

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 896**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/0784 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2010 PCT/JP2010/001005**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2010 WO2010095428**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2010 E 10743558 (8)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2408912**

54 Título: **Péptidos de FOXM1 y vacunas que contienen los mismos**

30 Prioridad:

18.02.2009 US 153408 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2017

73 Titular/es:

**ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. (100.0%)
2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku
Kawasaki-sh, iKanagawa 213-0012, JP**

72 Inventor/es:

**TSUNODA, TAKUYA;
OHSAWA, RYUJI;
YOSHIMURA, SACHIKO y
WATANABE, TOMOHISA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 618 896 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos de FOXM1 y vacunas que contienen los mismos

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere al campo de la ciencia biológica, más específicamente al campo de la terapia del cáncer. En particular, la presente invención se refiere a nuevos péptidos que son extremadamente eficaces como vacunas para el cáncer y fármacos para tratar y prevenir tumores.

Técnica anterior

- 10 Se ha demostrado que CTL CD8+ reconocen péptidos epitópicos derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) sobre la molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I, y a continuación destruyen las células tumorales. Desde que se ha descubierto la familia de antígenos de melanoma (MAGE) como el primer ejemplo de TAA, se han descubierto muchos otros TAA a través de enfoques inmunológicos (BNRP 1: Boon T, Int J Cancer 8 mayo 1993, 54(2): 177-80; BNRP 2: Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1 marzo 1996, 183(3): 725-9), y algunos de los TAA están ahora en proceso de desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas.
- 15 La identificación de nuevos TAA, que inducen respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas, garantiza el desarrollo adicional de la aplicación clínica de una estrategia de vacunación peptídica en diversos tipos de cáncer (BNRP 3: Harris CC, J Natl Cancer Inst 16 oct. 1996, 88(20): 1442-55; BNRP 4: Butterfield LH y cols., Cancer Res 1 julio 1999, 59(13): 3134-42; BNRP 5: Vissers JL y cols., Cancer Res 1 nov. 1999, 59(21): 5554-9; BNRP 6: van der Burg SH y cols., J Immunol 1 mayo 1996, 156(9): 3308-14; BNRP 7: Tanaka F y cols., Cancer Res 20 15 oct. 1997, 57(20): 4465-8; BNRP 8: Fujie T y cols., Int J Cancer 18 enero 1999, 80(2): 169-72; BNRP 9: Kikuchi M y cols., Int J Cancer 5 mayo 1999, 81(3): 459-66; BNRP 10: Oiso M y cols., Int J Cancer 5 mayo 1999, 81(3): 387-94). Hasta ahora, se han presentado varios estudios clínicos que usan estos péptidos derivados de antígenos asociados a tumores.
- 25 Desgraciadamente, hasta ahora sólo se podía observar un bajo grado de respuesta objetiva en estos estudios de vacunas para el cáncer (BNRP 11: Belli F y cols., J Clin Oncol 15 oct. 2002, 20(20): 4169-80; BNRP 12: Coulie PG y cols., Immunol Rev oct. 2002, 188: 33-42; BNRP 13: Rosenberg SA y cols., Nat Med sep. 2004, 10(9): 909-15).
- 30 Un TAA favorable es indispensable para la proliferación y la supervivencia de células cancerosas, como una diana para la inmunoterapia, debido a que el uso de tales TAA puede minimizar el riesgo bien descrito de escape inmunitario de células cancerosas atribuible a la supresión, mutación o regulación a la baja de TAA como consecuencia de una selección inmunitaria conducida terapéuticamente .

Lista de citas

Bibliografía no relacionada con las patentes

- 35 [BNRP 1] Boon T, Int J Cancer 8 mayo 1993, 54(2): 177-80
- [BNRP 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1 marzo 1996, 183(3): 725-9
- [BNRP 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 16 oct 1996, 88(20): 1442-55
- [BNRP 4] Butterfield LH y cols., Cancer Res 1 julio 1999, 59(13): 3134-42
- [BNRP 5] Vissers JL y cols., Cancer Res 1 nov. 1999, 59(21): 5554-9
- 40 [BNRP 6] van der Burg SH y cols., J Immunol 1 mayo 1996, 156(9): 3308-14
- [BNRP 7] Tanaka F y cols., Cancer Res 15 oct. 1997, 57(20): 4465-8
- [BNRP 8] Fujie T y cols., Int J Cancer 18 enero 1999, 80(2): 169-72
- [BNRP 9] Kikuchi M y cols., Int J Cancer 5 mayo 1999, 81(3): 459-66

[BNRP 10] Oiso M y cols., Int J Cancer 5 mayo 1999, 81(3): 387-94)

[BNRP 11] Belli F y cols., J Clin Oncol 15 oct. 2002, 20(20): 4169-80

[BNRP 12] Coulie PG y cols., Immunol Rev oct. 2002, 188: 33-42

[BNRP 13] Rosenberg SA y cols., Nat Med sep. 2004, 10(9): 909-15).

5 Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de dianas de inmunoterapia adecuadas. Debido a que los TAA son percibidos generalmente para el sistema inmunitario como "auto" y por lo tanto a menudo no tienen inmunogenicidad, el descubrimiento de dianas apropiadas es de extrema importancia. Según se apunta anteriormente, FOXM1 (SEQ ID N°: 34 codificada por el gen del N° de Registro del GenBank NM_202002.1 (SEQ ID N°: 33)) se ha identificado como regulado al alza en tejidos de cánceres, tales como leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer pulmonar microcítico (SCLC), tumor de tejidos blandos y tumor testicular. Así, FOXM1 es una posible diana de inmunoterapia.

La presente invención se basa, al menos en parte, en la identificación de péptidos epitópicos específicos de FOXM1, que poseen la capacidad para inducir linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para FOXM1. Según se analiza con detalle posteriormente, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de un donante sano se estimularon usando posibles péptidos que se unen a HLA-A*2402 derivados de FOXM1. A continuación, se establecieron líneas de CTL con citotoxicidad específica contra células diana positivas a HLA-A24 impulsadas con cada uno de los posibles péptidos. Estos resultados demuestran que estos péptidos son péptidos epitópicos restringidos a HLA-A24 que pueden inducir respuestas inmunitarias potentes y específicas contra células que expresan FOXM1. Estos resultados demuestran que FOXM1 es fuertemente inmunogénico y los epitopos del mismo son dianas eficaces para la inmunoterapia de tumores.

Según esto, la presente invención proporciona péptidos de menos de 15 aminoácidos que se unen a antígeno HLA, que es FOXM1 (SEQ ID N°: 34) o fragmentos del mismo. Los presentes péptidos tienen capacidad de inducción de CTL. Se pueden usar para inducir CTL ex vivo o se pueden administrar a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres tales como AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular. Preferiblemente, los péptidos son nonapéptidos o decapéptidos y, más preferiblemente, consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31, muestran una fuerte capacidad de inducción de CTL.

La presente invención contempla péptidos modificados, que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31, en los que el segundo aminoácido desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 o 31 está sustituido por fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano y el aminoácido C-terminal de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 o 31 está sustituido por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina con la condición de que los péptidos modificados retengan la capacidad de inducción de CTL original.

Además, la presente invención proporciona polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de los péptidos de la presente invención. Estos polinucleótidos se pueden usar para inducir o preparar células que expresan antígeno (APC) con capacidad de inducción de CTL o se pueden administrar a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres así como los presentes péptidos.

Cuando se administran a un sujeto, los presentes péptidos se presentan sobre la superficie de las APC y a continuación inducen CTL que eligen como diana los péptidos respectivos. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar composiciones o sustancias que incluyan cualesquiera péptidos o polinucleótidos de la presente invención para inducir CTL. Por otra parte, se pueden usar composiciones o sustancias que incluyan cualesquiera de los péptidos o polinucleótidos para el tratamiento y/o para la profilaxis de cánceres, tales como AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular, y/o para prevenir la recidiva posoperatoria de los mismos. Así, otro objetivo más de la presente invención es proporcionar composiciones o sustancias farmacéuticas para el tratamiento y/o para la profilaxis de cánceres, y/o para prevenir la recidiva posoperatoria de los mismos, que incluyan cualesquiera de los

péptidos o polinucleótidos de la presente invención. En lugar o además de los presentes péptidos o polinucleótidos, las presentes composiciones o sustancias farmacéuticas pueden incluir, como los ingredientes activos, APC o exosomas que presentan cualquiera de los presentes péptidos.

5 Los péptidos o polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para inducir APC que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el presente péptido, por ejemplo, al poner en contacto APC derivadas de un sujeto con el presente péptido o introducir un polinucleótido que codifica el presente péptido en APC. Tales APC tienen una alta capacidad de inducción de CTL contra los péptidos diana y son útiles para la inmunoterapia del cáncer. Por lo tanto, otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para inducir APC con capacidad de inducción de CTL así como APC obtenidas mediante los métodos.

10 Un objetivo más de la presente invención es proporcionar un métodos para inducir CTL, que incluye la etapa de cocultivar células CD8+ con APC o exosomas que presentan un péptido de la presente invención sobre su superficie o la etapa de introducir un gen que incluye un polinucleótido que codifica una subunidad receptora de células T (TCR) que se une al presente péptido. Los CTL obtenibles mediante los presentes métodos también encuentran uso en el tratamiento y/o la prevención de cánceres, tales como AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular. Por lo tanto, otro objetivo de la presente invención es proporcionar CTL obtenibles mediante los presentes métodos.

15 Por otra parte, un objetivo más de la presente invención es proporcionar métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra cánceres, métodos que incluyen la etapa de administrar sustancias o composiciones que contienen FOXM1 o fragmentos del mismo, polinucleótidos que codifican FOXM1 los fragmentos del mismo, o exosomas o APC que presentan FOXM1 o los fragmentos del mismo.

20 La presente invención se puede aplicar a cualesquiera enfermedades relacionadas con la sobreexpresión de FOXM1 incluyendo el cáncer, tal como AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular.

25 Se ha de entender que tanto el sumario precedente de la presente invención como la siguiente descripción detallada son de realizaciones ejemplificadas, y no restrictivos de la presente invención u otras realizaciones alternativas de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

Diversos aspectos y aplicaciones de la presente invención se harán evidentes para el experto al considerar la breve descripción de las figuras y la descripción detallada de la presente invención y sus realizaciones preferidas que siguen.

40 [Fig. 1a-f]

La Fig. 1 representa las fotografías que muestran los resultados de un ensayo de ELISPOT de IFN- γ sobre CTL que eran inducidos con péptidos derivados de FOXM1. Los CTL en los números de pocillo n° 1, 4 y n° 7 estimulados con los péptidos de FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2) (a), n° 7 con FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID N°: 7) (b), n° 5 con FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID N°: 8) (c), n° 3 con FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID N°: 16) (d), n° 6 con FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID N°: 25) (e) y n° 4 con FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID N°: 30) (f) mostraban una potente producción de IFN- γ en comparación con el control, respectivamente.

[Fig. 1g-h]

Los CTL en los números de pocillo n° 4 con FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID N°: 31) (g) mostraban una potente producción de IFN- γ en comparación con el control, respectivamente. En contraste, como un caso típico de datos negativos, no se observó una producción de IFN- γ específica a partir de CTL estimulados con el péptido de FOXM1-A24-9-316 (SEQ ID N°: 1) contra células diana impulsadas con péptido (h). En las figuras, "+" indica la producción de IFN- γ contra células diana impulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN- γ contra células diana no impulsada con péptidos. El recuadro en el pocillo de estas fotografías indica que las células del correspondiente pocillo se expandían para establecer líneas de CTL.

[Fig. 2]

La Fig. 2 representa las gráficas lineales que muestran la producción de IFN- γ de las líneas de CTL estimuladas con los péptidos de FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2) (a), FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID N°: 16) (b), FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID N°: 25) (c) y FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID N°: 31) (d) detectada mediante un ensayo de ELISA de IFN- γ . Demuestra que las líneas de CTL establecidas mediante estimulación con cada péptido mostraban una potente producción de IFN- γ en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN- γ contra células diana impulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN- γ contra células diana no impulsadas con péptidos.

[Fig. 3]

La Fig. 3 muestra la producción de IFN- γ de los clones de CTL clones establecidos mediante dilución limitativa a partir de las líneas de CTL estimuladas con los péptidos de FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2) (a), FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID N°: 16) (b) y FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID N°: 31) (c). Demostraba que los clones de CTL establecidos mediante estimulación con cada péptido mostraban una potente producción de IFN- γ en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN- γ contra células diana impulsadas con cada péptido y "-" indica la producción de IFN- γ contra células diana no impulsadas con péptidos.

[Fig. 4]

La Fig. 4 representa los gráficos lineales que muestran actividad de CTL específica contra las células diana que expresan exógenamente FOXM1 y HLA-A*2402. Se prepararon como controles células COS7 transfectadas con HLA-A*2402 o la longitud completa del gen FOXM1. El clon de CTL establecido con el péptido de FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2) mostraba una actividad de CTL específica contra células COS7 transfectadas tanto con FOXM1 como con HLA-A*2402 (rombo negro). Por otra parte, no se detectaba una actividad de CTL específica significativa contra células diana que expresaban bien HLA-A*2402 (triángulo blanco) o bien FOXM1 (círculo blanco).

Descripción de realizaciones

Aunque se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o las pruebas de realizaciones de la presente invención, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen ahora. Sin embargo, antes de que se describan los presentes materiales y métodos, se ha de entender que la presente invención no está limitada a los tamaños, las conformaciones, las dimensiones, los materiales, las metodologías, los protocolos, etc. particulares descritos en la presente, ya que estos pueden variar según la experimentación y la optimización habituales.

I. Definiciones

Las palabras "un", "uno/a" y "el/la", según se usan en la presente, significan "al menos un" a menos que se indique específicamente otra cosa.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan intercambiabilmente en la presente y se refieren a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido son un residuo modificado, o un residuo no presente en la naturaleza, tal como un mimético químico artificial de un aminoácido presente en la naturaleza correspondiente, así como polímeros de aminoácidos presentes en la naturaleza.

El término "aminoácido", según se usa en la presente, se refiere a aminoácidos presentes en la naturaleza y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos presentes en la naturaleza. Los aminoácidos presentes en la naturaleza son los codificados por el código genético, así como los modificados después de la traducción en células (p. ej., hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina). La expresión "análogo de aminoácido" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica (un carbono α unido a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) que un aminoácido presente en la naturaleza pero tienen un grupo R modificado o esqueletos modificados (p. ej., homoserina, norleucina, metionina, sulfoxido, metioninametilulfonio). La expresión "mimético de aminoácido" se refiere a compuestos químicos que tienen diferentes estructuras pero funciones similares a los aminoácidos generales.

Los aminoácidos se pueden mencionar en la presente por sus símbolos de tres letras o los símbolos de una letra comúnmente conocidos recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

Los términos "gen", "polinucleótidos", "nucleótidos" y "ácidos nucleicos" se usan intercambiamente en la presente memoria y, a menos que se indique otra cosa específicamente, son similares a los aminoácidos mencionados por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

5 A menos que se defina otra cosa, el término "cáncer" se refiere a los cánceres que sobreexpresan el gen FOXM1, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular.

10 A menos que se defina otra cosa, los términos "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" se usan intercambiamente en la presente memoria y, a menos que se indique otra cosa específicamente, se refieren a un subgrupo de linfocitos T que son capaces de reconocer células extrañas (p. ej., células tumorales, células infectadas con virus) e inducir la muerte de tales células.

15 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los mismos significados que se entienden comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece la presente invención.

II. Péptidos

20 Para demostrar que los péptidos derivados de FOXM1 funcionan como antígenos reconocidos por CTL, se analizaron péptidos derivados de FOXM1 (SEQ ID N°: 34) para determinar si eran epítomos antigénicos restringidos por HLA-A24 que son alelos de HLA encontrados comúnmente (Date Y y cols., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A y cols., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT y cols., J Immunol 152: 3913-24, 1994). Se identificaron candidatos de péptidos que se unen a HLA-A24 derivados de FOXM1 basándose en sus afinidades hacia HLA-A24.
25 Los siguientes péptidos son los péptidos posibles:

FOXM1-A24-9-316 (SEQ ID N°: 1),

FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2),

FOXM1-A24-9-451 (SEQ ID N°: 3),

FOXM1-A24-9-455 (SEQ ID N°: 4),

30 FOXM1-A24-9-483 (SEQ ID N°: 5),

FOXM1-A24-9-443 (SEQ ID N°: 6),

FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID N°: 7),

FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID N°: 8),

FOXM1-A24-9-133 (SEQ ID N°: 9),

35 FOXM1-A24-9-754 (SEQ ID N°: 10),

FOXM1-A24-9-429 (SEQ ID N°: 11),

FOXM1-A24-9-436 (SEQ ID N°: 12),

FOXM1-A24-9-524 (SEQ ID N°: 13),

FOXM1-A24-9-241 (SEQ ID N°: 14),

40 FOXM1-A24-10-627 (SEQ ID N°: 15),

FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID N°: 16),

- FOXM1-A24-10-777 (SEQ ID N°: 17),
FOXM1-A24-10-453 (SEQ ID N°: 18),
FOXM1-A24-10-382 (SEQ ID N°: 19),
FOXM1-A24-10-483 (SEQ ID N°: 20),
5 FOXM1-A24-10-435 (SEQ ID N°: 21),
FOXM1-A24-10-396 (SEQ ID N°: 22),
FOXM1-A24-10-325 (SEQ ID N°: 23),
FOXM1-A24-10-443 (SEQ ID N°: 24),
FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID N°: 25),
10 FOXM1-A24-10-713 (SEQ ID N°: 26),
FOXM1-A24-10-513 (SEQ ID N°: 27),
FOXM1-A24-10-7 (SEQ ID N°: 28),
FOXM1-A24-10-376 (SEQ ID N°: 29),
FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID N°: 30),
15 FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID N°: 31) y
FOXM1-A24-10-264 (SEQ ID N°: 32).

Después de la estimulación in vitro de células T por células dendríticas (DC) cargadas con estos péptidos, los CTL se establecieron satisfactoriamente usando cada uno de los siguientes péptidos:

- FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2),
20 FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID N°: 7),
FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID N°: 8),
FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID N°: 16),
FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID N°: 25),
FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID N°: 30) y
25 FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID N°: 31).

Estos CTL establecidos muestran una potente actividad de CTL específica contra células diana impulsadas con los respectivos péptidos. Estos resultados demuestran que FOXM1 es un antígeno reconocido por CTL y que los péptidos probados son péptidos epitópicos de FOXM1 restringidos por HLA-A24.

- 30 Puesto que el gen FOXM1 es sobreexpresado en células cancerosas tales como de AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular y no se

expresa en la mayoría de los órganos normales, es una buena diana para la inmunoterapia. Así, la presente invención proporciona nonapéptidos (péptidos que consisten en nueve residuos de aminoácido) y decapeptidos (péptidos que consisten en diez residuos de aminoácido) correspondientes a epítomos de FOXM1 reconocidos por CTL. Alternativamente, la presente invención proporciona un péptido aislado que se une a un antígeno HLA e induce linfocitos T citotóxicos (CTL), en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 34 o es un fragmento inmunológicamente activo de la misma. Ejemplos preferidos de nonapéptidos y decapeptidos de la presente invención incluyen los péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31.

Generalmente, se pueden usar programas de software disponibles actualmente, por ejemplo, en Internet, tales como los descritos en Parker KC y cols., *J Immunol* 1 enero 1994, 152(1): 163-75, Buus y cols. (*Tissue Antigens*, 62:378-84, 2003) y Nielsen y cols. (*Protein Sci.*, 12:1007-17, 2003, *Bioinformatics*, 20(9):1388-97, 2004), para calcular informáticamente las afinidades de unión entre diversos péptidos y antígenos HLA. La afinidad de unión con antígenos HLA se puede medir como se describe, por ejemplo, en las referencias de Parker KC y cols., *J Immunol* 1 enero 1994, 152(1): 163-75; y Kuzushima K y cols., *Blood* 2001, 98(6): 1872-81. Los métodos para determinar la afinidad de unión se describen, por ejemplo, en *Journal of Immunological Methods*, 1995, 185: 181-190; *Protein Science*, 2000, 9: 1838-1846. Por lo tanto, se pueden seleccionar fragmentos derivados de FOXM1, que tienen una alta afinidad de unión con antígenos HLA usando tales programas de software. Así, la presente invención abarca péptidos que consisten en cualesquiera fragmentos derivados de FOXM1 que se unan con antígenos HLA identificados usando tales programas conocidos. El péptido de la presente invención puede ser el péptido que consisten en la longitud completa de FOXM1.

Los péptidos de la presente invención pueden estar flanqueados por residuos de aminoácido adicionales con tal de que el péptido resultante retenga su capacidad de inducción de CTL. Los residuos de aminoácido para flanquear a los presentes péptidos pueden estar compuestos por cualquier tipo de aminoácidos con tal de que no deterioren la capacidad de inducción de CTL del péptido original. Así, la presente invención abarca péptidos que incluyen los péptidos derivados de FOXM1 y tienen afinidad de unión hacia antígenos HLA. Tales péptidos tienen típicamente menos de aproximadamente 40 aminoácidos, a menudo menos de aproximadamente 20 aminoácidos, habitualmente menos de aproximadamente 15 aminoácidos.

En general, la modificación de uno, dos o más aminoácidos en un péptido no influirá en la función del péptido, y en algunos casos incluso potenciará la función deseada de la proteína original. De hecho, se ha sabido que péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos por una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios residuos de aminoácido se han modificado (es decir, sustituido, suprimido, añadido o insertado en comparación con la secuencia de referencia original) retienen la actividad biológica del péptido original (Mark y cols., *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, *Nucleic Acids Res* 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland y cols., *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, 79: 6409-13). Así, en una realización, los péptidos de la presente invención pueden tener tanto capacidad de inducción de CTL como una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31, en la que uno, dos o incluso más aminoácidos se añaden, insertan y/o sustituyen.

Los expertos en la técnica reconocerán que las adiciones o sustituciones individuales a una secuencia de aminoácidos que alteran un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos tienden a dar como resultado la conservación de las propiedades de la cadena lateral de aminoácidos original. Como tales, a menudo se denominan "sustituciones conservativas" o "modificaciones conservativas", en las que la alteración de una proteína da como resultado una proteína modificada que tiene una función análoga a la proteína original. Son muy conocidas en la técnica tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Ejemplos de características de las cadenas laterales de aminoácidos que son deseables conservar incluyen, por ejemplo, aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), y cadenas laterales que tienen en común los grupos funcionales o las características siguientes: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene grupos hidroxilos (S, T, Y); una cadena lateral que contiene átomos de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácidos carboxílicos y amidas (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene bases (R, K, H); y una cadena lateral que contiene compuestos aromáticos (H, F, Y, W). Además, los ocho grupos siguiente contienen cada uno aminoácidos que son aceptados en la técnica como sustituciones conservativas entre sí:

1) Alanina (A), Glicina (G);

2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);

7) Serina (S), Treonina (T); y

8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, p. ej., Creighton, Proteins 1984).

También se considera que tales péptidos modificados conservativamente son péptidos de la presente invención. Sin embargo, los péptidos de la presente invención no se restringen a los mismos y pueden incluir modificaciones no conservativas, con tal de que el péptido modificado retenga la capacidad de inducción de CTL del péptido original. Por otra parte, los péptidos modificados no deben excluir péptidos inducibles por CTL de variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de FOXM1.

Para retener la capacidad de inducción de CTL requerida, se puede modificar (insertar, suprimir, añadir y/o sustituir) un pequeño número (por ejemplo, 1, 2 o varios) o un pequeño porcentaje de aminoácidos. En la presente, el término "varios" significa 5 o menos aminoácidos, por ejemplo, 4, 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos que se va a modificar es preferiblemente 20% o menos, más preferiblemente 15% o menos, aún más preferiblemente 10% o menos o de 1 a 5%.

Además, los péptidos de la presente invención se pueden insertar, sustituir o añadir con residuos de aminoácido o se pueden suprimir residuos de aminoácido para alcanzar una afinidad de unión superior. Cuando se usan en el contexto de la inmunoterapia, los presentes péptidos se deben presentar sobre la superficie de una célula o exosoma, preferiblemente como un complejo con un antígeno HLA. Además de péptidos que son exhibidos naturalmente, puesto que ya se conoce la regularidad de las secuencias de péptidos exhibidos al unirse a antígenos HLA (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), se pueden introducir modificaciones basadas en tal regularidad en péptidos inmunogénicos de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable sustituir el segundo aminoácido desde el extremo N por fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y/o el aminoácido en el extremo C por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina a fin de incrementar la unión a HLA-A24. Así, son abarcados por la presente invención péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31, en las que el segundo aminoácido desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID N° está sustituido por fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y péptidos, y/o en las que el extremo C de la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID N° está sustituido por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina.

La presente invención también contempla la adición de uno, dos o varios aminoácidos al extremo N y/o C de los péptidos descritos. Tales péptidos modificados que tienen alta afinidad de unión a antígeno HLA y una capacidad de inducción de CTL retenida también se incluyen en la presente invención.

Sin embargo, cuando la secuencia peptídica es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, se pueden inducir efectos secundarios tales como trastornos autoinmunitarios y/o síntomas alérgicos contra sustancias específicas. Por lo tanto, es preferible realizar en primer lugar búsquedas de homología usando bases de datos disponibles para evitar situaciones en las que la secuencia del péptido coincida con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando se aclara a partir de las búsquedas de homología que no existe ni siquiera un péptido con 1 o 2 diferencias de aminoácidos en comparación con el péptido elegido como objetivo, el péptido elegido como objetivo se puede modificar a fin de incrementar su afinidad de unión con antígenos HLA, y/o incrementar su capacidad de inducción de CTL sin ningún peligro de tales efectos secundarios. Aunque se espera que los péptidos que tienen alta afinidad de unión con los antígenos HLA según se describe anteriormente sean muy eficaces, los posibles péptidos, que se seleccionan según la presencia de alta afinidad de unión como un indicador, se examinan además con respecto a la presencia de capacidad de inducción de CTL. En la presente, la expresión "capacidad de inducción de CTL" indica la capacidad del péptido para inducir CTL cuando se presenta sobre células que presentan antígeno (APC). - Además, "capacidad de inducción de CTL" incluye la capacidad del péptido para inducir la activación de CTL, la proliferación de CTL, promover la lisis por CTL de células diana e incrementar la producción de IFN- γ por CTL.

La confirmación de la capacidad de inducción de CTL se logra al inducir APC que soportan antígenos del MHC humano (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DC)) o más específicamente DC derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humanos y, después de la estimulación con los péptidos, mezclar con células CD8+ y a continuación medir el IFN- γ producido y liberado por CTL contra las células diana. Como el sistema de reacción, se pueden usar animales transgénicos que se han producido para expresar un antígeno HLA humano (por ejemplo, los descritos en BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol agosto 2000, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response). Por ejemplo, las células diana se pueden radiomarcarse con ⁵¹Cr y tal actividad citotóxica se puede calcular a partir de la radiactividad liberada de las células diana. Alternativamente, la capacidad de inducción de CTL se puede evaluar al medir el IFN- γ producido y liberado por CTL en presencia de APC que soportan péptidos inmovilizados, y visualizar la zona de inhibición sobre el medio usando anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ .

5 Como resultado de examinar la capacidad de inducción de CTL de los péptidos que se describen anteriormente, se descubrió que los nonapéptidos o decapeptidos seleccionados de péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos indicadas por SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31 mostraban una capacidad de inducción de CTL particularmente alta así como una alta afinidad de unión a un antígeno HLA. Así, estos péptidos se ejemplifican como realizaciones preferidas de la presente invención.

10 Por otra parte, el resultado de los análisis de homología mostraba que esos péptidos no tienen una homología significativa con péptidos derivados de cualesquiera otros productos génicos humanos conocidos. Esto disminuye la posibilidad de respuestas inmunitarias desconocidas o no deseables cuando se usan para inmunoterapia. Por lo tanto, también a partir de este aspecto, estos péptidos encuentran uso para provocar inmunidad en pacientes con cáncer contra FOXM1. Así, los péptidos de la presente invención, preferiblemente, péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31.

15 Además de la modificación de los presentes péptidos analizados anteriormente, los péptidos descritos se pueden conectar adicionalmente a otras sustancias, con tal de que retengan la capacidad de inducción de CTL del péptido original. Sustancias ejemplares incluyen: péptidos, lípidos, azúcar y cadenas sacáricas, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los presentes péptidos pueden contener modificaciones tales como glicosilación, oxidación de cadenas laterales y/o fosforilación; con tal de que las modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Estos tipos de modificaciones pueden conferir funciones adicionales (p. ej., función de elección de diana y función de aporte) y/o estabilizar los péptidos.

20 Por ejemplo, para incrementar la estabilidad in vivo de un polipéptido, se conoce en la técnica la introducción de D-aminoácidos, miméticos de aminoácidos o aminoácidos naturales; este concepto también se puede adoptar para los presentes polipéptidos. La estabilidad de un polipéptido se puede ensayar de un número de modos. A modo de ejemplo, peptidasas y diversos medios biológicos, tales como plasma y suero humanos, se pueden usar para probar la estabilidad (véase, p. ej., Verhoef y cols., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

30 Por otra parte, según se apunta anteriormente, entre los péptidos modificados que en los que se han sustituido, suprimido o añadido uno, dos o varios residuos de aminoácido, se pueden cribar o seleccionar los que tienen una actividad igual o superior en comparación con los péptidos originales. La presente invención, por lo tanto, también proporciona el método para cribar o seleccionar péptidos modificados que tienen una actividad igual o superior en comparación con los originales. Por ejemplo, el método puede comprender las etapas de:

a: sustituir, suprimir o añadir al menos un residuo de aminoácido de un péptido de la presente invención.;

35 b: determinar la actividad de dicho péptido.;

c: seleccionar el péptido que tiene una actividad igual o superior en comparación con el original. En la presente, los péptidos de la presente invención también se pueden describir como "péptido o péptidos de FOXM1" o "polipéptido o polipéptidos de FOXM1".

III. Preparación de péptidos de FOXM1

40 Los péptidos de la presente invención se pueden preparar usando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar sintéticamente, usando tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar individualmente o como polipéptidos más largos compuestos por dos o más péptidos. A continuación, los péptidos se pueden aislar, es decir, purificar o aislar a fin de que estén sustancialmente libres de otras proteínas de células hospedadoras presentes en la naturaleza y fragmentos de los mismas, o cualesquiera otras sustancias químicas.

45 Los péptidos de la presente invención pueden contener modificaciones, tales como glicosilación, oxidación de las cadenas laterales o fosforilación; con tal de que las modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos que se describen en la presente. Otras modificaciones incluyen la incorporación de D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácidos que se pueden usar, por ejemplo, para incrementar la semivida sérica de los péptidos.

Un péptido de la presente invención se puede obtener a través de síntesis química basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Ejemplos de métodos convencionales de síntesis de péptidos que se pueden adaptar a la síntesis incluyen, pero no se limitan a:

55 (i) Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966;

(ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, Nueva York, 1976;

(iii) Peptide Synthesis (en japonés), Maruzen Co., 1975;

(iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (en japonés), Maruzen Co., 1985;

(v) Development of Pharmaceuticals (segundo volumen) (en japonés), Vol. 14 (síntesis de péptidos), Hirokawa, 1991;

5 (vi) el documento WO99/67288; y

(vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, Nueva York, 1980, 100-118.

10 Alternativamente, los presentes péptidos se pueden obtener adaptando cualesquiera métodos de ingeniería genética conocidos para producir péptidos (p. ej., Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu y cols.) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, en primer lugar, un vector adecuado que aloja un polinucleótido que codifica el péptido elegido como objetivo en una forma expresable (p. ej., aguas abajo de una secuencia reguladora correspondiente a una secuencia promotora) se prepara y se transforma en una célula hospedadora adecuada. La célula hospedadora se cultiva a continuación para producir el péptido de interés. El péptido también se puede producir in vitro adaptando un sistema de traducción in vitro.

15 IV. Polinucleótidos

La presente invención también proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los susodichos péptidos de la presente invención. Estos incluyen polinucleótidos derivados del gen FOXM1 presente en la naturaleza (Nº de Registro del GenBank NM_202002.1 (SEQ ID Nº: 33)) así como los que tienen secuencias nucleotídicas modificadas conservativamente de los mismos. En la presente, la expresión "secuencia nucleotídica modificada conservativamente" se refiere a secuencias que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. A modo de ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Así, en cualquier posición en la que una alanina sea especificada por un codón, el codón puede ser alterado hasta cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones del ácido nucleico son "variaciones sinónimas", que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique un péptido también describe cualquier posible variación sinónima del ácido nucleico. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) se puede modificar para dar una molécula funcionalmente idéntica. Según esto, cada variación sinónima de un ácido nucleico que codifica un péptido se describe implícitamente en cada secuencia divulgada.

El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto por ADN, ARN y derivados de los mismos. Como es bien conocido en la técnica, una molécula de ADN está compuesta por bases tales como las bases presentes en la naturaleza A, T, C y G, y T se reemplaza por U en un ARN. Un experto en la técnica reconocerá que también se incluyen en los polinucleótidos bases no presentes en la naturaleza.

El polinucleótido de la presente invención puede codificar múltiples péptidos de la presente invención con o sin secuencias de aminoácidos intermedias. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos intermedia puede proporcionar un sitio de escisión (p. ej., una secuencia de reconocimiento enzimático) del polinucleótido o los péptidos traducidos. Por otra parte, el polinucleótido puede incluir cualesquiera secuencias adicionales a la secuencia codificante que codifica el péptido de la presente invención. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido recombinante que incluye secuencias reguladoras requeridas para la expresión del péptido o puede ser un vector de expresión (plásmido) con genes marcadores y demás. En general, tales polinucleótidos recombinantes se pueden preparar mediante la manipulación de polinucleótidos a través de técnicas recombinantes convencionales usando, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

Se pueden usar técnicas tanto recombinantes como de síntesis química para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, un polinucleótido se puede producir mediante inserción en un vector apropiado, que se puede expresar cuando se transfecta en una célula competente. Alternativamente, un polinucleótido se puede amplificar usando técnicas de PCR o expresión en hospedadores adecuados (véase, p. ej., Sambrook y cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989). Alternativamente, un polinucleótido se puede sintetizar usando las técnicas en fase sólida, según se describe en Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes y cols., EMBO J 1984, 3: 801-5.

55

V. Exosomas

5 La presente invención proporciona además vesículas intracelulares llamadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de la presente invención y antígenos HLA sobre su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, al usar los métodos detallados en las Publicaciones Kohyo de Solicitud de Patente Japonesa N° Hei 11-510507 y WO99/03499, y se pueden preparar usando APC obtenidas de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención. Los exosomas de la presente invención se pueden inocular como vacunas, de un modo similar a los péptidos de la presente invención.

10 El tipo de antígenos HLA contenidos en los complejos debe ajustarse al del sujeto que requiera tratamiento y/o prevención. Por ejemplo, en la población japonesa, HLA-A24 (particularmente, A*2402) son predominantes y por lo tanto serían apropiados para el tratamiento de un paciente japonés. El uso del tipo A24 que es altamente expresado entre los japoneses y caucasianos es favorable para obtener resultados eficaces. Típicamente, en la clínica, el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento se investiga por adelantado, lo que permite la selección apropiada de péptidos que tienen altos niveles de afinidad de unión al antígeno particular, o que tienen capacidad de inducción de CTL por presentación del antígeno. Por otra parte, a fin de obtener péptidos que tienen tanto alta afinidad de unión como capacidad de inducción de CTL, se pueden realizar sustitución, inserción y/o adición de 1, 2, o varios aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido parcial de FOXM1 presente en la naturaleza.

20 Cuando se usa el antígeno HLA tipo A24 para el exosoma de la presente invención, encuentran uso los péptidos que tienen una secuencia de una cualquiera de SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31.

VI. Células que presentan antígeno (APC)

25 La presente invención también proporciona APC aisladas que presentan complejos formados entre antígenos HLA y los péptidos de la presente invención sobre su superficie. Las APC se pueden derivar de pacientes que están sometidos a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar como vacunas por sí mismas o en combinación con otros fármacos incluyendo los péptidos de la presente invención, exosomas o CTL.

30 Las APC no se limitan a un tipo particular de células e incluyen DC, células de Langerhans, macrófagos, células B, y células T activadas, que se sabe que presentan antígenos proteínicos sobre su superficie a fin de que sean reconocidos por linfocitos. Puesto que la DC es una APC representativa que tiene la acción inductora de CTL más fuerte entre las APC, las DC encuentran uso como las APC de la presente invención.

35 Por ejemplo, las APC de la presente invención se pueden obtener al inducir DC desde monocitos de sangre periférica y a continuación ponerlas en contacto (estimularlas) con los péptidos de la presente invención in vitro, ex vivo o in vivo. Cuando los péptidos de la presente invención se administran a los sujetos, las APC que presentan los péptidos de la presente invención son inducidas en el cuerpo del sujeto. Por lo tanto, las APC de la presente invención se pueden obtener al recoger las APC del sujeto después de administrar los péptidos de la presente invención al sujeto. Alternativamente, las APC de la presente invención se pueden obtener al poner en contacto APC recogidas de un sujeto con el péptido de la presente invención.

Las APC de la presente invención se pueden administrar solas o en combinación con otros fármacos incluyendo los péptidos, exosomas o CTL de la presente invención a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer en el sujeto. Por ejemplo, la administración ex vivo puede incluir las etapas de:

45 a: recoger APC de un primer sujeto,

b: poner en contacto las APC de la etapa a con el péptido y

c: administrar las APC de la etapa b a un segundo sujeto.

50 El primer sujeto y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo o pueden ser individuos diferentes. Las APC obtenidas en la etapa b se pueden administrar como una vacuna para tratar y/o prevenir el cáncer incluyendo AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular.

55 La presente invención también proporciona un método o procedimiento para fabricar una composición farmacéutica que induce APC, en donde el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según un aspecto de la presente invención, las APC tienen un alto nivel de capacidad de inducción de CTL. En el término de "alto nivel de capacidad de inducción de CTL", el alto nivel es relativo a ese nivel por APC que no entra en contacto con péptido o péptidos que no pueden inducir el CTL. Tales APC que tienen un alto nivel de capacidad de inducción de CTL se pueden preparar mediante un método que incluye la etapa de transferir un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención a APC in vitro así como el método mencionado anteriormente. Los genes introducidos pueden estar en la forma de ADN o ARN. Ejemplos de métodos para la introducción incluyen, sin limitaciones particulares, diversos métodos realizados convencionalmente en este campo, tales como lipofección, electroporación y el método del fosfato cálcico. Más específicamente, se puede realizar según se describe en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; la Traducción Japonesa Publicada de la Publicación Internacional N° 2000-509281. Al transferir el gen a APC, el gen sufre transcripción, traducción y demás en la célula, y a continuación la proteína obtenida es procesada por el MHC Clase I o Clase II, y avanza a través de una ruta de presentación para presentar péptidos.

VII. Linfocitos T citotóxicos (CTL)

Un CTL inducido contra cualquiera de los péptidos de la presente invención refuerza la respuesta inmunitaria que elige como diana células cancerosas in vivo y así se pueden usar como vacunas de un modo similar a los péptidos de por sí. Así, la presente invención también proporciona CTL aislados que son inducidos o activados específicamente por cualquiera de los presentes péptidos.

Tales CTL se pueden obtener al (1) administrar el péptido o los péptidos de la presente invención a un sujeto, recoger CTL del sujeto; o (2) poner en contacto (estimular) APC derivadas del sujeto y células CD8+ o leucocitos mononucleares de sangre periférica in vitro con el péptido o los péptidos de la presente invención y a continuación aislar CTL; o (3) poner en contacto células CD8+ o leucocitos mononucleares de sangre periférica in vitro con APC o exosomas que presentan un complejo de un antígeno HLA y el presente péptido sobre su superficie y a continuación aislar CTL; o (4) introducir un gen que incluye un polinucleótido que codifica una subunidad receptora de células T (TCR) que une el péptido de la presente invención a los CTL. Las APC y los exosomas susodichos se pueden preparar mediante métodos descritos anteriormente y el método de (4) se detalla posteriormente en la sección "VIII. Receptor de células T (TCR)".

Los CTL de la presente invención se pueden derivar de pacientes que están sometidos a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar por sí mismos o en combinación con otros fármacos incluyendo los péptidos de la presente invención o exosomas con el propósito de efectos reguladores. Los CTL obtenidos actúan específicamente contra células diana que presentan los péptidos de la presente invención, por ejemplo, los mismos péptidos usados para la inducción. Las células diana pueden ser células que expresan endógenamente FOXM1, tales como células cancerosas, o células que se transfectan con el gen FOXM1; y células que presentan un péptido de la presente invención sobre la superficie celular debido a estimulación por el péptido también pueden servir como dianas del ataque de CTL activados.

VIII. Receptor de células T (TCR)

La presente invención también proporciona una composición que contiene ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de células T (TCR), y métodos para usar la misma. Las subunidades TCR tienen la capacidad de formar TCR que confieren especificidad a células T contra células tumorales que expresan FOXM1. Al usar los métodos conocidos en la técnica, se pueden identificar los ácidos nucleicos de cadenas α y β como las subunidades TCR del CTL inducido con uno o más péptidos de la presente invención (documento WO2007/032255 and Morgan y cols., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Por ejemplo, el método de PCR se prefiere para analizar el TCR. Los cebadores de PCR para el análisis pueden ser, por ejemplo, cebadores 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') como cebadores laterales 5' (SEQ ID N°: 35) y cebadores 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgagcgt-3') específicos para la región C de la cadena α de TCR (SEQ ID N°: 36), cebadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatccttctcttgac-3') específicos para la región C1 de la cadena β de TCR (SEQ ID N°: 37) o cebadores 3-TR β -C2 (5'-ctagcctctggaatccttctctt-3') específicos para la región C2 de la cadena β de TCR (SEQ ID N°: 38) como cebadores laterales 3', pero no están limitados. Los TCR derivados se pueden unir a células diana que exhiben el péptido de FOXM1 con gran avidéz, y opcionalmente mediar en la destrucción eficaz de células diana que presentan el péptido de FOXM1 in vivo e in vitro.

Los ácidos nucleicos que codifican las subunidades TCR se pueden incorporar en vectores adecuados, p. ej., vectores retrovirales. Estos vectores son muy conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos o los vectores que los contienen útilmente se pueden transferir adentro de una célula T, por ejemplo, una célula T de un paciente. Ventajosamente, la presente invención proporciona una composición lista para usar que permite una modificación rápida de las células T del propio paciente (o las de otro mamífero) para producir rápidamente y fácilmente células T modificadas que tienen excelentes propiedades de destrucción de células cancerosas.

El TCR específico es un receptor capaz de reconocer específicamente un complejo de un péptido de la presente invención y una molécula de HLA, dando una actividad específica para células T contra la célula diana cuando el TCR está sobre la superficie de la célula T. Un reconocimiento específico del complejo anterior se puede confirmar mediante cualesquiera métodos conocidos, y métodos preferidos incluyen, por ejemplo, análisis de tetrámeros usando una molécula de HLA y un péptido de la presente invención, y ensayo ELISPOT. Al realizar el ensayo ELISPOT, se puede confirmar que una célula T que expresa el TCR sobre la superficie celular reconoce una célula mediante el TCR, y que la señal se transmite intracelularmente. La confirmación de que el susodicho complejo puede dar una actividad citotóxica de células T cuando el complejo existe sobre la superficie de la célula T también se puede llevar a cabo mediante un método conocido. Un método preferido incluye, por ejemplo, la determinación de la actividad citotóxica contra una célula diana positiva a HLA, tal como el ensayo de liberación de cromo.

Además, la presente invención proporciona CTL que se preparan mediante transducción con los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de las subunidades TCR que se unen al péptido de FOXM1 de, p. ej., SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31 en el contexto de HLA-A24. Los CTL transducidos son capaces de dirigirse a células cancerosas in vivo, y se pueden expandir mediante métodos de cultivo in vitro muy conocidos (p. ej., Kawakami y cols., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Los CTL de la presente invención se pueden usar para formar una composición inmunogénica útil en el tratamiento o la prevención del cáncer en un paciente que necesite terapia o protección (documento WO2006/031221).

IX. Sustancias o composiciones farmacéuticas

La prevención y la profilaxis incluyen cualquier actividad que reduzca la carga de mortalidad o morbilidad debida a la enfermedad. La prevención y la profilaxis se pueden producir "a niveles de prevención primario, secundario y terciario". Mientras que la prevención y la profilaxis primarias evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles secundario y terciario de prevención y profilaxis abarcan actividades destinadas a la prevención y la profilaxis del avance de una enfermedad y el surgimiento de los síntomas así como la reducción del impacto negativo de una enfermedad ya establecida al restaurar la función y reducir las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y la profilaxis incluyen una amplia gama de terapias profilácticas destinadas a aliviar la gravedad del trastorno particular, p. ej., reducir la proliferación y la metástasis de tumores, reducir la angiogénesis.

Tratamiento y/o profilaxis del cáncer, y/o la prevención de la recidiva posoperatoria del mismo, incluye cualquiera de las siguientes etapas, tales como extirpación quirúrgica de células cancerosas, inhibición del crecimiento de células cancerosas, involución o regresión de un tumor, inducción de la remisión y la supresión de la presencia de cáncer, regresión de tumores y reducción o inhibición de metástasis. El tratamiento y/o la profilaxis eficaz del cáncer disminuye la mortalidad y mejora el pronóstico de individuos que tienen cáncer, disminuye los niveles de marcadores tumorales en la sangre y alivia síntomas detectables que acompañan al cáncer. Por ejemplo, la reducción o la mejora del síntoma constituye tratamiento y/o profilaxis eficaz, incluyendo 10%, 20%, 30% o más de reducción, o una enfermedad estable.

Puesto que la expresión de FOXM1 se eleva específicamente en cánceres incluyendo AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular, en comparación con tejido normal, los péptidos de la presente invención o los polinucleótidos que codifican tales péptidos se pueden usar para el tratamiento y/o para la profilaxis de un cáncer o un tumor, y/o la prevención de la recidiva posoperatoria del mismo. Así, la presente invención proporciona una sustancia o composición farmacéutica para el tratamiento y/o para la profilaxis de un cáncer o un, y/o la prevención de la recidiva posoperatoria del mismo, que incluye uno o más de los péptidos de la presente invención o polinucleótidos que codifican los péptidos como un ingrediente activo. Alternativamente, los presentes péptidos se pueden expresar sobre la superficie de cualquiera de los exosomas o células precedentes, tales como APC, para el uso como sustancias o composiciones farmacéuticas. Además, los susodichos CTL que eligen como diana cualquiera de los péptidos de la presente invención también se pueden usar como el ingrediente activo de las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas.

En otra realización, la presente invención también proporciona el uso de un ingrediente activo seleccionado de entre:

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica tal péptido que se divulga en la presente en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y
- (d) una célula T citotóxica de la presente invención

para fabricar una composición o sustancia farmacéutica para tratar un cáncer o un tumor.

Alternativamente, la presente invención proporciona además un ingrediente activo seleccionado de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un ácido nucleico que codifica tal péptido que se divulga en la presente en una forma expresable;

5 (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y

(d) una célula T citotóxica de la presente invención

para el uso en el tratamiento de un cáncer o un tumor.

10 Alternativamente, la presente invención proporciona además un método o un procedimiento para fabricar una composición o sustancia farmacéutica para tratar un cáncer o un tumor, en donde el método o procedimiento incluye la etapa de formular un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable con un ingrediente activo seleccionado de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un ácido nucleico que codifica tal péptido que se divulga en la presente en una forma expresable;

15 (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y

(d) una célula T citotóxica de la presente invención

como ingredientes activos.

20 En otra realización, la presente invención también proporciona un método o procedimiento para fabricar una composición o sustancia farmacéutica para tratar un cáncer o un tumor, en donde el método o procedimiento incluye las etapas de mezclar un ingrediente activo con un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable, en donde el ingrediente activo se selecciona de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un ácido nucleico que codifica tal péptido que se divulga en la presente en una forma expresable;

(c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y

25 (d) una célula T citotóxica de la presente invención.

Alternativamente, la composición o sustancia farmacéutica de la presente invención se puede usar para cualquiera o ambas de la profilaxis de un cáncer o tumor y la prevención de la recidiva posoperatoria del mismo.

30 Las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas encuentran uso como una vacuna. En el contexto de la presente invención, la expresión "vacuna" (también denominada "composición inmunogénica") se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad antitumoral al inocularse en animales.

35 Las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir cánceres o tumores, y/o la prevención de la recidiva posoperatoria de los mismos en sujetos o pacientes incluyendo un ser humano y cualquier otro mamífero incluyendo, pero no limitado a, ratón, rata, cobaya, conejo, gato, perro, oveja, cabra, cerdo, vaca, caballo, mono babuino y chimpancé, particularmente un animal comercialmente importante o un animal doméstico.

40 Según la presente invención, se ha encontrado que péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31 son péptidos epitópicos restringidos a HLA-A24 o candidatos que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica. Por lo tanto, las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de estos péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31 son particularmente adecuadas para la administración a sujetos cuyo antígeno

HLA es HLA-A24. Lo mismo se aplica a sustancias y composiciones farmacéuticas que incluyen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de la presente invención).

Los cánceres o tumores a ser tratados por las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención no están limitados e incluye cualquier cáncer o tumor en el que esté implicado FOXM1 (p. ej., esté sobreexpresado), incluyendo, por ejemplo, AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular.

Las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas pueden contener además de los susodichos ingredientes activos otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTL contra células cancerosas, otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, o similares. En la presente, los otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTL contra células cancerosas son ejemplificados por antígenos específicos del cáncer (p. ej., TAA identificados), pero no se limitan a los mismos.

Si es necesario, las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como un ingrediente activo, con tal de que la sustancia no inhiba el efecto antitumoral del ingrediente activo, p. ej., cualquiera de los presentes péptidos. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir sustancias antiinflamatorias, analgésicos, agentes quimioterapéuticos y similares. Además de incluir otras sustancias terapéuticas en el propio medicamento, los medicamentos de la presente invención también se pueden administrar secuencialmente o simultáneamente con una o más de otras sustancias farmacológicas. Las cantidades de medicamento y sustancia farmacológica dependen, por ejemplo, de qué tipo de sustancia o sustancias farmacológicas se usen, la enfermedad que se trate y el programa y las vías de administración.

Se debe entender que además de los ingredientes mencionados particularmente en la presente, las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir otras composiciones convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión.

En una realización de la presente invención, las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas se pueden incluir en artículos de fabricación y estuches que contienen materiales útiles para tratar las afecciones patológicas de la enfermedad que se va a tratar, p. ej., cáncer. El artículo de fabricación puede incluir un recipiente de cualquiera de las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas con una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta del recipiente debe indicar que la composición se usa para el tratamiento o la prevención de una o más afecciones de la enfermedad. La etiqueta también puede indicar directrices para la administración, etc.

Además del recipiente descrito anteriormente, un estuche que incluye una sustancia o composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir además opcionalmente un segundo recipiente que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso. Las sustancias o composiciones farmacéuticas, si se desea, se pueden presentar en un envase o dispositivo dosificador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede incluir, por ejemplo, papel metalizado o plastificado, tal como un blíster. El envase o dispositivo dosificador puede estar acompañado por instrucciones para la administración.

(1) Sustancias o composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos como el ingrediente activo

Los péptidos de la presente invención se pueden administrar directamente como una sustancia o composición farmacéutica o, si es necesario, que se ha formulado mediante métodos de formulación convencionales. En el último caso, además de los péptidos de la presente invención, vehículos, excipientes y similares que usan normalmente para fármacos se pueden incluir como apropiados sin limitaciones particulares. Ejemplos de tales vehículos son agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón de fosfato, fluido de cultivo y similares. Por otra parte, las sustancias o composiciones farmacéuticas pueden contener, según sea necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares. Las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar con propósitos anticancerosos. Los péptidos de la presente invención se pueden preparar como una combinación compuesta por dos o más de los péptidos de la presente invención, para inducir CTL in vivo. La combinación de péptidos puede tomar la forma de un cóctel o se pueden conjugar entre sí usando técnicas estándar. Por ejemplo, los péptidos se pueden conectar químicamente o expresar como una sola secuencia de polipéptidos de fusión. Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes. Al administrar los péptidos de la presente invención, los péptidos son presentados a una alta densidad por los antígenos HLA sobre APC, a continuación se inducen CTL que reaccionan específicamente hacia el complejo formado entre el péptido exhibido y el antígeno HLA. Alternativamente, se retiran APC (p. ej., DC) de los sujetos y a continuación se estimulan mediante los péptidos de la presente invención para obtener APC que presentan cualquiera de los péptidos de esta invención

sobre su superficie celular. Estos APC se readministran a los sujetos para inducir CTL en los sujetos y, como resultado, se pueden incrementar la agresividad hacia el endotelio asociado a un tumor.

5 Las sustancias o composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o la prevención de un cáncer o un tumor, que incluyen un péptido de la presente invención como el ingrediente activo, también pueden incluir un adyuvante conocido para inducir eficazmente inmunidad celular. Alternativamente, las sustancias o composiciones farmacéuticas se pueden administrar con otros ingredientes activos o administrar mediante formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a un compuesto que potencia la respuesta inmunitaria cuando se administra junto (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Adyuvantes contemplados en la presente incluyen los descritos en la bibliografía (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina del cólera, toxina de salmonella, y similares, pero no se limitan a los mismos.

15 Por otra parte, se pueden usar convenientemente formulaciones liposómicas, formulaciones granulares en las que el péptido está unido a cuentas de unos pocos micrómetros de diámetro, y formulaciones en las que un lípido está unido al péptido.

20 En otra realización de la presente invención, los péptidos de la presente invención también se pueden administrar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos preferibles de las sales incluyen sales como un metal alcalino, sales con un metal, sales con una base orgánica, sales con un ácido orgánico y sales con un ácido inorgánico.

25 En algunas realizaciones, las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir además un componente que ceba CTL. Se han identificado lípidos como sustancias capaces de cebar CTL in vivo contra antígenos virales. Por ejemplo, residuos de ácido palmítico pueden enlazarse a los grupos amino ϵ y α de un residuo de lisina y a continuación conectarse a un péptido de la presente invención. A continuación, el péptido lipidado se puede administrar bien directamente en una micela o partícula, bien incorporado en un liposoma o bien emulsionado en un adyuvante. Como otro ejemplo de cebado lipídico de respuestas de CTL, se pueden usar lipoproteínas de E. coli, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS) para cebar CTL cuando están enlazadas covalentemente a un péptido apropiado (véase, p. ej., Deres y cols., Nature 1989, 342: 561-4).

35 El método de administración puede ser oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, o similares, y administración sistémica o administración local a la vecindad de los sitios elegidos como diana. La administración se puede realizar mediante una sola administración o como dosis de refuerzo mediante múltiples administraciones. La dosis de los péptidos de la presente invención se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad que va a tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración y similares, y es normalmente de 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo, de 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo, de 0,1 mg a 10 mg, y se puede administrar una vez en de unos pocos días a unos pocos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente una dosis adecuada.

40 (2) Sustancias o composiciones farmacéuticas que contienen polinucleótidos como el ingrediente activo

45 Las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener ácidos nucleicos que codifican los péptidos divulgados en la presente como una forma expresable. En la presente, la expresión "en una forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando se introduce en una célula, se expresará in vivo como un polipéptido que induce inmunidad antitumoral. En una realización ejemplificada, la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido de interés incluye elementos reguladores necesarios para la expresión del polinucleótido. El polinucleótido o los polinucleótidos pueden estar equipados a fin de alcanzar una inserción estable en el genoma de la célula diana (véase, p. ej., Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 para una descripción de vectores de casete de recombinación homólogos). Véanse, p. ej., Wolff y cols., Science 1990, 247: 1465-8; las Patentes de EE. UU. N° 5.580.859, 5.589.466, 5.804.566, 5.739.118, 5.736.524, 5.679.647; y el documento WO 98/04720. Ejemplos de tecnologías de aporte basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", aporte facilitado (bupivacaína, polímeros, mediado por péptidos), complejos lipídicos catiónicos y aporte mediado por partículas ("pistola génica") o mediado por presión (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N° 5.922.687).

55 Los péptidos de la presente invención también pueden ser expresados por vectores virales o bacterianos. Ejemplos de vectores de expresión incluyen hospedadores virales atenuados, tales como vacuna o viruela aviar. Este enfoque implica el uso de virus vacunal, p. ej., como un vector para expresar secuencias nucleotídicas que codifican el péptido. Al introducir en un hospedador, el virus vacunal recombinante expresa el péptido inmunogénico, y de ese modo provoca una respuesta inmunitaria. Vectores vacunales y métodos útiles en protocolos de inmunización se describen, p. ej., en la Patente de EE. UU. N° 4.722.848. Otro vector es BCG (bacilo de Calmette Guerin). Vectores de BCG se describen en Stover y cols., Nature 1991, 351: 456-60. Será evidente una amplia variedad de otros vectores útiles para administración terapéutica o inmunización, p. ej., vectores de adenovirus y virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores de Salmonella typhi, vectores de toxina del carbunco destoxificada,

y similares. Véanse, p. ej., Shata y cols., *Mol Med Today* 2000, 6: 66-71; Shedlock y cols., *J Leukoc Biol* 2000, 68: 793-806; Hipp y cols., *In Vivo* 2000, 14: 571-85.

5 El aporte de un polinucleótido adentro de un sujeto puede ser bien directo, en cuyo caso el sujeto se expone directamente a un vector que soporta polinucleótido, o bien indirecto, en cuyo caso las células se transforman en primer lugar con el polinucleótido de interés in vitro, y a continuación las células se trasplantan al sujeto. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapias génicas in vivo y ex vivo.

10 Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel y cols., *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488-505; Wu y Wu, *Biotherapy* 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33: 573-96; Mulligan, *Science* 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215). Métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que también se pueden usar para la presente invención se describen en eds. Ausubel y cols., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; y Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990.

15 El método de administración puede ser oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa o similares, y encuentra uso la administración sistémica o la administración local a la vecindad de los sitios elegidos como diana. La administración se puede realizar como una sola administración o en dosis de refuerzo mediante múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el vehículo adecuado o las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de la presente invención se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad que se va a tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración, y similares, y normalmente es de 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo, de 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo, de 0,1 mg a 10 mg, y se puede administrar de una vez cada pocos días a una vez cada pocos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente la dosis adecuada.

X. Métodos que usan los péptidos, exosomas, APC y CTL

30 Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para inducir APC y CTL. Los exosomas las APC de la presente invención también se pueden usar para inducir CTL. Los péptidos, polinucleótidos, exosomas y APC se pueden usar en combinación con cualesquiera otros compuestos con tal de que los compuestos no inhiban su capacidad de inducción de CTL. Así, cualquiera de las susodichas sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención se puede usar para inducir CTL, y además de las mismas, las que incluyen los péptidos y polinucleótidos también se pueden usar para inducir APC como se analiza y explica posteriormente.

(1) Método para inducir células que presentan antígeno (APC)

35 La presente invención proporciona métodos para inducir o preparar APC con una gran capacidad de inducción de CTL usando los péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

Los métodos de la presente invención incluyen la etapa de poner en contacto APC con los péptidos de la presente invención in vitro, ex vivo o in vivo. Por ejemplo, el método que pone en contacto APC con los péptidos ex vivo puede incluir las etapas de:

40 a: recoger APC de un sujeto, y

b: poner en contacto las APC de la etapa a con el péptido.

45 Las APC no se limitan a un tipo particular de células e incluyen DC, células de Langerhans, macrófagos, células B y células T activadas, que se sabe que presentan antígenos proteínicos sobre su superficie celular a fin de ser reconocidos por linfocitos. Las DC se pueden usar preferiblemente debido a su capacidad de inducción de CTL más fuerte entre las APC. Cualesquiera péptidos de la presente invención se pueden usar como el péptido de la etapa b por sí mismos o en combinación con otros péptidos de la presente invención.

50 Alternativamente, los péptidos de la presente invención se pueden administrar a un sujeto para poner en contacto los péptidos con APC in vivo. Por consiguiente, APC con alta capacidad de inducción de CTL pueden ser inducidas en el cuerpo del sujeto. Así, la presente invención también contempla un método para administrar los péptidos de la presente invención a un sujeto para inducir APC in vivo. También es posible administrar polinucleótidos que codifican los péptidos de la presente invención a un sujeto en una forma expresable, de modo que los péptidos de la presente invención se expresen y entren en contacto con APC in vivo, para inducir consiguientemente APC con alta capacidad de inducción de CTL en el cuerpo del sujeto. Así, la presente invención también contempla un método para administrar los polinucleótidos de la presente invención a un sujeto para inducir APC in vivo. La expresión "forma expresable" se define anteriormente en la sección "IX. Sustancias o composiciones farmacéuticas".

(2) Sustancias o composiciones farmacéuticas que contienen polinucleótidos como el ingrediente activo.

Por otra parte, la presente invención incluye introducir el polinucleótido de la presente invención en una APC para inducir o preparar APC con capacidad de inducción de CTL. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

a: recoger APC de un sujeto, y

5 b: introducir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención.

La etapa b se puede realizar según se describe anteriormente en la sección "VI. Células que presentan antígeno". Alternativamente, la presente invención proporciona un método para preparar una célula que presente antígeno (APC) que induce específicamente la actividad de CTL contra FOXM1, en donde el método comprende una de las siguientes etapas:

10 (a) poner en contacto una APC con un péptido de la presente invención in vitro, ex vivo o in vivo; y

(b) introducir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en una APC.

(2) Método para inducir CTL

Por otra parte, la presente invención proporciona métodos para inducir CTL usando los péptidos, polinucleótidos o exosomas o las APC de la presente invención.

15 La presente invención también proporciona métodos para inducir CTL usando un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad receptora de células T (TCR) que reconoce un complejo de los péptidos de la presente invención y antígenos HLA. Preferiblemente, los métodos para inducir CTL incluyen al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

20 a) poner en contacto una célula T CD8+ con una célula que presenta antígeno y/o un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención; y

b) introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad TCR que reconoce un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA en una célula CD8+.

25 Cuando los péptidos, los polinucleótidos, las APC o los exosomas de la presente invención se administran a un sujeto, se inducen CTL en el cuerpo del sujeto, y se aumenta la intensidad de la respuesta inmunitaria que elige como diana las células cancerosas. Así, la presente invención también contempla un método que incluye la etapa de administrar los péptidos, los polinucleótidos, las APC o los exosomas de la presente invención a un sujeto para inducir CTL.

30 Alternativamente, los CTL también pueden ser inducidos mediante su uso ex vivo. En tal caso, después de la inducción de CTL, los CTL activados se devolverían al sujeto. Por ejemplo, un método de la presente invención para inducir CTL puede incluir las etapas de:

a) recoger APC de un sujeto;

b) poner en contacto las APC de la etapa a) con el péptido; y

35 c) cocultivar las APC de la etapa b con células CD8+.

Las APC que se van a cocultivar con las células CD8+ en la etapa c anterior también se pueden preparar al transferir un gen que incluye un polinucleótido de la presente invención adentro de APC como las descritas anteriormente en la sección "VI. Células que presentan antígeno"; pero no se limitan a las mismas y se pueden usar para este método cualesquiera APC que presenten eficazmente sobre su superficie un complejo de antígeno HLA y el péptido de la presente invención. En lugar de tales APC, también se pueden usar los exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención. A saber, la presente invención también contempla un método en el que exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención se cocultivan con células CD8+. Tales exosomas se pueden preparar mediante los métodos descritos anteriormente en la sección "V. Exosomas".

45

Por otra parte, el CTL se puede inducir al introducir un gen que incluye un polinucleótido que codifica la subunidad TCR que se une al péptido de la presente invención en células CD8+. Tal transducción se puede realizar como se describe anteriormente en la sección "VIII. Receptor de células T (TCR)".

- 5 Además, la presente invención proporciona un método o procedimiento para fabricar una sustancia o composición farmacéutica que induce CTL, en donde el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

(3) Método para inducir una respuesta inmunitaria

- 10 Además, la presente invención proporciona métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra enfermedades relacionadas con FOXM1. Enfermedades adecuadas incluyen cáncer, ejemplos del cual incluyen AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular. Los métodos incluyen la etapa de administrar sustancias o composiciones que contienen cualquiera de los péptidos de la presente invención o polinucleótidos que los codifican. El presente método de la invención también contempla la administración de exosomas o APC que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención. Para los detalles, véase el punto de "IX. Sustancias o composiciones farmacéuticas", particularmente la parte que describe el uso de las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención como vacunas. Además, los exosomas y las APC que se pueden emplear para los presentes métodos para inducir una respuesta inmunitaria se describen con detalle bajo los puntos de "V. Exosomas", "VI. Células que presentan antígeno (APC)" y (1) y (2) de "X. Métodos que usan los péptidos, exosomas, APC y CTL", anteriormente.
- 15
20

La presente invención también proporciona un método o procedimiento para fabricar una sustancia o composición farmacéutica que induce una respuesta inmunitaria, en donde el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25

Alternativamente, el método de la presente invención puede incluir la etapa de administrar una vacuna o una composición farmacéutica, que contiene:

- (a) un péptido de la presente invención;
- 30 (b) un ácido nucleico que codifica tal péptido que se divulga en la presente en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y
- (d) una célula T citotóxica de la presente invención

En la presente invención, un cáncer que sobreexpresa FOXM1 se puede tratar con estos ingredientes activos. El cáncer incluye, pero no se limita a, AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular. Según esto, antes de la administración de las vacunas o las composiciones farmacéuticas que contienen los ingredientes activos, es preferible confirmar si el nivel de expresión de FOXM1 en las células o los tejidos cancerosos que se van a tratar se mejora en comparación con células normales del mismo órgano. Así, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar un cáncer que (sobre)expresa FOXM1, método que incluye las etapas de:

35
40

- i) determinar el nivel de expresión de FOXM1 en células o tejido cancerosos obtenidos de un sujeto con el cáncer que se va a tratar;
- ii) comparar el nivel de expresión de FOXM1 con un control normal; y
- 45 iii) administrar al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en (a) a (d) descritos anteriormente a un sujeto con cáncer que sobreexpresa FOXM1 en comparación con un control normal. Alternativamente, la presente invención también proporciona una vacuna o composición farmacéutica que contiene al menos un componente seleccionado del grupo que consisten en (a) a (d) descritos anteriormente, para el uso en la administración a un sujeto que tiene un cáncer que sobreexpresa FOXM1. En otras palabras, la presente invención proporciona además un método para identificar a un sujeto que va a ser tratado con el polipéptido de FOXM1 de la presente invención, método que puede incluir la etapa de determinar un nivel de expresión de FOXM1 en células o tejido canceroso derivados del sujeto, en donde un incremento del nivel en comparación con un nivel de control
- 50

normal del gen indica que el sujeto tiene un cáncer que puede ser tratado con el polipéptido de FOXM1 de la presente invención. El método para tratar el cáncer de la presente invención se describirá con más detalle posteriormente.

5 Un sujeto que se va a tratar mediante el presente método es preferiblemente un mamífero. Mamíferos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, p. ej., un ser humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo y una vaca.

10 Según la presente invención, se determina el nivel de expresión de FOXM1 en las células o los tejidos cancerosos obtenidos de un sujeto. El nivel de expresión se puede determinar a nivel del producto (ácido nucleico) de transcripción, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARNm de FOXM1 se puede cuantificar usando sondas mediante métodos de hibridación (p. ej., hibridación Northern). La detección se puede llevar a cabo sobre un chip o genochip. El uso de un genochip es preferible para detectar el nivel de expresión de FOXM1. Los expertos en la técnica pueden preparar tales sondas utilizando la información de secuencia de FOXM1. Por ejemplo, el ADNc de FOXM1 se puede usar como las sondas. Si es necesario, las sondas se pueden marcar con un marcador adecuado, tal como colorantes, sustancias fluorescentes e isótopos, y el nivel de expresión del gen se puede detectar como la intensidad de los marcadores hibridados.

15 Por otra parte, el producto de transcripción de FOXM1 (p. ej., SEQ ID N°: 34) se puede cuantificar usando cebadores mediante métodos de detección basado en amplificación (p. ej., RT-PCR). Tales cebadores también se pueden preparar basándose en la información de secuencia disponible del gen.

20 Específicamente, una sonda o un cebador usado para el presente método se hibrida bajo condiciones restrictivas, moderadamente restrictivas o poco restrictivas al ARNm de FOXM1. Según se usa en la presente, la expresión "condiciones (de hibridación) restrictivas" se refiere a condiciones bajo las que una sonda o un cebador se hibridará a su secuencia diana, pero no a otras secuencias. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia y serán diferentes bajo diferentes circunstancias. Se observa una hibridación específica de secuencias más largas a temperaturas superiores que las secuencias más cortas. Generalmente, la temperatura de una condición restrictiva se selecciona para ser aproximadamente 5 grados C inferior que el punto de fusión térmica (T_m) para una secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. El T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, un pH y una concentración de ácido nucleico definidos) a la que 50% de las sondas complementarias a su secuencia diana se hibridan a la secuencia diana en el equilibrio. Puesto que las secuencias diana generalmente están presentes en exceso, en el T_m, 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio. Típicamente, las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor de aproximadamente 1,0 M de ion sodio, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de ion sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 grados C para sondas o cebadores cortos (p. ej., de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 grados C para sondas o cebadores más largos. Se pueden alcanzar condiciones restrictivas con la adición de sustancias desestabilizantes, tales como formamida.

25 Alternativamente, el producto de traducción se puede detectar para el diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, se puede determinar la cantidad de proteína de FOXM1 (SEQ ID N°: 34). Métodos para determinar la cantidad de la proteína como el producto de traducción incluyen métodos de inmunoensayo que usan un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Por otra parte, cualquier fragmento o modificación (p. ej., anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo se puede usar para la detección, con tal de que el fragmento o anticuerpo modificado retenga la capacidad de unión a proteína de FOXM1. Métodos para preparar estos tipos de anticuerpos para la detección de proteínas son muy conocidos en la técnica, y se puede emplear cualquier método en la presente invención para preparar tales anticuerpos y equivalentes de los mismos.

30 Como otro método para detectar el nivel de expresión de gen FOXM1 basándose en su producto de traducción, se puede observar la intensidad de la tinción a través de análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo contra proteína de FOXM1. A saber, en esta medida, una tinción fuerte indica una presencia incrementada de la proteína/el nivel y, al mismo tiempo, un alto nivel de expresión del gen FOXM1.

35 El nivel de expresión de un gen diana, p. ej., incluyendo el gen FOXM1, en células cancerosas se puede incrementar si el nivel se incrementa desde el nivel de control (p. ej., el nivel en células normales) del gen diana correspondiente en, por ejemplo, 10%, 25% o 50%; o se incrementa hasta más de 1,1 veces, más de 1,5 veces, más de 2,0 veces, más de 5,0 veces, más de 10,0 veces, o más.

40 El nivel de control se puede determinar al mismo tiempo con las células cancerosas al usar una muestra o muestras previamente recogidas y almacenadas de un sujeto/sujetos cuyo estado o estados de enfermedad (cancerosos o no cancerosos) se conocen. Además, células normales obtenidas de regiones no cancerosas de un órgano que tienen el cáncer que se va a tratar se pueden usar como un control normal. Alternativamente, el nivel de control se puede determinar mediante un método estadístico basándose en los resultados obtenidos al analizar un nivel o niveles de expresión previamente determinados del gen FOXM1 en muestras procedentes de sujetos cuyos estados de

- enfermedad se conocen. Por otra parte, el nivel de control se puede derivar de una base de datos de patrones de expresión procedentes de células previamente probadas. Por otra parte, según un aspecto de la presente invención, el nivel de expresión del gen FOXM1 en una muestra biológica se puede comparar con múltiples niveles de control, que se determinan a partir de múltiples muestras de referencia. Se prefiere usar un nivel de control determinado a partir de una muestra de referencia derivada de un tipo de tejido similar al de la muestra biológica derivada del sujeto. Por otra parte, se prefiere usar el valor estándar del nivel de expresión del gen FOXM1 en una población con un estado de enfermedad conocido. El valor estándar se puede obtener mediante cualquier método conocidos en la técnica. Por ejemplo, un intervalo de media \pm 2 D. E. o media \pm 3 D. E. se puede usar como el valor estándar.
- 5
- 10 En el contexto de la presente invención, un nivel de control determinado a partir de una muestra biológica que se sabe que no es cancerosa se denomina un "nivel de control normal". Por otra parte, si el nivel de control se determina a partir de una muestra biológica cancerosa, se denomina un "nivel de control canceroso".
- 15 Cuando el nivel de expresión del gen FOXM1 se incrementa en comparación con el nivel de control normal o es similar/equivalente al nivel de control canceroso, el sujeto puede ser diagnosticado con el cáncer que se va a tratar. Más específicamente, la presente invención proporciona un método para (i) diagnosticar si un sujeto tiene el cáncer que se va a tratar y/o (ii) seleccionar a un sujeto para el tratamiento del cáncer, método que incluye las etapas de:
- a) determinar el nivel de expresión de FOXM1 en células o tejido o tejidos cancerosos obtenidos de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que se va a tratar;
- 20 b) comparar el nivel de expresión de FOXM1 con un nivel de control normal;
- c) diagnosticar que el sujeto tiene el cáncer que se va a tratar, si el nivel de expresión de FOXM1 se incrementa en comparación con el nivel de control normal; y
- d) seleccionar al sujeto para el tratamiento del cáncer, si se diagnostica que el sujeto tiene el cáncer que se va a tratar, en la etapa c).
- 25 Alternativamente, tal método incluye las etapas de:
- a) determinar el nivel de expresión de FOXM1 en células o tejido o tejidos cancerosos obtenidos de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que se va a tratar;
- b) comparar el nivel de expresión de FOXM1 con un nivel de control canceroso;
- 30 c) diagnosticar que el sujeto tiene el cáncer que se va a tratar, si el nivel de expresión de FOXM1 es similar o equivalente al nivel de control canceroso; y
- d) seleccionar al sujeto para el tratamiento del cáncer, si se diagnostica que el sujeto tiene el cáncer que se va a tratar, en la etapa c).
- 35 La presente invención también proporciona un estuche para determinar un sujeto que sufre el cáncer que se va a tratar con el polipéptido de FOXM1 de la presente invención, lo que también puede ser útil para evaluar y/o verificar la eficacia de una inmunoterapia del cáncer. Preferiblemente, el cáncer incluye, pero no se limita a, AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular. Más particularmente, el estuche incluye preferiblemente al menos un reactivo para detectar la expresión del gen FOXM1 en una célula cancerosa derivada de un sujeto, reactivo que se puede seleccionar del grupo de:
- 40 (a) un reactivo para detectar ARNm del gen FOXM1;
- (b) un reactivo para detectar la proteína de FOXM1; y
- (c) un reactivo para detectar la actividad biológica de la proteína de FOXM1.
- 45 Reactivos adecuados para detectar ARNm del gen FOXM1 incluyen ácidos nucleicos que se unen específicamente a o identifican el ARNm de FOXM1, tales como oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria con una porción del ARNm de FOXM1. Estos tipos de oligonucleótidos se ejemplifican por cebadores y sondas que son específicos para el ARNm de FOXM1. Estos tipos de oligonucleótidos se pueden preparar basándose en métodos

muy conocidos en la técnica. Si es necesario, el reactivo para detectar el ARNm de FOXM1 se puede inmovilizar sobre una matriz sólida. Por otra parte, se puede incluir en el estuche más de un reactivo para detectar el ARNm de FOXM1.

5 Por otra parte, reactivos adecuados para detectar la proteína de FOXM1 incluyen anticuerpos para la proteína de FOXM1. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Por otra parte, se puede usar como el reactivo cualquier fragmento o modificación (p. ej., anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo, con tal de que el fragmento o el anticuerpo modificado retenga la capacidad de unión a la proteína de FOXM1. Métodos para preparar estos tipos de anticuerpos para la detección de proteínas son muy conocidos en la técnica, y se puede emplear en la presente invención cualquier método para preparar tales anticuerpos y equivalentes de los mismos. Por otra parte, el anticuerpo se puede marcar con moléculas generadoras de señales a través de un enlace directo o una técnica de marcaje indirecta. Marcadores y métodos para marcar anticuerpos y detectar la unión de anticuerpos a sus dianas son muy conocidos en la técnica y cualesquiera marcadores y métodos se pueden emplear para la presente invención. Además, se puede incluir en el estuche más de un reactivo para detectar la proteína de FOXM1.

15 El estuche puede contener más de uno de los susodichos reactivos. Por ejemplo, muestras de tejido obtenidas de sujetos sin cáncer o que sufren cáncer o no pueden servir como reactivos de control útiles. Un estuche de la presente invención puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos (p. ej., escritos, grabados, CD-ROM, etc.) con instrucciones de uso. Estos reactivos y similares pueden estar contenidos en un recipiente con una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

25 En una realización de la presente invención, cuando el reactivo es una sonda contra el ARNm de FOXM1, el reactivo puede estar inmovilizado sobre una matriz sólida, tal como una tira porosa, para formar al menos un sitio de detección. La región de medida o detección de la tira porosa puede incluir una pluralidad de sitios, que contiene cada uno un ácido nucleico (sonda). Una tira de prueba también puede contener sitios para controles negativos y/o positivos. Alternativamente, los sitios de control pueden estar situados sobre una tira separada de la tira de prueba. Opcionalmente, los diferentes sitios de detección pueden contener diferentes cantidades de ácidos nucleicos inmovilizados, es decir, una cantidad superior en el primer sitio de detección y cantidades menores en sitios posteriores. Al añadir una muestra de prueba, el número de sitios que exhiben una señal detectable proporciona una indicación cuantitativa de la cantidad de ARNm de FOXM1 presente en la muestra. Los sitios de detección pueden estar configurados en una conformación adecuadamente detectable y están típicamente en la conformación de una barra o punto que se extiende a lo ancho de una tira de prueba.

35 El estuche de la presente invención puede incluir además una muestra de control positivo o muestra estándar de FOXM1. La muestra de control positivo de la presente invención se puede preparar al recoger muestras positivas a FOXM1 y a continuación ensayar sus niveles de FOXM1. Alternativamente, una proteína o un polinucleótido de FOXM1 purificados se puede añadir a células que no expresan FOXM1 para formar la muestra positiva o la muestra de FOXM1. En la presente invención, el FOXM1 purificado puede ser una proteína recombinante. El nivel de FOXM1 de la muestra de control positivo es, por ejemplo, mayor que el valor de corte.

45 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar a un experto normal a elaborar y usar la misma. Los ejemplos no pretenden de ningún modo limitar de otra forma el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Materiales y métodos

Líneas celulares

50 TISI, una línea celular linfoblastoide B positiva a HLA-A*2402, se adquirió de the IHWG Cell and Gene Bank (Seattle, WA). COS7, una línea celular de riñón de mono verde africano, se adquirió de ATCC.

Selección de candidatos de péptidos derivados de FOXM1

55 Péptidos 9meros y 10meros derivados de FOXM1 que se unen a la molécula HLA-A*2402 se predijeron usando el software de predicción de la unión "BIMAS" (www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker y cols. (J Immunol 1994, 152(1): 163-75), Kuzushima y cols. (Blood 2001, 98(6): 1872-81)) y "NetMHC 3.0" (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus y cols. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003), Nielsen y cols. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004)). Estos péptidos fueron sintetizados por Biosynthesis (Lewisville, Texas) según un método de síntesis en fase sólida estándar y se purificaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase inversa. La pureza (>90%) y la identidad de los péptidos se determinaron

mediante HPLC analítica y análisis por espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en dimetilsulfóxido a 20 mg/ml y se almacenaron a -80 grados C.

Inducción de CTL in vitro

5 Se usaron células dendríticas (DC) derivadas de monocitos como células que presentan antígeno para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra péptidos presentados sobre antígeno leucocitario humano (HLA). Las DC se generaron in vitro según se describe en otras partes (Nakahara S y cols., *Cancer Res* 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8). Específicamente, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un voluntario normal (positivo a HLA-A*2402) mediante solución Ficoll-Plaques (Pharmacia) se separaron mediante adherencia a un disco de cultivo tisular de plástico (Becton Dickinson) a fin de enriquecerlas como la fracción monocítica.

10 La población enriquecida en monocitos se cultivó en presencia de 1.000 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (R&D System) y 1.000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D System) en AIM-V Medium (Invitrogen) que contenía 2% de suero autólogo (AS) inactivado térmicamente. Después de 7 días de cultivo, las DC inducidas con citocina se impulsaron con 20 micro-g/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en presencia de 3 micro-g/ml de microglobulina β 2 durante 3 h a 37 grados C en AIM-V Medium. Las células generadas parecían expresar moléculas asociadas a DC, tales como CD80, CD83, CD86 y HLA clase II, sobre sus superficies celulares (datos no mostrados). Estas DC impulsadas con péptido se inactivaron a continuación mediante irradiación X (20 Gy) y se mezclaron en una relación 1:20 con células T CD8+ autólogas, obtenidas mediante selección positiva con CD8 Positive Isolation Kit (Dyna). Estos cultivos se establecieron en placas de 48 pocillos (Corning); cada pocillo contenía $1,5 \times 10^4$ DC impulsadas con péptido, 3×10^5 células T CD8+ y 10 ng/ml de IL-7 (R&D System) en 0,5 ml de medio AIM-V/2% de AS. Tres días más tarde, estos cultivos se complementaron con IL-2 (CHIRON) hasta una concentración final de 20 IU/ml. Los días 7 y 14, las células T se estimularon adicionalmente con las DC autólogas impulsadas con péptido. Las DC se prepararon cada vez mediante el mismo método que se describe anteriormente. Los CTL se probaron contra células TISI impulsadas con péptido después de la 3ª ronda de estimulación con péptido el día 21 (Tanaka H y cols., *Br J Cancer* 5 enero 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y cols., *Br J Cancer* 20 abril 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y cols., *Clin Cancer Res* 15 dic. 2004, 10(24): 8577-86; Watanabe T y cols., *Cancer Sci* agosto 2005, 96(8): 498-506; Suda T y cols., *Cancer Sci* mayo 2006, 97(5): 411-9).

Procedimiento de expansión de CTL

30 Los CTL se expandieron en cultivo usando el método similar al descrito por Riddell y cols. (Walter EA y cols., *N Engl J Med* 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR y cols., *Nat Med* 1996 Feb, 2(2): 216-23). Un total de 5×10^4 CTL se suspendieron en 25 ml de medio AIM-V/5% de AS con 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas, inactivadas mediante mitomicina C, en presencia de 40 ng/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen). Un día después de iniciar los cultivos, se añadieron a los cultivos 120 IU/ml de IL-2. Los cultivos se alimentaron con medio AIM-V/5% de AS reciente que contenía 30 IU/ml de IL-2 los días 5, 8 y 11 (Tanaka H y cols., *Br J Cancer* 5 enero 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y cols., *Br J Cancer* 20 abril 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y cols., *Clin Cancer Res* 15 dic. 2004, 10(24): 8577-86; Watanabe T y cols., *Cancer Sci* agosto 2005, 96(8): 498-506; Suda T y cols., *Cancer Sci* mayo 2006, 97(5): 411-9).

40 Establecimiento de colonias de CTL

Las diluciones se realizaron para tener 0,3, 1 y 3 CTL/pocillo en una placa de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos (Nalge Nunc International). Los CTL se cultivaron con 1×10^4 células/pocillo de 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas, 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 y 125 U/ml de IL-2 en un total de 150 micro-l/pocillo de AIM-V Medium que contenía 5% de AS. Se añadieron al medio 50 micro-l/pocillo de IL-2 10 días después a fin de alcanzar una concentración final de 125 U/ml de IL-2. La actividad de CTL se probó el día 14º, y los clones de CTL se expandieron usando el mismo método que se describe anteriormente (Uchida N y cols., *Clin Cancer Res* 15 dic. 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., *Cancer Sci* mayo 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., *Cancer Sci* agosto 2005, 96(8): 498-506).

Actividad de CTL específica

50 Para examinar la actividad de CTL específica, se realizaron un ensayo de inmunotransferencia con enzimas ligadas (ELISPOT) de interferón (IFN)- γ y un ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas (ELISA) de IFN- γ . Específicamente, se preparó TISI impulsada con péptido (1×10^4 células/pocillo) como células estimulantes. Las células cultivadas en 48 pocillos se usaron como células que responden. El ensayo ELISPOT de IFN- γ y el ensayo ELISA de IFN- γ se realizaron bajo el procedimiento de fabricación.

55

Transfección de plásmidos

5 El ADNc que codifica un marco de lectura abierto de genes diana o HLA-A*2402 se amplificó mediante PCR. Los productos amplificados por PCR se clonaron en el vector pCAGGS. Los plásmidos se transfectaron en COS7, que son los genes diana, y la línea celular negativa a HLA-A24, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según los procedimientos recomendados por el fabricante. Después de 2 días desde la transfección, las células transfectadas se recogieron con Versene (Invitrogen) y se usaron como las células diana (5×10^4 células/pocillo) para el ensayo de actividad de CTL.

Resultados

Predicción de péptidos que se unen a HLA-A24 derivados de FOXM1

10 Las Tablas 1a y 1b muestran los péptidos 9meros y 10meros de FOXM1 que se unen a HLA-A24 en el orden de alta afinidad de unión. Se predijeron 29 péptidos (SEQ ID N°: 1-12 y SEQ ID N°: 15-31) mediante BIMAS y se predijeron 3 péptidos (SEQ ID N°: 13-14 y SEQ ID N°: 32) mediante NetMHC 3.0. Un total de 32 péptidos con capacidad de unión a HLA-A24 potencial se seleccionaron y examinaron para determinar los péptidos epitópicos.

15 Tabla 1a
Péptidos 9meros derivados de FOXM1 que se unen a HLA-A24

Posición de partida	secuencia de aminoácidos	puntuación	SEQ ID N°
316	RYLTLDQVF	432	1
262	IYTWIEDHF	140	2
451	LFNFIFLCL	50,4	3
455	IFLCLSVLL	36	4
483	LFGEgFSPL	28,8	5
443	DFGTPITSL	20	6
351	RNMTIKTEL	18,48	7
57	KFPAGIKII	15	8
133	RTEVTLETL	12	9
754	RSLTEGLVL	12	10
429	VFGYMSKFF	10	11
436	FFSGDLRDF	10	12
Posición de partida	secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
524	EWSPAPSF	99	13
241	YMAMIQFAI	421	14

20 Tabla 1b
Péptidos 10meros derivados de FOXM1 que se unen a HLA-A24

Posición de partida	Secuencia de aminoácidos	puntuación	SEQ ID N°
627	SYSQeVGGPF	140	15
240	SYMAmIQFAI	105	16
777	SFPg1DEDPL	30	17
453	NFIFICLSVL	30	18
382	QFPVnQSLVL	30	19
483	LFGEgFSPLL	24	20
435	KFFSgDLRDF	20	21
396	KVPLpLAASL	14,4	22

Posición de partida	Secuencia de aminoácidos	puntuación	SEQ ID N°
325	KPLDpGSPQL	14.4	23
443	DFGTpITSLF	14	24
318	LTLdqVFKPL	12,096	25
713	RLLSsEPLDL	12	26
513	RPIKvESPPL	12	27
7	RPLI1KRRRL	12	28
376	SYLVpIQFPV	10.5	29
390	VLQPsVKVPL	10,08	30
238	PYSYmAMIQF	10	31
Posición de partida	Secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID N°
264	TWIEDHFPYF	20	32

La posición de partida indica el número de residuos de aminoácido desde el extremo N de FOXM1
La puntuación de unión y la constante de disociación [Kd (nM)] se derivan de "BIMAS" y "NetMHC 3.0".

- 5 Inducción de CTL con los péptidos predichos procedentes de FOXM1 restringida con HLA-A*2402 y establecimiento para líneas de CTL estimuladas con péptidos derivados de FOXM1

Se generaron CTL para esos péptidos derivados de FOXM1 según los protocolos que se describen en "Materiales y métodos". La actividad de CTL específica del péptido se determinó mediante ensayo de IFN- γ (Figs. 1a-g). Mostraba que los números de pocillo n° 1, n° 4 y n° 7 estimulados con FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2) (a), n° 7 con FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID N°: 7) (b), n° 5 con FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID N°: 8) (c), n° 3 con FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID N°: 16) (d), n° 6 con FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID N°: 25) (e), n° 4 con FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID N°: 30) (f) y n° 5 con FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID N°: 31) (g) demostraban una potente producción de IFN- γ en comparación con los pocillos de control. Por otra parte, no se podía detectar una producción de IFN- γ potente mediante estimulación con otros péptidos mostrados en las Tablas 1a y 1b, a pesar de que esos péptidos tenían una posible actividad de unión con HLA-A*2402. Por ejemplo, datos negativos típicos de respuesta de CTL estimulada con FOXM1-A24-9-316 (SEQ ID N°: 1) contra células diana impulsadas por péptido (h). Como resultado, indicaba que 7 péptidos derivados de FOXM1 se cribaron como los péptidos que podían inducir CTL potentes.

Establecimiento de líneas y clones de CTL contra péptidos derivados de FOXM1

Las células que mostraban actividad de CTL específica del péptido detectada mediante ensayo ELISPOT de IFN- γ ELISPOT en los números de pocillo n° 4 con FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2) (a), n° 3 con FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID N°: 16) (b), n° 6 con FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID N°: 25) (c) y n° 5 con FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID N°: 31) (d) se expandieron y establecieron líneas de CTL. La actividad de esas líneas de CTL se determinó mediante el ensayo ELISA de IFN- γ (Figs. 2a-d). Mostraba que todas las líneas de CTL demostraban una potente producción de IFN- γ contra las células diana impulsadas con el péptido correspondiente en comparación con células diana sin impulso con péptido. Por otra parte, se establecieron clones de CTL mediante dilución limitativa a partir de las líneas de CTL, y la producción de IFN- γ a partir de clones de CTL contra células diana impulsadas con péptido se determinó mediante un ensayo ELISA de IFN- γ . Se determinó una producción de IFN- γ potente a partir de clones de CTL estimulados con FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2) (a), FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID N°: 16) (b) y FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID N°: 31) (c) en la Fig. 3.

- 30 Actividad de CTL específica contra células diana que expresan exógenamente FOXM1 u HLA-A*2402

Las líneas y los clones de CTL establecidos producidos contra estos péptidos se examinaron con respecto a su capacidad para reconocer células diana que expresan endógenamente el gen FOXM1 y HLA-A*2402. La actividad de CTL específica contra células COS7 que se transfectan tanto con la longitud completa de FOXM1 como con el gen HLA-A*2402 (un modelo específico para las células diana que expresan exógenamente el gen FOXM1 y HLA-A*2402) se probó usando las líneas y los clones de CTL producidos por el péptido correspondiente como células efectoras. Células COS7 transfectadas bien con la longitud completa de los genes FOXM1 o bien con HLA-A*2402 se prepararon como controles. En la Fig. 4, los CTL estimulados con FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2) mostraban una potente actividad de CTL contra células COS7 que expresan tanto FOXM1 como HLA-A*2402. Por otra parte,

no se detectaba una actividad de CTL específica significativa contra los controles. Así, estos datos demuestran claramente que el péptido de FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2) se procesaba y expresaba endógenamente sobre las células diana con la molécula de HLA-A*2402 y era reconocido por los CTL. Estos resultados indican que este péptido derivado de FOXM1 puede estar disponible para aplicar las vacunas para el cáncer para pacientes con tumores que expresan FOXM1.

Análisis de homología de péptidos antigénicos

Los CTL estimulados con FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2), FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID N°: 7), FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID N°: 8), FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID N°: 16), FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID N°: 25), FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID N°: 30) y FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID N°: 31) mostraban una actividad de CTL significativa y específica. Esto se puede deber a hecho de que las secuencias de FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2), FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID N°: 7), FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID N°: 8), FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID N°: 16) FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID N°: 25) FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID N°: 30) y FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID N°: 31) son homólogas a péptidos derivados de otras moléculas que se sabe que sensibilizan el sistema inmunitario humano. Para excluir esta posibilidad, se realizaron análisis de homología para estas secuencias peptídicas usando como interrogantes el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) que no revelaba ninguna secuencia con homología significativa. Los resultados de los análisis de homología indican que las secuencias de FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID N°: 2), FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID N°: 7), FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID N°: 8), FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID N°: 16) FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID N°: 25) FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID N°: 30) and FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID N°: 31) son únicas y, así, existe poca posibilidad, al mejor entendimiento de los presentes inventores, de que estas moléculas provoquen una respuesta inmunológica no pretendida a alguna molécula no relacionada.

En conclusión, se identificaron nuevos péptidos epitópicos de HLA-A24 derivados de FOXM1. Por otra parte, se demostró que el péptido epitópico de FOXM1 puede ser aplicable a la inmunoterapia del cáncer.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona nuevos TAA, particularmente los derivados de FOXM1, que inducen respuestas antitumorales potentes y específicas y tienen aplicabilidad en una amplia gama de tipos de cáncer. Tales TAA son útiles como vacunas peptídicas contra enfermedades asociadas con FOXM1, p. ej., cáncer, más particularmente, AML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer hepático, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejidos blandos y tumor testicular.

Lista de secuencias

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDOS DE FOXM1 Y VACUNAS QUE CONTIENEN LOS MISMOS

<130> ONC-A0901P

5 <150> US 61/153,408

< 151> 2009-02-18

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15 <400> 1

Arg Tyr Leu Thr Leu Asp Gln Val Phe
1 5

<210> 2

< 211> 9

< 212> PRT

20 < 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 2

Ile Tyr Thr Trp Ile Glu Asp His Phe
1 5

25 <210> 3

< 211> 9

< 212> PRT

<400> 6

Asp Phe Gly Thr Pro Ile Thr Ser Leu
1 5

<210> 7

< 211> 9

5 < 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 7

10 **Arg Asn Met Thr Ile Lys Thr Glu Leu**
1 5

<210> 8

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial

15 <220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 8

Lys Phe Pro Ala Gly Ile Lys Ile Ile
1 5

<210> 9

20 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

25 <400> 9

Arg Thr Glu Val Thr Leu Glu Thr Leu
1 5

<210> 10

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial

5 <220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 10

Arg Ser Leu Thr Glu Gly Leu Val Leu
1 5

<210> 11

10 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15 <400> 11

Val Phe Gly Tyr Met Ser Lys Phe Phe
1 5

<210> 12

< 211> 9

< 212> PRT

20 < 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 12

Phe Phe Ser Gly Asp Leu Arg Asp Phe

25

1 5

<210> 13

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

5 < 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 13

Glu Trp Pro Ser Pro Ala Pro Ser Phe
1 5

<210> 14

< 211> 9

10 < 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 14

15 **Tyr Met Ala Met Ile Gln Phe Ala Ile**
1 5

<210> 15

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial

20 <220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 15

Ser Tyr Ser Gln Glu Val Gly Gly Pro Phe
1 5 10

<210> 16

25 < 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 16

Ser Tyr Met Ala Met Ile Gln Phe Ala Ile
1 5 10

5 <210> 17

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

10 < 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 17

Ser Phe Pro Gly Leu Asp Glu Asp Pro Leu
1 5 10

<210> 18

< 211> 10

15 < 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 18

20 **Asn Phe Ile Phe Leu Cys Leu Ser Val Leu**
1 5 10

<210> 19

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial

25 <220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 19

Gln Phe Pro Val Asn Gln Ser Leu Val Leu
1 5 10

<210> 20

< 211> 10

< 212> PRT

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 20

Leu Phe Gly Glu Gly Phe Ser Pro Leu Leu
1 5 10

10 <210> 21

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

15 < 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 21

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

<210> 22

< 211> 10

20 < 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 22

25 **Lys Val Pro Leu Pro Leu Ala Ala Ser Leu**
1 5 10

<210> 23

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 26

Arg Leu Leu Ser Ser Glu Pro Leu Asp Leu
1 5 10

5 <210> 27

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

10 < 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 27

Arg Pro Ile Lys Val Glu Ser Pro Pro Leu
1 5 10

<210> 28

< 211> 10

15 < 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 28

20 **Arg Pro Leu Ile Leu Lys Arg Arg Arg Leu**
1 5 10

<210> 29

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial

25 <220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 29

Ser Tyr Leu Val Pro Ile Gln Phe Pro Val
1 5 10

<210> 30

< 211> 10

< 212> PRT

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 30

Val Leu Gln Pro Ser Val Lys Val Pro Leu
1 5 10

10 <210> 31

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

15 < 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 31

Pro Tyr Ser Tyr Met Ala Met Ile Gln Phe
1 5 10

<210> 32

< 211> 10

20 < 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 32

25 **Thr Trp Ile Glu Asp His Phe Pro Tyr Phe**
1 5 10

<210> 33

ES 2 618 896 T3

< 211> 3641

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 33

```
actgaaagct ccggtgccag accccacccc cggccccggc ccgggacccc ctcccctccc      60
gggatcccc ggggttccca ccccgcccgc accgcccggg acccggccgg tccggcgcga      120
gccccctcc ggggccctgg ctcgcccccc aggttgagg agcccggagc ccgccttcgg      180
agctacggcc taacggcggc ggcgactgca gtctggaggg tccacacttg tgattctcaa      240
tggagagtga aaacgcagat tcataatgaa aactagcccc cgtcggccac tgattctcaa      300
5 aagacggagg ctgccccttc ctgttcaaaa tgcccgaagt gaaacatcag aggaggaacc      360
```

ES 2 618 896 T3

taagagatcc cctgccaac aggagtctaa tcaagcagag gcctccaagg aagtggcaga 420
 gtccaactct tgcaagtffc cagctgggat caagattatt aaccaccca ccatgcccaa 480
 cacgcaagta gtggccatcc ccaacaatgc taatattcac agcatcatca cagcactgac 540
 tgccaagga aaagagagtg gcagtagtg gcccaacaaa ttcacctca tcagctgtgg 600
 gggagcccca actcagcctc caggactccg gcctcaaacc caaaccagct atgatgccaa 660
 aaggacagaa gtgaccctgg agaccttggg accaaaacct gcagctaggg atgtgaatct 720
 tcctagacca cctggagccc tttgcgagca gaaacgggag acctgtgcag atggtgaggg 780
 agcaggctgc actatcaaca atagcctatc caacatccag tggcttcgaa agatgagttc 840
 tgatggactg ggctcccga gcatcaagca agagatggag gaaaaggaga atgtcacct 900
 ggagcagcga caggttaagg ttgaggagcc ttcgagacca tcagcgtcct ggcagaactc 960
 tgtgtctgag cgccaccct actcttacet ggccatgata caattcgcca tcaacagcac 1020
 tgagaggag cgcatgactt tgaaagacat ctatactggg attgaggacc actttcccta 1080
 cttaagcac attgccaagc caggctggaa gaactccatc cgccacaacc tttccctgca 1140
 cgacatgttt gtccgggaga cgtctgcca tggcaaggtc tccttctgga ccattcacc 1200
 cagtgccaac cgctacttga cattggacca ggtgtttaag ccactggacc cagggtctcc 1260
 acaattgcc gagcacttgg aatcacagca gaaacgaccg aatccagagc tccgcccga 1320
 catgaccatc aaaaccgaac tccccctggg cgcacggcgg aagatgaagc cactgctacc 1380
 acgggtcagc tcatacctgg tacctatcca gttcccgtg aaccagtcac tgggtttgca 1440
 gccctcgtg aaggtgccat tgcccctggc ggcttccctc atgagctcag agcttgcgg 1500
 ccatagcaag cgagtccgca ttgccccaa ggtttttggg gaacagggtg tgtttggtta 1560
 catgagtaag ttctttagtg gcgatctgag agattttggt acacccatca ccagcttgtt 1620
 taatthtatc tttctttggt tatcagtgt gctagctgag gagggatag ctctctttc 1680
 ttctgcagga ccagggaaag aggagaaact cctgtttgga gaagggttt ctctttgct 1740
 tccagttcag actatcaagg aggaagaaat ccagcctggg gaggaatgc cacacttagc 1800
 gagaccatc aaagtggaga gccctccctt ggaagagtgg ccctccccgg cccatcttt 1860
 caaagaggaa tcatctcact cctgggagga ttcgtcccaa tctcccacc caagaccca 1920
 gaagtcctac agtgggctta ggtccccaac ccggtgtgtc tcggaatgc ttgtgattca 1980
 acacaggag aggagggaga ggagccggtc tcggaggaaa cagcatctac tgcctccctg 2040
 tgtggatgag ccggagctgc tcttctcaga ggggccagct acttcccgt gggccgaga 2100
 gctcccgttc ccagcagact cctctgacct tgccctccag ctcaactact cccaggaagt 2160

ES 2 618 896 T3

gggaggacct ttttaagacac ccattaagga aacgctgcc atctcctcca ccccgagcaa 2220
 atctgtcctc ccagaacccc ctgaatcctg gaggctcacg cccccagcca aagtaggggg 2280
 actggatttc agcccagtac aaacctccca ggggtcctct gacccttgc ctgacccct 2340
 ggggctgatg gatctcagca ccactccctt gcaaagtgt ccccccttg aatcaccgca 2400
 aaggctcctc agttcagaac ccttagacct catctccgtc cccttggca actcttctcc 2460
 ctcatatata gacgtcccca agccaggctc cccggagcca caggtttctg gccttgacgc 2520
 caatcgttct ctgacagaag gcctggtcct ggacacaatg aatgacagcc tcagcaagat 2580
 cctgctggac atcagcttct ctggcctgga cgaggacca ctgggccctg acaacatcaa 2640
 ctggtcccag tttattcctg agctacagta gagccctgcc cttgccctg tgctcaagct 2700
 gtccaccatc ccgggcactc caaggctcag tgcaccccaa gcctctgagt gaggacagca 2760
 ggcagggact gttctgctcc tcatagctcc ctgctgcctg attatgcaa agtagcagtc 2820
 acaccetage cactgctggg acctgtgtt cccaagagt atctgattcc tctgctgtcc 2880
 ctgccaggag ctgaagggtg ggaacaaca aggcaatggt gaaaagagat taggaacccc 2940
 ccagcctgtt tccattctct gccagcagt ctcttacctt ccctgatctt tgcagggtgg 3000
 tccgtgtaa tagtataaat tctccaaatt atcctctaat tataaatgta agcttatttc 3060
 cttgatcat tatccagaga ctgccagaag gtgggtagga tgacctgggg tttcaattga 3120
 cttctgttcc ttgcttttag ttttgataga agggaagacc tgcagtgcac ggtttcttc 3180
 aggctgaggt acctggatct tgggttcttc actgcaggga ccagacaag tggatctgct 3240
 tgccagagtc ctttttgccc ctccctgcca cctccccgtg tttccaagtc agcttctctg 3300
 caagaagaaa tcctggttaa aaaagtctt tgtattgggt caggagtga atttgggggtg 3360
 ggaggatgga tgcaactgaa gcagagtgtg ggtgccaga tgtgcgctat tagatgttcc 3420
 tctgataatg tccccaatca taccaggag actggcattg acgagaactc aggtggaggc 3480
 ttgagaaggc cgaaagggcc cctgacctgc ctggcttct tagcttgccc ctgaccttg 3540
 caaagagcca ccctaggccc cagctgaccg catgggtgtg agccagcttg agaactaa 3600
 ctactcaata aaagcgaag tggacaaaa aaaaaaaaa a 3641

<210> 34

< 211> 801

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 34

Met Lys Thr Ser Pro Arg Arg Pro Leu Ile Leu Lys Arg Arg Arg Leu

ES 2 618 896 T3

725

730

735

Val Pro Lys Pro Gly Ser Pro Glu Pro Gln Val Ser Gly Leu Ala Ala
740 745 750

Asn Arg Ser Leu Thr Glu Gly Leu Val Leu Asp Thr Met Asn Asp Ser
755 760 765

Leu Ser Lys Ile Leu Leu Asp Ile Ser Phe Pro Gly Leu Asp Glu Asp
770 775 780

Pro Leu Gly Pro Asp Asn Ile Asn Trp Ser Gln Phe Ile Pro Glu Leu
785 790 795 800

Gln

<210> 35

< 211> 22

< 212> ADN

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> Secuencia artificial

<400> 35

gtctaccagg cattcgcttc at 22

10 <210> 36

< 211> 24

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

15 < 223> Secuencia artificial

<400> 36

tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 37

< 211> 21

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Secuencia artificial

5 <400> 37

tcagaaatcc ttctcttga c 21

<210> 38

< 211> 24

< 212> ADN

10 < 213> Artificial

<220>

< 223> Secuencia artificial

<400> 38

ctagcctctg gaatccttc tctt 24

15

REIVINDICACIONES

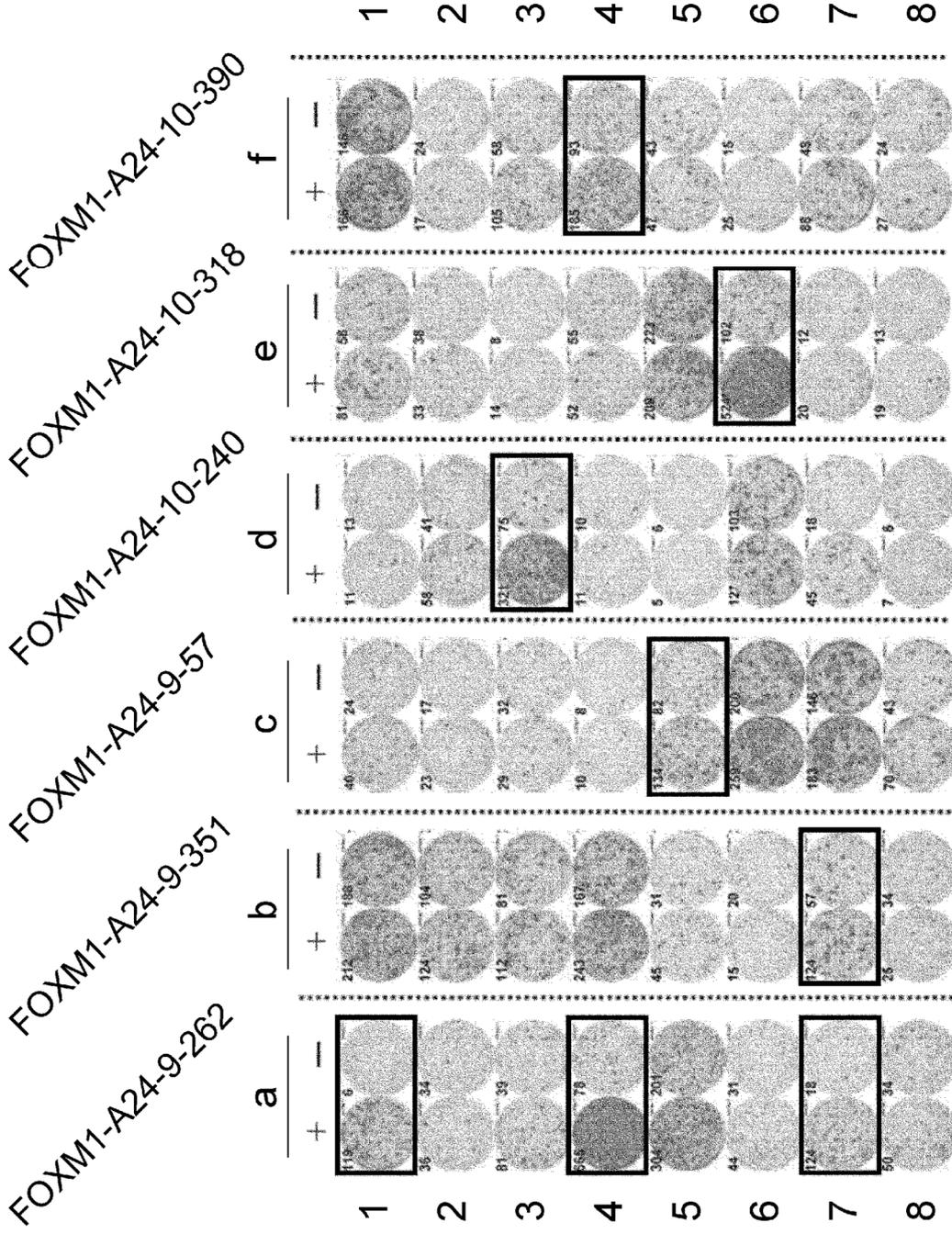
1. Un péptido de menos de 15 aminoácidos que se une a un antígeno HLA que tiene capacidad de inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL), en donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 (i) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31; y
- (ii) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31 en la que 1 o 2 aminoácidos se insertan, se sustituyen, se suprimen o se añaden.
2. El péptido según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31.
- 10 3. El péptido según la reivindicación 1, que tiene una o ambas de las siguientes características:
- (a) el segundo aminoácido desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31 está sustituido por fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano; y
- 15 (b) el aminoácido C-terminal de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 2, 7, 8, 16, 25, 30 y 31 está sustituido por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina
4. Un polinucleótido que codifica un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una composición para inducir un CTL, en donde la composición comprende uno o más péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o uno o más polinucleótidos según la reivindicación 4.
- 20 6. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento y/o la profilaxis de cánceres, y/o la prevención de la recidiva posoperatoria de los mismos, en donde la composición comprende uno o más péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o uno o más polinucleótidos según la reivindicación 4.
- 25 7. La composición farmacéutica según la reivindicación 6, que se formula para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24.
8. La composición farmacéutica según la reivindicación 6 o 7, que se formula para tratar el cáncer.
- 30 9. Un método para inducir una célula que presenta antígeno (APC) con capacidad de inducción de CTL, en donde el método comprende una de las siguientes etapas:
- (a) poner en contacto una APC con un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 in vitro o ex vivo; y
- (b) introducir un polinucleótido que codifica un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una APC in vitro o ex vivo.
10. Un método para inducir un CTL en donde el método comprende al menos una de las siguientes etapas:
- 35 (a) cocultivar células T CD8+ con APC, que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
- (b) cocultivar células T CD8+ con exosomas, que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
- 40 (c) introducir un gen que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de una subunidad receptora de células T (TCR) que se une a un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una célula T.
11. Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 45 12. La APC según la reivindicación 11, que se induce mediante el método según la reivindicación 9.
13. Un CTL aislado que elige como diana un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

14. El CTL según la reivindicación 13, que se induce mediante el método según la reivindicación 10.

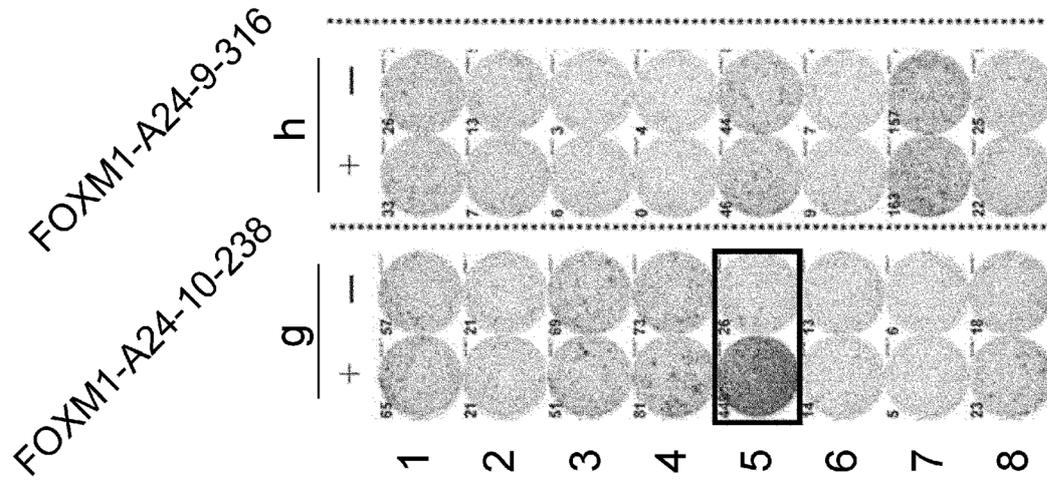
5 15. Un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un polinucleótido que codifica el péptido para el uso en el tratamiento del cáncer.

16. Uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un polinucleótido que codifica el péptido para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer.

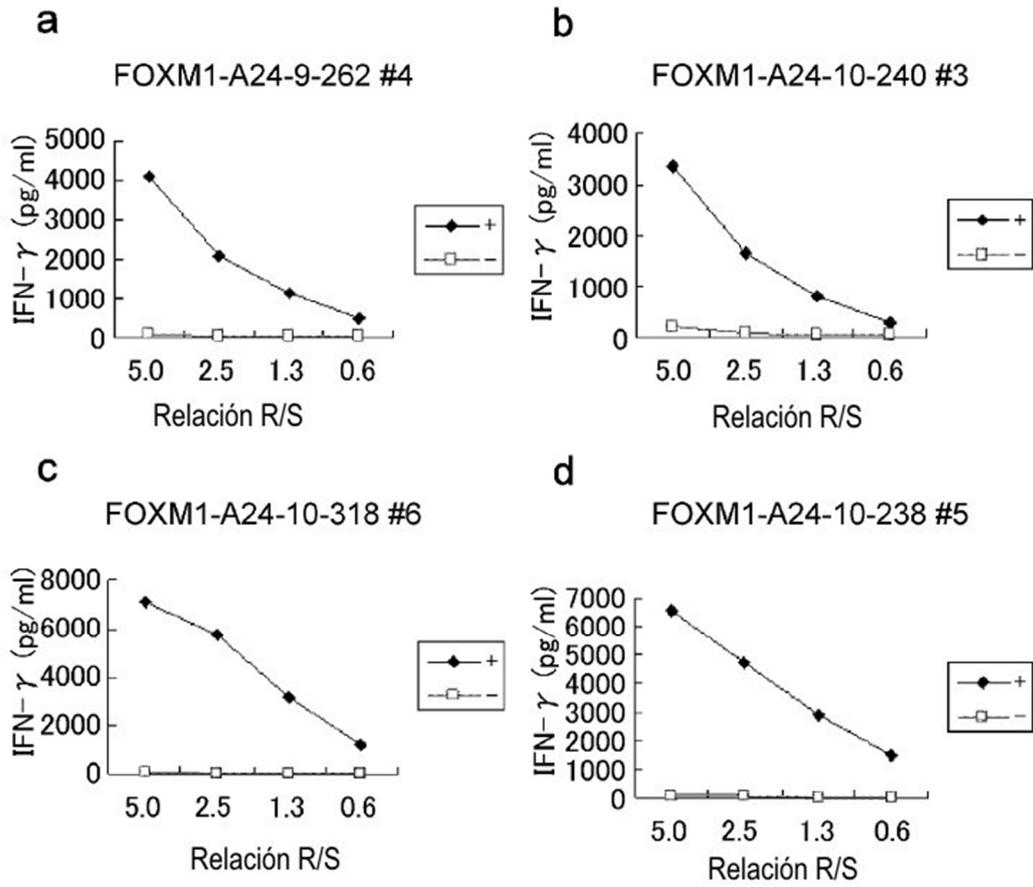
[Fig. 1a-f]



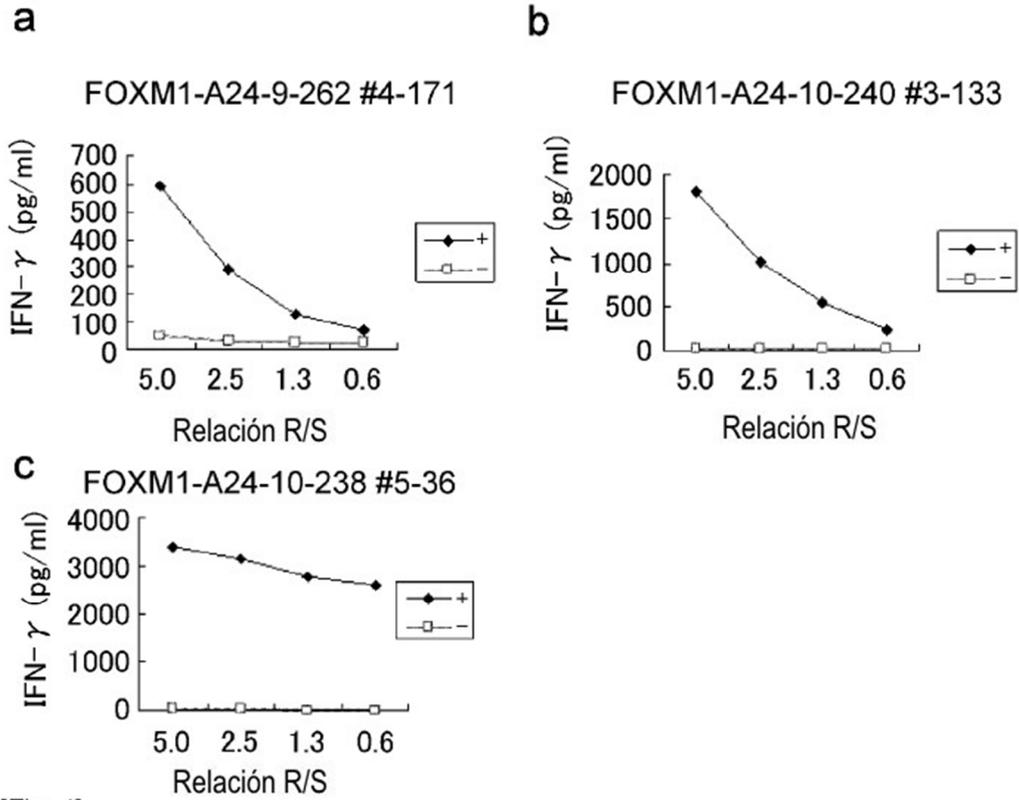
[Fig. 1g-h]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

