméricos de tipo tetrámero se obtienen principalmente adjuntando a las moléculas HLA II

cargadas, estreptavidina marcada por un fluorocromo en una cantidad cuatro veces menor (mol a mol) con respecto a las moléculas HLA II. El conjunto se incuba en seguida durante una duración suficiente, por ejemplo una noche a temperatura ambiente.

- 5 Los complejos multiméricos también pueden estar formados, sea por incubación de monómeros de HLA II / péptidos con perlas magnéticas acopladas a estreptavidina como se ha descrito para las moléculas HLA II (Bodinier y col., Nature, 2000, 6, 707-710) o sea por inserción de monómeros HLA II/péptidos en vesículas lipídicas como se ha descrito para las moléculas del CMH de clase II murinos (Prakken, Nature Medicine, 2000,6, 1406-1410).

- 10 Para utilizar estos complejos multiméricos HLA II/péptido principalmente de tipo tetrámero, se ponen en contacto una solución de células (PBMC, PBMC desprovistas de células CD8+, linfocitos T enriquecidos anteriormente por una etapa de cultivo *in vitro* con los péptidos tales como los que se han definido anteriormente o clones de linfocitos T) con los complejos multiméricos HLA II/péptido a una concentración apropiada (por ejemplo, aproximadamente 10 a 20 µg/ml), durante una duración suficiente para permitir la unión entre los complejos y los linfocitos T CD4+ específicos de la survivina (por ejemplo, aproximadamente 1 a 3 horas). Tras el lavado, se analiza la suspensión por citometría de flujo; se visualiza en marcado de las células por los complejos multiméricos que son fluorescentes.

- 15 La citometría de flujo permite separar las células marcadas por los complejos multiméricos HLA II/péptido de las células no marcadas y de efectuar así una clasificación de las células.

La presente invención tiene también, además, por objetivo un procedimiento de clasificación de los linfocitos T CD4+ específicas de la survivina, que se caracteriza porque tiene la menos las siguientes etapas:

- 20 - la puesta en contacto, *in vitro*, de una muestra celular con los complejos multiméricos HLA II/péptido marcados, principalmente por fluorocromo, estando formados dichos complejos por la unión de moléculas HLA II solubles con al menos un péptido de la invención, y
- la clasificación de células unidas a dichos complejos HLA II/ péptido, principalmente por citometría de flujo.

La presente invención tiene además por objetivo un péptido tal como el que se define en las reivindicaciones, con la excepción del péptido que se sitúa entre las posiciones 89 a 101 de la isoforma alfa de la survivina (péptido 89-101).

- 25 La presente invención también tiene como objetivo un fragmento poliepitópico, una proteína de fusión, un lipopéptido, un polinucleótido, un vector recombinante y una células huésped procariota o eucariota modificada, tales como se definen en las reivindicaciones.

- 30 Los polinucleótidos, los vectores recombinantes y las células transformadas tales como las que se definen anteriormente, son útiles principalmente para la producción de péptidos, fragmentos poliepitópicos, y proteínas de fusión de acuerdo con la invención.

- 35 Los polinucleótidos de acuerdo con la invención se obtienen por los procedimientos clásicos, que se conocen, siguiendo los protocolos de referencia tales como los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. A USUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). Por ejemplo, se pueden obtener por amplificación de una secuencia nucleica por PCR o RT-PCR, por exploración de bancos de ADN genómico por hibridación con una sonda homóloga, o bien por síntesis química total o parcial. Los vectores recombinantes se construyen y se introducen en las células huésped por los procedimientos clásicos de ADN recombinante y de modificación genética, que se conocen.

- 40 Los péptidos y sus derivados (variantes, péptidos modificados, lipopéptidos, fragmentos poliepitópicos, proteínas de fusión), se preparan por las técnicas clásicas conocidas por los expertos en la técnica, principalmente por síntesis en fase sólida o líquida o por expresión de un ADN recombinante en un sistema celular apropiado (eucariota o procariota).

De una manera más precisa:

- 45 - los péptidos y sus derivados (variantes, fragmentos poliepitópicos) pueden sintetizarse en fase sólida, según la técnica Fmoc, descrita originalmente por Merrifield y col. (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85: 2149-) y se purifican por cromatografía líquida de altas prestaciones de fase inversa,
- los lipopéptidos se pueden preparar principalmente según el procedimiento descrito en las Solicitudes Internacionales WO 99/40113 o WO 99/51630.
50 - los péptidos y derivados tales como las variantes, los fragmentos poliepitópicos y las proteínas de fusión pueden también producirse a partir de los ADNc correspondientes, obtenidos por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica; el ADNc se clona en un vector de expresión eucariota o procariota y la proteína o el fragmentos producidos en las células modificadas por el vector recombinante se purifican por cualquier medio apropiado, principalmente por cromatografía de afinidad.

- 55 Aparte de las disposiciones precedentes, la invención comprende además otras disposiciones que se desprenden de la descripción a continuación, que se refiere a los ejemplos de cómo se lleva a cabo el objetivo de la presente invención, con referencia a los dibujos adjuntos a la misma.

- la figura 1 ilustra la especificidad de las líneas de linfocitos T CD4+ obtenidas a partir de PBMC de donantes sanos 171 y 174. Las líneas de linfocitos T CD4+ se obtuvieron después de tres estimulaciones con una semana de intervalo, con células dendríticas autólogas cargadas con una mezcla de siete péptidos seleccionados (17-31, 20-34, 84-98, 90-104, 93-107, 96-110 y 128-142). La especificidad de las líneas de linfocitos T se evaluó por ELISPOT IFN- γ . Se incubaron 10^4 linfocitos T CD4+, por duplicado, con 10^5 PBMC autólogas, en presencia o ausencia del péptido. La revelación de las muestras se efectuó 24 horas después de la incubación. Cada barra representa el número medio de manchas de los duplicados $\pm$ la desviación estándar. Los valores positivos son al menos tres veces superiores a los del control negativo.
- la figura 2 ilustra los elementos de restricción HLA II de las líneas de linfocitos T CD4+ específicas de diferentes péptidos de la survivina, provenientes de seis donantes sanos (169, 171, 174, 187, 188, 208). Las líneas de linfocitos T CD4+ se obtuvieron después de tres estimulaciones con una semana de intervalo, con células dendríticas autólogas cargadas con una mezcla de siete péptidos seleccionados (17-31, 20-34, 84-98, 90-104, 93-107, 96-110 y 128-142). La restricción HLA II de las líneas de linfocitos T se evaluó por ELISPOT IFN- γ . Se incubaron 10^4 linfocitos T CD4+, por duplicado, con $3 \cdot 10^4$ células-L transfectadas con una de las moléculas HLA-DR o HLA-DP4, en presencia o ausencia del péptido adecuado. Cada barra presenta el número medio de manchas de los duplicados $\pm$ la desviación estándar.
- la figura 3 ilustra la presentación de la survivina a las líneas de linfocitos T CD4+ específicas de péptido. Las líneas de linfocitos T CD4+ específicas de survivina se obtuvieron a partir de PBMC de dos donantes sanos (187 y 188). La survivina (BIR5) y la proteína Nef del VIH se incubaron durante 4 horas con las células dendríticas autólogas inmaduras. Las células dendríticas (CD) se lavaron enseguida, después se incubaron con los linfocitos T CD4+ ($2 \cdot 10^4$ CD y 10^4 linfocitos T CD4+). La respuesta de los linfocitos T CD4+ se midió con ELISPOT IFN- γ . Cada barra representa el número medio de manchas de los duplicados $\pm$ desviación estándar.
- la figura 4 ilustra la respuesta de las líneas de linfocitos T CD4+ específicos de la survivina a dosis decrecientes de péptido. Las líneas de linfocitos T CD4+ específicos de la survivina se obtuvieron a partir de PBMC de dos donantes sanos (174-188). Las líneas se incubaron se incubaron con concentraciones decrecientes (10^{-5} a 10^{-10} M) del péptido 17-31 ($\blacktriangle$), 90-104 ($\blacksquare$), 93-107 ($\blacksquare$), 96-110 ($\triangle$) o 128-142 ($\square$), en presencia de 10^5 PBMC autólogas. La respuesta de los linfocitos T CD4+ se midió por ELISPOT IFN- γ .

Ejemplo 1: Actividad de unión de los péptidos de la survivina frente a moléculas HLA II

1) Materiales y procedimientos

a) Péptidos y proteínas

Se seleccionaron péptidos de 15 aminoácidos (15meros) que cubrían la totalidad de la secuencia de la survivina (SwissProt 015392) en función de la presencia de restos aromáticos o hidrófobos en las posiciones 1 a 5, en particular en la posición 3 o 4, por anclaje en el bolsillo P1 de las moléculas HLA-DR y HLA-DP4.

Las secuencias de los péptidos seleccionados se presentan en la Tabla II y el listado de secuencias adjunta en un anexo.

Los péptidos se sintetizaron según la estrategia Fmoc por síntesis paralela en fase sólida (sintetizador 357 MPS, ADVANCED CHEMTECH EUROPE), se purifican eventualmente por RP-HPLC (Columna C₁₈ Vydac, INTERCHIM) y se controlaron por espectrometría de masas (ES-MS) y analítica HPLC.

La survivina (Bir5 o BIR5) y la proteína Nef del VIH se produjeron en *E. coli*, en forma de proteínas de fusión con la glutatión S-transferasa (GST), se purificaron en una columna de glutatión y se separaron de la GST por escisión proteolítica.

Tabla II: Secuencias de péptidos de la survivina (SEC ID N° 1 a 28)

SEC ID N°	posiciones	secuencia														
1	1-15*	M	G	A	P	T	L	P	P	A	W	Q	P	F	L	K
2	4-18	P	T	L	P	P	A	W	Q	P	F	L	K	D	H	R
3	8-22	P	A	W	Q	P	F	L	K	D	H	R	I	S	T	F
4	11-25	Q	P	F	L	K	D	H	R	I	S	T	F	K	N	W
5	17-31	H	R	I	S	T	F	K	N	W	P	F	L	E	G	C
6	19-33	I	S	T	F	K	N	W	P	F	L	E	G	C	A	C
7	20-34	S	T	F	K	N	W	P	F	L	E	G	C	A	C	T

(continuación)

SEC ID Nº	posiciones	secuencia															
8	23-37	K	N	W	P	F	L	E	G	C	A	C	T	P	E	R	
9	36-50	E	R	M	A	E	A	G	F	I	H	C	P	T	E	N	
10	41-55	A	G	F	I	H	C	p	T	E	N	E	P	D	L	A	
11	52-66	P	D	L	A	Q	C	F	F	C	F	K	E	L	E	G	
12	56-70	Q	C	F	F	C	F	K	E	L	E	G	W	E	P	D	
13	59-73	F	C	F	K	E	L	E	G	W	E	P	D	D	D	P	
14	62-76	K	E	L	E	G	W	E	P	D	D	D	P	I	E	E	
15	65-79	E	G	W	E	P	D	D	D	P	I	E	E	H	K	K	
16	72-86	D	P	I	E	E	H	K	K	H	S	S	G	C	A	F	
17	84-98	C	A	F	L	S	V	K	K	Q	F	E	E	L	T	L	
18	87-101	L	S	V	K	K	Q	F	E	E	L	T	L	G	E	F	
19	90-104	K	K	Q	F	E	E	L	T	L	G	E	F	L	K	L	
20	91-105	K	Q	F	E	E	L	T	L	G	E	F	L	K	L	D	
21	93-107	F	E	E	L	T	L	G	E	F	L	K	L	D	R	E	
22	94-108	E	E	L	T	L	G	E	F	L	K	L	D	R	E	R	
23	96-110	L	T	L	G	E	F	L	K	L	D	R	E	R	A	K	
24	99-113	G	E	F	L	K	L	D	R	E	R	A	K	N	K	I	
25	102-116	L	K	L	D	R	E	R	A	K	N	K	I	A	K	E	
26	111-125	N	K	I	A	K	E	T	N	N	K	K	K	E	F	E	
27	122-136	K	E	F	E	E	T	A	K	K	V	R	R	A	I	E	
28	128-142	A	K	K	V	R	R	A	I	E	Q	L	A	A	M	D	

* las posiciones se numeran con respecto a la secuencia de la survivina humana de 142 aminoácidos (SwissProt 015392).

b) Ensayo de unión HLA II/péptido

Los ensayos de unión a las moléculas HLA II son ensayos de unión competitiva con una revelación inmunoenzimática, tales como los que se describen en la Patente Americana US 6.649.166, Texier y col., J. Immunol., 2000, 164, 3177-3184 y Texier y col., Eur. J. Immunol., 2001, 31, 1837-1846, para las moléculas HLA-DR, y en la Solicitud Internacional PCT WO 03/040299 y Castelli y col., J. Immunol., 2002, 169, 6928-6934, para la molécula HLA-DP4. La realización de estos ensayos para medir la actividad de unión de péptidos derivados de diferentes antígenos, se ilustra en la Patente Americana US 6.649.166. y las Solicitudes Internacionales PCT WO 02/090382, 03/040299 y WO 2004/014936.

De manera más precisa, los péptidos: HA 306-318 (PKYVKQNTLKLAT, SEC ID Nº 29), A3 152-166 (EAEQ LRAYLDGTGVE, SEC ID Nº 30), MT 2-16 (AKTIAYDEEARRGLE, SEC ID Nº 31), B1 21-36 (TERVRLVTRHIYNREE, SEC ID Nº 32) YKL (AAYAAAKAAALAA, SEC ID Nº 33), LOL 191-210 (ESWGAVWRIDTPDKLTGPFT, SEC ID Nº 34), E2/E168 (AGDLLAIETDKATI, SEC ID Nº 35) y Oxi 271-287 (EKKYFAATQFEPLAARL, SEC ID Nº 36), biotinilados a nivel del resto del extremo NH₂, según el protocolo descrito en Texier y col., J. Immunol., 2000, 164, 3177-3184, se utilizan como marcador en condiciones tales como se precisan en la Tabla siguiente.

TABLA III: Condiciones del ensayo de unión a las moléculas HLA II

Alelos	Dilución de HLA II	Marcadores	Concentración del marcador (nM)	pH óptimo	Tiempo de incubación (h)	CI ₅₀ (nM)
DRB1*0101	1/200	HA 306-318	1	6	24	5,5
DRB1*0301	1/40	MT 2-16	200	4,5	72	450
DRB1*0401	1/80	HA306-318	30	6	24	50
DRB1*0701	1/60	YKL	10	5	24	15
DRB1*1101	1/80	HA 306-318	10	5	24	25
DRB1*1301	1/40	B1 21-36	100	4,5	72	800
DRB1*1501	1/100	A3152-166	30	4,5	72	52
DRB5*0101	1/80	HA 306-318	10	5,5	24	8
DRB3*0101	1/40	Lol 191-120	10	5,5	24	14
DRB4*0101	1/20	E2/E168	10	5	72	15
DBP1*0401	1/80	Oxi 271-287	1	5	24	10
DPB1*0402	1/40	Oxi 271-287	1	5	24	6,5

Los resultados se expresan bajo la forma de concentración (nM) de péptido competidor que inhibe el 50% de la unión máxima del péptido marcador biotinilado (CI₅₀). La sensibilidad de cada ensayo se refleja por las CI₅₀ observadas con los péptidos no biotinilados que corresponden con los marcadores; las IC₅₀ de los marcadores varían en un factor inferior a tres. Un péptido que presente una actividad de unión (CI₅₀) a una molécula HLA II inferior a 1000 nM, posee una buena afinidad para esta molécula HLA II, un péptido, que presente una actividad de unión (CI₅₀) a una molécula HLA II, inferior a 100 nM, posee una fuerte afinidad para esta molécula HLA II.

2) Resultados

Tres regiones distintas son capaces de unirse con una buena afinidad (IC₅₀ < 1000 nM) a al menos tres moléculas HLA II preponderantes, principalmente en la población caucásica; las regiones 17-34 (extremo N), 84-113 y 122-142 (extremo C), (Tabla IV).

Tabla IV.: Actividades de unión de los péptidos de la survivina frente a 12 moléculas HLA II preponderantes^c (CI₅₀ en nM)

péptidos	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5	DP401	DP402	n° de moléculas fijadas
Referencia**	2	346	33	16	10	609	41	16	24	8	15	25	
1-15	10800	>100000	>100000	>100000	63	>100000	80000	>100000	>100000	8000	9200	6928	1
4-18	45000	>100000	>100000	>100000	33	40000	>100000	>100000	>100000	5477	8998	3594	1
8-22	6573	16000	46000	9391	41	2314	5200	8718	29000	2191	21000	10450	1
11-25	6000	65000	45000	8000	329	2408	22	3674	75000	2258	33000	25000	2
17-31	19	>100000	9200	18	247	735	3	>100000	7500	302	40	29	8
19-33	10	>100000	615	748	147	9500	81	>100000	3118	3779	32	24	7
20-34	11	>100000	5200	20000	210	2449	1304	>100000	5500	6500	210	114	4
23-37	71	>100000	5200	60000	37000	>100000	>100000	>100000	>100000	3421	>100000	3700	1
36-50	2550	>100000	17000	17000	5586	>100000	>100000	>100000	49000	3795	3622	3169	0
41-55	2315	>100000	5000	3735	1148	>100000	7000	10000	328	3382	>100000	>100000	1
52-66	4100	11832	22000	6673	92	23000	2245	12649	>100000	5348	>100000	4583	1
56-70	1597	>100000	>100000	13000	363	>100000	3000	12000	>100000	20000	>100000	>100000	1
59-73	3759	>100000	58000	9000	1844	>100000	8000	>100000	>100000	45000	>100000	>100000	0
62-76	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	65000	29000	>100000	>100000	>100000	>100000	0
65-79	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	>100000	0
72-86	95000	>100000	>100000	>100000	>100000	11000	>100000	>100000	>100000	6200	>100000	>100000	0
84-98	2828	2569	19000	179	10	846	574	11832	1327	1766	167	113	6
87-101	150	>100000	6450	705	2062	>100000	4796	6797	9798	6000	3666	6387	2
90-104	40	>100000	748	140	2349	>100000	7500	48000	>100000	280	48	19	6
91-105	12	>100000	1587	56	2353	>100000	3162	30000	>100000	145	11	12	5
93-107	128	>100000	5500	2793	548	7800	612	45000	>100000	529	20	67	6
94-108	n.d*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
96-110	18	5477	1666	5639	7	302	490	>100000	3600	103	2915	620	6
99-113	48	4673	2134	6462	40	9165	1200	>100000	22000	22	40000	>100000	3
102-116	7746	>100000	>100000	50000	8944	>100000	>100000	>100000	>100000	18	>100000	>100000	1
111-125	5000	>100000	>100000	>100000	30000	70000	90000	>100000	70000	16	>100000	>100000	1
122-136	5657	5809	>100000	20000	310	995	1200	>100000	>100000	447	>100000	>100000	3
128-142	6	12000	352	1342	25	>100000	284	>100000	1803	1090	13000	20000	4

^c Los valores son el resultado de 3 experimentos independientes; no varían más de un factor 3 entre los experimentos.

* no determinado (péptido insoluble)

** actividad de unión del marcador

Por el contrario, los péptidos derivados del resto de la secuencia no presentan actividad de unión significativa para al menos tres moléculas HLA II preponderantes en la población caucásica. Además, no se unió ningún péptido a las moléculas DR3 y DRB3.

5 Ciertos péptidos son específicos de un alelo como los péptidos 1-15, 4-18 y 52-66 que se unen solamente a la molécula HLA-DR11 y el péptido 41-55 que se une solamente a la moléculas HLA-DRB4.

Los péptidos de la región del extremo N tienen una buena afinidad por las moléculas HLA-DR1, DR7, DR11, DR13, DR15, DRB5, DP401 y DP402.

10 En la región 84-113, las capacidades de unión de los cuatro péptidos que se solapan 84-98, 90-104, 93-107 y 96-110 que cubren las moléculas HLA-DR1, DR4, DR7, DR11, DR13, DR15, DRB5, DP401 y DP402. El péptido 91-105 presenta una fuerte afinidad para las moléculas DR1, DR7, DRB5, DP401 y DP402.

En la región del extremo C, el péptido 128-142 se une con una fuerte afinidad a las moléculas DR1 y DR11 y una afinidad media por las moléculas HLA-DR4 y HLA-DR15.

15 Siete péptidos presentan una buena afinidad para al menos cuatro moléculas HLA II preponderantes en la población caucásica seleccionadas de entre HLA -DR1, -DR4, -DR7, -DR11, -DR15, DRB5, DP401 y DP402, se han elegido por los ensayos de inmunogenicidad: 17-31, 20-34, 84-98, 90-104, 93-107, 96-110 y 128-142.

Ejemplo 2: Inmunogenicidad de los péptidos de la survivina *in vitro*

20 La capacidad de los péptidos que tienen una buena afinidad por las moléculas HLA-II preponderantes en la población caucásica, que inducen una estimulación *in vitro* de linfocitos T específicos, se evaluó a partir de extracciones sanguíneas de individuos sanos (no portadores de tumor). Se trata de evaluar la capacidad de reclutar linfocitos precursores CD4+ que están en un individuo sano con una frecuencia muy débil, es decir de efectuar una inmunización *in vitro* por medio de estos péptidos.

1) Materiales y procedimientos

a) Individuos ensayados

25 Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de siete donantes sanas se separaron en un gradiente de Ficoll (Ficoll-Hyperpaque, SIGMA-ALDRICH) después se determinó el genotipo HLA-DR Y HLA-DP de los donantes por SSP, con la ayuda del kit OLERUP SSP™ HLA-DPB1 y HLA-DRB1 (OLERUP SSP AB). Los alelos HLA-DRB1 de estos individuos se presenta en la Tabla V.

Tabla V: Tipado HLA de individuos ensayados

Donante sano	DRB1	segunda molécula DR			DPB1
D169	DRB1*1502				DPB1*0402
D171	DRB1*0101	DRB1*0401	DRB4		DPB1*0401
D174	DRB1*0704	DRB1*1501	DRB4	DRB5	DPB1*0401
D179	DRB1*0701	DRB1*1301	DRB4	DRB3	
D187	DRB1*0701	DRB1*0401	DRB4		
D188	DRB1*1101		DRB3		DPB1*0401
D180	DRB1*0101	DRB1*1101			DPB1*0401

30 b) Obtención de líneas de linfocitos T CD4+ específicos de la survivina y limitados a las moléculas HLA II preponderantes

35 Se separaron las células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) en un gradiente de Ficoll (Ficoll- Hyperpaque, SIGMA-ALDRICH). Las PBMC se pusieron enseguida en cultivos en medio AIM V (LIFE TECHNOLOGIES; 107 células /ml) y se incubaron en matraces, en la estufa a 37 °C en presencia de un 5% de CO₂. Tras una noche de incubación, las células no adherentes se recuperaron, después se purificaron los linfocitos T CD4+ con la ayuda de anticuerpos anti-CD acoplados a perlas magnéticas (kit MYLTENYI BIOTECH), se separaron por citometría de flujo (MACS) según las recomendaciones del fabricante (MYLTENYI BIOTECH), y se congelaron. Las células adherentes se incubaron durante 5 a 6 días, en un medio AIM V que contenía 1000 U/ml de GM-CSF y 1000 U/ml de IL-4

humanas recombinantes (rh-GM-CSF y rh-IL-4; TEBU), después las células diferenciadas en células dendríticas (células dendríticas inmaduras) se cultivaron a continuación durante 2 días, en presencia de 1 µg/ml de LPS (SIGMA), 1000 U/ml de rhIL-4 y 1000 U/ml de rh-GM-CSF, de manera que se induce su maduración.

La calidad de las preparaciones de células dendríticas se evaluó por citometría de flujo (FACScalibur flow cytometer™, BECTON DICKINSON) asistido por el programa Cell Quest Pro™ (BECTON DICKINSON). Para llevarlo a cabo, las células dendríticas se marcan con anticuerpos anti-CD14, -CD86, -HLA-DR, -CD80 (BECTON DICKINSON), -Cd1a, -HLA-ABC, -CD83 y -CD16 (BECKMAN COULTER), conjugados con un fluorocromo.

Las células dendríticas maduras (CD; $5 \cdot 10^5$ células en 1 ml) obtenidas de esta manera se incubaron con una mezcla de péptidos (10 µg de cada péptido en un medio IMDM (INVITROGEN) suplementado con glutamina (24 mM, SIGMA), asparagina (55 mM, SIGMA), arginina (150 mM, SIGMA), penicilina (50 UI/ml, INVITROGEN), estreptomycin (50 mg/ml, INVITROGEN) y un 10% de suero humano, que se denominará de aquí en adelante medio IMDM completo, durante 4 horas a 37 °C. Las células dendríticas maduras se lavan a continuación y se incuban después en presencia de linfocitos T CD4+ autólogos descongelados previamente (10^4 CD y 10^5 T CD4+), en 200 µl de medio IMDM completo que contiene 1000 U/ml de IL-6 (R&D systems) y 10 ng/ml de IL-12 (R&D systems). Después de 7 días (D7), se estimula el cultivo una primera vez, por medio de células dendríticas maduras previamente descongeladas y cargadas con la mezcla de péptidos, en el medio que contiene la IL-2 (10 U/ml) e IL-7 (5 ng/ml). Tras dos estimulaciones suplementarias (D14 y D21) por medio de células dendríticas cargadas, en las mismas condiciones, se analizó la especificidad de las células por los péptidos los días 28 y 29, midiendo la producción de IFN-γ en el ELISPOT.

20 c) Obtención de líneas de linfocitos T CD4+ específicos de la survivina y limitados a HLA-DP4

Se produjeron líneas de linfocitos T CD4+ específicos de la survivina y limitados a HLA-DP4 utilizando la mezcla de péptidos 84-98, 93-107, 90-104 y 19-33 por estimulación de células dendríticas autólogas según un protocolo similar al utilizado para la producción de líneas de linfocitos T limitados al conjunto de moléculas HLA-DR preponderantes en la población caucásica.

25 d) Análisis de la especificidad de las líneas en ELISPOT

El anticuerpo monoclonal humano anti IFN-γ 1-D1K (MABTECH), diluido a 10 µg/ml en un tampón PBS se adsorbió en placas de nitrocelulosa (Multiscreen HA ; MILLIPORE) durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron a continuación con PBS y luego se saturaron con medio IMDM completo (100 µl/pocillo), durante 1 h a 37 °C. Las células presentadoras de antígeno son PBMC autólogas, células dendríticas autólogas inmaduras preparadas como se ha precisado anteriormente o una línea de fibroblastos de ratón (línea L), transfectada con el ADNc que codifica una de las moléculas HLA-DR o HLA-DP4 a ensayar (Yu y col. Hum. Immunol., 1990, 27, 132-135), de manera para especificar la especificidad de las líneas frente a moléculas HLA-DR y HLA-DP4. Las células presentadoras de antígeno (10^5 PBMC autólogos, $3 \cdot 10^4$ células-L transfectadas o $2 \cdot 10^4$ células dendríticas autólogas inmaduras) y los linfocitos T CD4+ a ensayar (10^4 linfocitos T CD4+) se añadieron a las placas a continuación en las placas y se incubaron 24 h a 37 °C, en presencia o ausencia de un solo péptido (2 µg) de una mezcla de péptidos (2 µg de cada péptido) o de una proteína (Bir5 o Nef). Las proteínas (1 µM) se incubaron 4 h a 37 °C en presencia de células dendríticas inmaduras, después se lavaron. Los péptidos se añadieron directamente a las placas. Para los análisis de dosis respuesta, los péptidos se utilizaron a diferentes concentraciones variando de 10^{-5} a 10^{-10} M. Tras tres lavados consecutivos con agua, y después con tampón PBS Tween 0,05%, y finalmente con PBS solo, se añadieron a los pocillos 100 µl de anticuerpo secundario anti-IFN-γ conjugado con biotina (7-B6-1-biotina, MABTECH), diluido a 0,25 µg/ml en PBS que contiene un 1% de BSA. Tras una hora de incubación, las placas se lavan de nuevo y se incuban con 100 µl/pocillo de extravidina-fosfatasa (E-2636, SIGMA) diluida a 1/600. Tras el lavado de las placas en tampón PBS, se distribuyeron en cada pocillo 100 µl de sustrato NBT/BCIP (B-5655, SIGMA) disuelto en agua (1 comprimido en 10 ml de agua). La revelación inmunoenzimática se detuvo tras 10 minutos aproximadamente, aclarando extensivamente las placas con agua, y se contaron las manchas coloreadas con la ayuda de un lector automático (Elispot Reader System, AID). Las líneas se consideraron positivas cuando el número de manchas era superior en tres veces al obtenido con el control negativo (control sin péptidos) con un mínimo de 50 manchas. El control sin células presentadoras permite verificar la especificidad de la respuesta para HLA-DR o HLA-DP4 (control de restricción).

50 **2) Resultados**

a) Líneas específicas del conjunto de moléculas HLA II preponderantes

Se obtuvieron 98 líneas de linfocitos T CD4+ específicos de la survivina a partir de siete donantes sanos (Tabla VI). La especificidad de las líneas por los péptidos de la survivina se analizaron por ELISPOT IFN-γ, utilizando las PBMC autólogas como células presentadoras de antígeno.

55

Tabla VI: Resumen de la especificidad de las líneas de linfocitos T

Individuo	Nº de líneas de linfocitos T						
	péptido						
	17-31	20-34	84-98	90-104	93-107	96-110	128-142
D169	0	0	0	1	1	12	0
D171	2	1	3	3	0	0	7
D174	10	0	0	3	2	1	1
D179	1	0	2	2	0	2	4
D187	4	6	0	1	0	2	1
D188	1	2	3	7	3	1	0
D180	0	0	3	2	2	1	1
total	18	9	11	19	8	19	14
Frecuencia de respuestas	5/7	3/7	4/7	7/7	4/7	6/7	5/7

La figura 1 muestra los resultados obtenidos con 12 líneas de linfocitos T CD4+ derivados de los donantes sanos 171 y 174. Estas líneas se estimulan por la mezcla de péptidos presentados por las células dendríticas autólogas pero no en ausencia de la mezcla. Entre los 60 pocillos sembrados para cada donante, se obtuvieron 12 y 13 líneas de linfocitos T específicos del péptido, respectivamente para el donante 171 y el donante 174, sugiriendo que estas líneas derivan de algunos precursores de linfocitos T que se han amplificado por las estimulaciones semanales con los péptidos. DE hecho, las líneas de linfocitos T generalmente son específicos de un solo péptido o de dos péptidos solapados lo que sugiere que son específicos de la región común de dos péptidos (figura 1). Todos los péptidos inducen al menos una línea (Tabla IV y figura 1).

Los siete donantes cubren los haplotipos HLA-DR preponderantes en la población (Tabla VI), a saber: HLA-DR1, -DR4, -DR7, -DR13 y -DR15 y la segunda molécula DR correspondiente (DRB3, DRB4 y DRB5). Entre las moléculas HLA-DR preponderantes en la población caucásica, solo está ausente la molécula HLA-DR3. Cinco donantes poseían una molécula HLA-DP4, de acuerdo con la frecuencia de estas moléculas en la población caucásica. La mezcla de péptidos inducía líneas de linfocitos T CD4+ específicos de cada donante, aunque el muestreo del donante se había elegido para incluir múltiples haplotipos HLA II. El péptido 17-31 induce 18 líneas de linfocitos T, el péptido 20-34, 9 líneas, el péptido 84-98, 11 líneas, el péptido 90-104, 19 líneas. el péptido 93-107, 9 líneas, el péptido 96-110, 19 líneas y el péptido 128-142, 14 líneas. El péptido 90-104 es inmunogénico en todos los donantes y los péptidos 17-31, 96-110 y 128-142 inducían líneas de linfocitos T en cinco o seis de los siete donantes.

Los elementos de restricción de las moléculas HLA II responsables de la estimulación específica de linfocitos T CD4+ por los péptidos se evaluó para 19 líneas diferentes de linfocitos T CD4+ por ELISPOT IFN- γ , en presencia de células-L transfectadas por una de las moléculas HLA-DR o por la molécula HLA-DP4, o en ausencia de células presentadoras. Las líneas se inducen específicamente por la presentación del péptido por las células presentadoras de antígeno, dado que no se detecta ninguna producción de IFN- γ en ausencia del péptido (Figura 2) y que se observó una estimulación modesta en ausencia de células presentadoras.

La figura 2 ilustra los resultados obtenidos por 12 de las líneas ensayadas. La mayoría de las líneas de linfocitos T se estimulan por su péptido presentado por una sola molécula HLA II. Sin embargo se observó una degeneración del reconocimiento, por ejemplo por las líneas 174.31 y 187.34. La estimulación no se produce por presentación de péptidos por los linfocitos T vecinos activados, en cuanto a que solo se observó una modesta estimulación en ausencia de células-L. Estos resultados muestran que DR7, DR15, DP4 y DRB4 son elementos de restricción para el péptido 93-107, DR4, DR7 y DRB4 para el péptido 96-110 y DR15 para el péptido 128-142.

También se analizó la capacidad de siete líneas de linfocitos T específicos del péptido derivados de dos donantes diferentes de reconocer la proteína nativa. Los resultados presentes en la figura 3 son representativos de estos experimentos. Las dos líneas de linfocitos T (187.54 y 187.34) específicos de los péptidos 17-31 y 20-34 reconoce específicamente las células dendríticas autólogas, cargadas previamente con la survivina recombinante. Estos no se estimulan en presencia de células dendríticas no cargada o cargadas por la proteína Nef del VIH. Igualmente, las líneas de linfocitos T 188.19 y 188.57 se estimulan por los péptidos 90-104 y 93-107, solos o mezclados, y reconocen específicamente la proteína survivina.

Finalmente, se evaluó la sensibilidad del reconocimiento del péptido por los linfocitos T, en presencia de cantidades decrecientes de péptido (Figura 4). Aparte del péptido 93-107, todos los péptidos estimulan los linfocitos T y se

reconocen de forma eficaz por las líneas de linfocitos R específicos del péptido, y unas concentraciones inferiores de 10^{-6} M. El péptido 17-31 es particularmente eficaz ya que es capaz de estimular los linfocitos T CD4+ autólogos a una concentración muy débil (10^{-10} M).

b) Líneas específicas de HLA-DP4

- 5 Se pusieron en evidencia 4 líneas específicas de un péptido de la survivina y limitadas a HLA-DP4; estas líneas se estimulan por la mezcla de péptidos presentada por HLA-DP4 pero no en ausencia de la mezcla (control negativo) o HLA-DP4 (control sin APC, Tabla VII).

Tabla VII: Inmunogenicidad de los péptidos en un contexto HLA-DP4

donante	líneas	Número de manchas						
		Control negativo	mezcla de péptidos	84-98	93-107	90-104	19-33	sin APC
169				4(±2)	3(±1)			
	169-14		210(±11)			182(±21)	1(±0)	56(±21)
	169-34	2(±0)	4(±4)	255(±18)	3(±3)	2(±2)	4(±2)	228(v17)
	169-56	3(±1)	7(±1)	199(±24)	2(±2)	2(±2)	2(±1)	195(±0)
	171-3		103(±18)					104(±30)
171				5(±4)	145(±4)	62(±33)	5(±0)	1(±1)

- 10 Cada línea responde a uno de los péptidos de la mezcla. De los cuatro péptidos de la mezcla, tres son inmunogénicos en un contexto HLA-DP4 (péptidos 93-107, 90-104 y 19-33).

Como se desprende de lo anterior, la invención no se limita de ninguna manera a los modos de llevar a cabo, de realizar y de aplicar la invención que se acaban de describir de manera más explícita.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Commissariat à l'Energie Atomique
WANG XiaoFei
MUNIER Gaetan
MORATILLE Sandra
20 NUYTTEENS Hélène
MAILLERE Bernard
- <120> Epítotos T CD4+ de la Survivina y sus aplicaciones
- 25 <130> F263PCT145
- <160> 41
- 30 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- 35 <400> 1

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

- 40 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- 45 <400> 2

ES 2 510 493 T3

	Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg	1 5 10 15
5	<210> 3 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 3	
10	Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe	1 5 10 15
15	<210> 4 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 4	
20	Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp	1 5 10 15
25	<210> 5 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 5	
30	His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys	1 5 10 15
35	<210> 6 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 6	
40	Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala Cys	1 5 10 15
45	<210> 7 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 7	
50	Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala Cys Thr	1 5 10 15
	<210> 8 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 8	

ES 2 510 493 T3

	Lys	Asn	Trp	Pro	Phe	Leu	Glu	Gly	Cys	Ala	Cys	Thr	Pro	Glu	Arg
	1				5					10					15
5	<210> 9 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 9														
10	Glu	Arg	Met	Ala	Glu	Ala	Gly	Phe	Ile	His	Cys	Pro	Thr	Glu	Asn
	1				5					10					15
15	<210> 10 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 10														
20	Ala	Gly	Phe	Ile	His	Cys	Pro	Thr	Glu	Asn	Glu	Pro	Asp	Leu	Ala
	1				5					10					15
25	<210> 11 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 11														
30	Pro	Asp	Leu	Ala	Gln	Cys	Phe	Phe	Cys	Phe	Lys	Glu	Leu	Glu	Gly
	1				5					10					15
35	<210> 12 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 12														
40	Gln	Cys	Phe	Phe	Cys	Phe	Lys	Glu	Leu	Glu	Gly	Trp	Glu	Pro	Asp
	1				5					10					15
45	<210> 13 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 13														
50	Phe	Cys	Phe	Lys	Glu	Leu	Glu	Gly	Trp	Glu	Pro	Asp	Asp	Asp	Pro
	1				5					10					15
55	<210> 14 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 14														
	Lys	Glu	Leu	Glu	Gly	Trp	Glu	Pro	Asp	Asp	Asp	Pro	Ile	Glu	Glu
	1				5					10					15

ES 2 510 493 T3

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 15

 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys
 1 5 10 15
 10
 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

 <400> 16

 Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His Ser Ser Gly Cys Ala Phe
 1 5 10 15
 20
 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 17

 Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 30
 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 18

 Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
 1 5 10 15
 40
 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 19

 Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
 1 5 10 15
 45
 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*

 <400> 20

 Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp
 1 5 10 15
 55
 <210> 21

ES 2 510 493 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 21
 Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu
 1 5 10 15
 10 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 22
 Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg
 1 5 10 15
 20 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23
 Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys
 1 5 10 15
 25 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 24
 Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile
 1 5 10 15
 35 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 25
 Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile Ala Lys Glu
 1 5 10 15
 45 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 26
 Asn Lys Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu
 1 5 10 15
 55 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 510 493 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

5 Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

Ala Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
1 5 10 15

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213>SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>

<223> HA 306-318

<400> 29

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

$\langle 210 \rangle$ 30

<211> 15

30 <212> PRT

<213> secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> A3 152-166

35

<400> 30

Glu Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Asp Gly Thr Gly Val Glu
1 5 10 15

40 <210> 31

$\langle 211 \rangle$ 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> MT 2-16

<400> 31

Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu
1 5 10 15

<210> 32

 $\langle 211 \rangle$ 16

<212> PRT

55 <213> secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

ES 2 510 493 T3

<223> B1 21-36

<400> 32

Thr Glu Arg Val Arg Leu Val Thr Arg His Ile Tyr Asn Arg Glu Glu
1 5 10 15

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> YKL

15 <400> 33

Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 34

20 <211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

25 <223> LOL 191-210

<400> 34

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

Gly Pro Phe Thr
20

30

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

<213> secuencia artificial

35

 $\langle 220 \rangle$

<223> E2/E168

<400> 35

40

Ala Gly Asp Leu Leu Ala Ile Glu Thr Asp Lys Ala Thr Ile
1 5 10

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> oxi 271-287

50

<400> 36

	Glu	Lys	Lys	Tyr	Phe	Ala	Ala	Thr	Gln	Phe	Glu	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg
	1				5					10					15	
	Leu															
5	<210> 37 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 37															
10					Leu	Thr	Leu	Gly	Glu	Phe	Leu	Lys	Leu			
					1				5							
15	<210> 38 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 38															
20					Glu	Leu	Thr	Leu	Gly	Glu	Phe	Leu	Lys	Leu		
					1				5					10		
25	<210> 39 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 39															
30					Ala	Tyr	Ala	Cys	Asn	Thr	Ser	Thr	Leu			
					1				5							
35	<210> 40 <211> 24 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 40															
	Ile	Gly	Pro	Gly	Thr	Val	Ala	Tyr	Ala	Cys	Asn	Thr	Ser	Thr	Leu	Gly
	1				5					10					15	
	Gly Arg Gly Gly Arg Ile Thr Arg 20															
40	<210> 41 <211> 11 <212> PRT <213> secuencia artificial <220> <223> PADRE															
45	<220> <221> misc_feature <222> (2)..(2) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural															
50	<400> 41 Lys xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala 1 5 10															

REIVINDICACIONES

1. Un péptido derivado de la isoforma alfa de la survivina para su utilización como antígenos en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer, estando el péptido seleccionado de entre el grupo constituido por:

- 5 a) los péptidos de 13 a 18 aminoácidos consecutivos situados entre las posiciones 17 y 34 de la isoforma alfa de la survivina,
 b) los péptidos de 13 a 30 aminoácidos consecutivos situados entre las posiciones 84 y 113 de la isoforma alfa de la survivina, y
 c) los péptidos de 13 a 21 aminoácidos consecutivos situados entre las posiciones 122 y 142 de la isoforma alfa de la survivina,

- 10 cuyos péptidos a), b) y c) se unen con una actividad de unión inferior a 1000 nM a al menos 4 moléculas HLA-II preponderantes en la población caucásica seleccionados de entre el grupo constituido por las moléculas HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR7, HLA-DR11, HLA-DR13, HLA-DR15, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLADRB5 y HLA-DP4 codificados respectivamente por los alelos HLA DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301, DRB1*1501, DRB3*0101, DRB4*0101, DRB5*0101, DP*0401 y DP*0402, la actividad de unión
 15 correspondiente al dicho péptido que inhibe el 50% de la unión máxima de un marcador biotinilado en una molécula HLA II/péptido de ensayo de competición, realizado en condiciones tales como las que se precisan en la Tabla dada a continuación para cada alelo HLA II:

Alelos	Marcadores (SEC ID N°)	Concentración del marcador (nM)	pH óptimo	Tiempo de incubación (h)
DRB1*0101	29	1	6	24
DRB1*0301	31	200	4,5	72
DRB1*0401	29	30	6	24
DRB1*0701	33	10	5	24
DRB1*1101	29	10	5	24
DRB1*1301	32	100	4,5	72
DRB1*1501	30	30	4,5	72
DRB5*0101	29	10	5,5	24
DRB3*0101	34	10	5,5	24
DRB4*0101	35	10	5	72
DBP1*0401	36	1	5	24
DPB1*0402	36	1	5	24

cuyos péptidos a), b) y c) son capaces de inducir a los linfocitos T CD4+ específicos de la survivina.

- 20 2. Péptido para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer según la reivindicación 1, **que se caracteriza porque** dicho péptido es apto para ser presentado por al menos una molécula HLA-DP401 o HLA-DP402.

- 25 3. Péptido para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer según la reivindicación 1 o 2, **que se caracteriza porque** es seleccionado de entre el grupo constituido por los péptidos: 17-31, 19-33, 20-34, 84-98, 90-104, 91-105, 93-107, 96-110 y 128-142.

4. Péptido para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer según la reivindicación 3, **que se caracteriza porque** dicho péptido es apto para ser presentado por una molécula HLA-DP401 o HLA-DP402 y **porque** es seleccionado de entre el grupo constituido por los péptidos: 17-31, 19-33, 20-34, 84-98, 90-104, 91-105, 93-107 y 96-110.

- 30 5. Péptido para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer según la reivindicación 3 o 4, **que se caracteriza porque** dicho péptido es seleccionado de entre el grupo constituido por las secuencias SEC ID N° 5, 6, 7, 17, 19, 20, 21, 23 y 28.

6. Péptido para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **que se caracteriza porque** dicho péptido presenta una secuencia de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos.
- 5 7. Péptido para su utilización como un antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer según las reivindicaciones 1 a 6, **que se caracteriza porque** dicho péptido está marcado o complejoado.
8. Péptido para su utilización como un antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer según la reivindicación 7, **que se caracteriza porque** dicho péptido está complejoado a una molécula HLA II marcada.
9. Fragmento poliepitópico que comprende la concatenación de al menos dos epítomos idénticos o diferentes en los que al menos uno es un epítomo T CD4+ de la survivina incluido en un péptido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer.
- 10 10. Fragmento poliepitópico para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer según la reivindicación 9, **que se caracteriza porque** dicho fragmento poliepitópico comprende la concatenación de al menos un epítomo T CD4+ de la survivina incluido en un péptido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y de al menos un epítomo T CD8+ de la survivina y/o un epítomo T CD4+ universal.
- 15 11. Fragmento poliepitópico para su utilización como antígeno según la reivindicación 10, **que se caracteriza porque** el epítomo T CD8+ es elegido de entre las secuencias SEC ID N° 37 a 30.
12. Proteína de fusión constituida por una proteína o un fragmento de proteína, fusionada a un péptido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un fragmento poliepitópico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer.
- 20 13. Proteína de fusión para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer según la reivindicación 12, **que se caracteriza porque** dicha proteína o dicho fragmento está seleccionado de entre el grupo constituido por una cadena alfa o beta de una molécula HLA II, correspondiendo un fragmento de dicha cadena a una moléculas HLA II soluble y una secuencia de dirección al endosoma.
- 25 14. Proteína de fusión para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer según la reivindicación 13, **que se caracteriza porque** dicha secuencia de dirección es derivada de la cadena invariante li o de la proteína LAMP-1.
15. Un lipopéptido obtenido por la adición de un lípido en un grupo funcional α .aminado o un grupo funcional reactivo de la cadena lateral de un péptido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o de un fragmento poliepitópico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para su utilización como antígeno en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer.
- 30 16. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un péptido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un fragmento poliepitópico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 o una proteína de fusión tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas, para su utilización en la vacunación profiláctica o terapéutica del cáncer.
- 35 17. Composición inmunogénica o vacunal, **que se caracteriza porque** comprende al menos un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, un fragmento poliepitópico según la reivindicación 10 u 11, una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, un lipopéptido según la reivindicación 15 o un vector según la reivindicación 16, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, una sustancia portadora o un adyuvante.
- 40 18. Composición inmunogénica o vacunal según la reivindicación 17, **que se caracteriza porque** comprende al menos un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un péptido que incluye un epítomo T CD8+ de la survivina, bajo la forma de una mezcla de péptidos, de un fragmento poliepitópico y/o de un vector de expresión que codifica dichos péptidos o dicho fragmento.
- 45 19. Composición inmunogénica o vacunal según la reivindicación 18, **que se caracteriza porque** dicho epítomo T CD8+ es elegida de entre las secuencias SEC ID N° 37 a 39.
20. Composición inmunogénica o vacunal según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, **que se caracteriza porque** comprende al menos dos péptidos diferentes tales como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, seleccionados de entre el grupo constituido por una de las combinaciones siguientes:
- el péptido 17-31 y al menos uno de los péptidos 19-33, 90-104 o 128-142,
- el péptido 19-33 y el péptido 96-110,
- el péptido 90-104 y el péptido 17-31,
- el péptido 96-110 y el péptido 90-104, y
- 50

- los péptidos 93-107 y 128-142, y al menos uno de los péptidos 17-31, 19-33, 96-110 o 90-104.

21. Composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, **que se caracteriza porque** comprende un epítipo T CD4+ universal.

5 22. Procedimiento de diagnóstico *in vitro*, de evaluación del pronóstico o de seguimiento del tratamiento de un cáncer en un individuo, **que se caracteriza porque** comprende:

- la puesta en contacto, *in vitro*, de una muestra biológica de dicho individuo con un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y
- la detección de linfocitos T CD4+ específicos de la survivina, por cualquier medio apropiado.

10 23. Procedimiento de selección de linfocitos T CD4+ específicos de la survivina, **que se caracteriza porque** comprende al menos las etapas siguientes:

- la puesta en contacto, *in vitro*, de una muestra celular con complejos multiméricos HLA II/péptido marcados, formados por la unión de moléculas HLA II solubles con al menos un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y
- la selección de las células unidas a dichos complejos HLA II/péptido.

15 24. Péptido, **que se caracteriza porque** se trata de un péptido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 con la exclusión del péptido situado entre las posiciones 89 a 101 de la isoforma alfa de la survivina.

20 25. Fragmento poliepitópico que comprende la concatenación de al menos dos epítomos idénticos o diferentes de los que al menos un epítipo T CD4+ de la survivina se incluye en un péptido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y al menos un epítipo T CD8+ de la survivina y/o un epítipo T CD4+ universal.

26. Proteína de fusión constituida por una proteína o un fragmento de proteína, fusionada con un péptido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un fragmento poliepitópico según la reivindicación 25.

25 27. Lipopéptido obtenido por la adición de un lípido a un grupo funcional α -aminado o un grupo funcional reactivo de la cadena lateral de un péptido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de un fragmento polipeptídico según la reivindicación 25.

28. Polinucleótido que codifica un péptido según la reivindicación 24, un fragmento poliepitópico según la reivindicación 25 o una proteína de fusión según la reivindicación 26.

29. Vector de expresión que comprende un polinucleótido según la reivindicación 28 bajo el control de secuencias reguladoras adecuadas, de la transcripción y eventualmente de la traducción.

30 30. Célula huésped modificada por un polinucleótido según la reivindicación 28 o un vector de expresión según la reivindicación 29.

31. Kit de diagnóstico de evaluación del pronóstico o de seguimiento del tratamiento del cáncer, **que se caracteriza porque** comprende un péptido según la reivindicación 24.

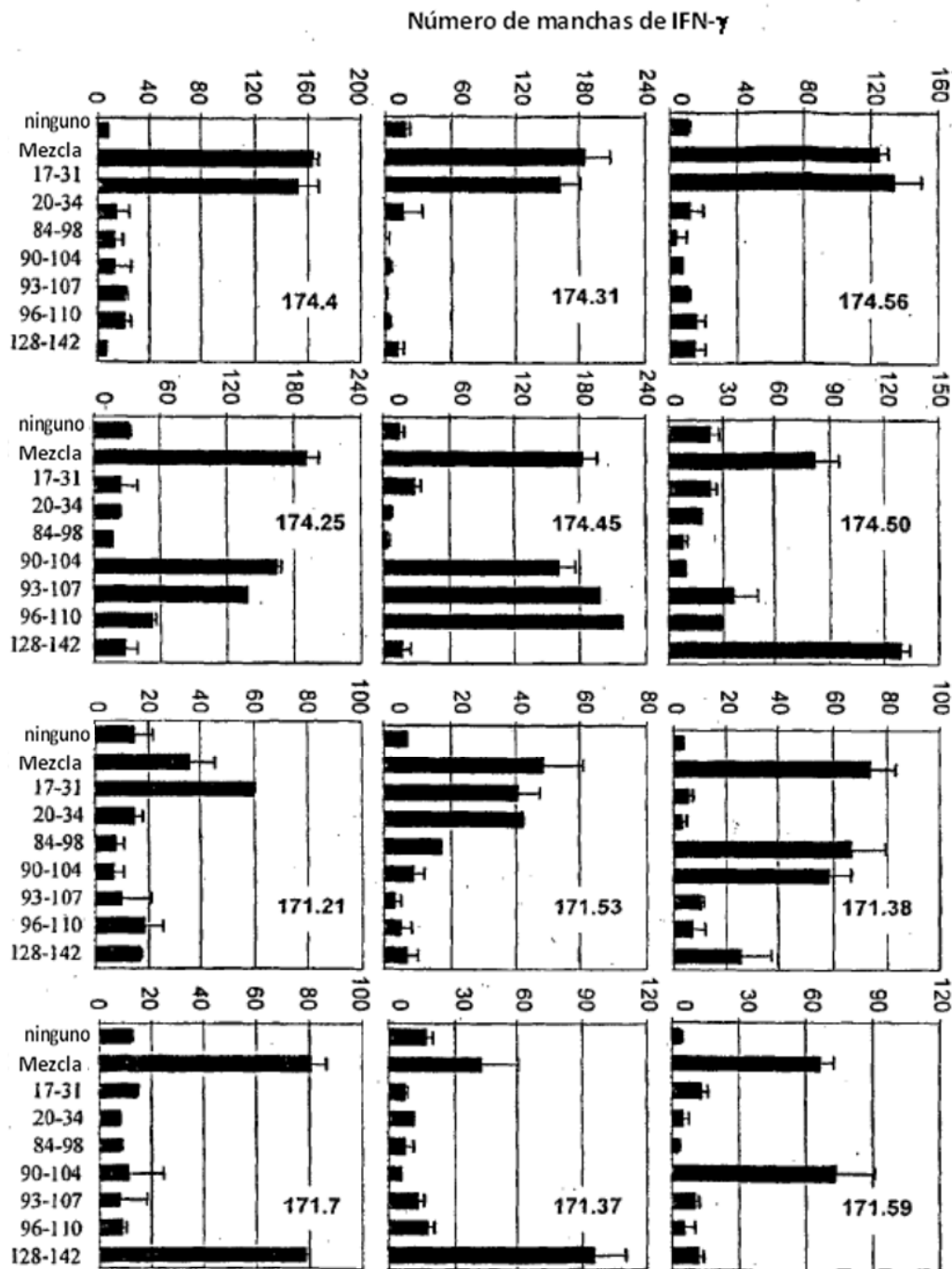


Figura 1

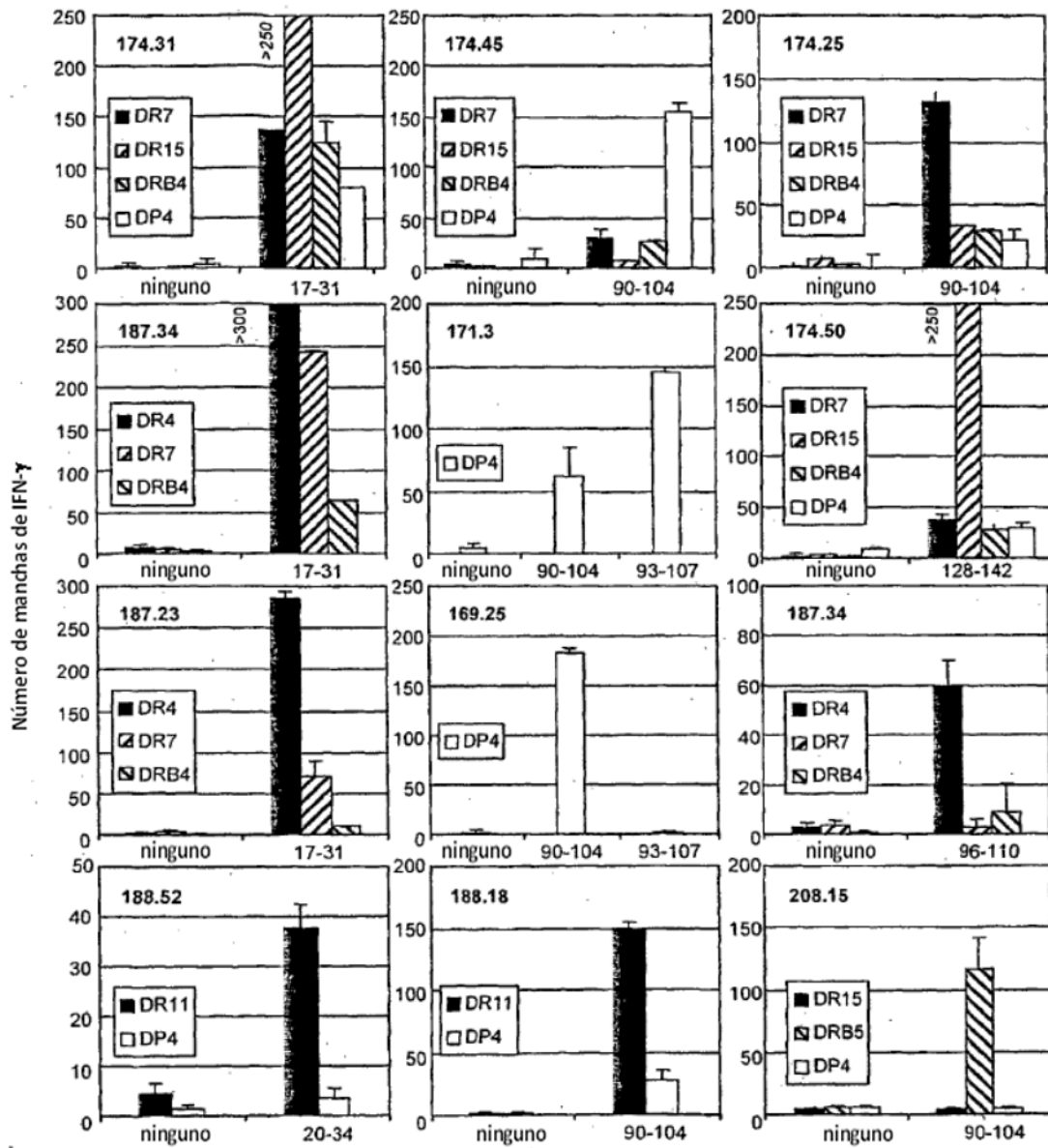


Figura 2

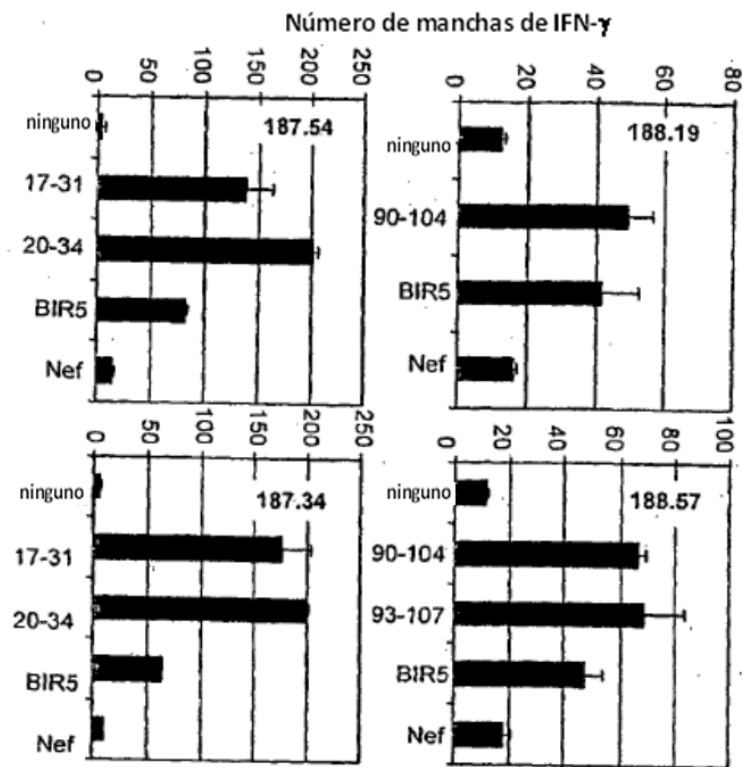


Figura 3

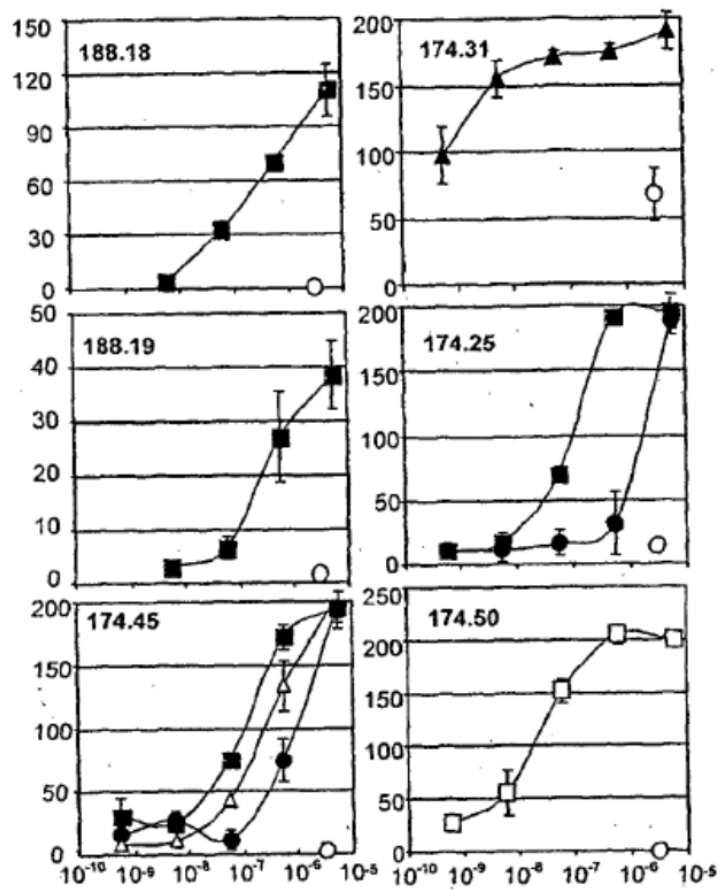


Figura 4