

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 118**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00	(2006.01) C12N 1/21	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01) C12N 5/0783	(2010.01)
A61K 39/00	(2006.01) C12N 5/0784	(2010.01)
A61P 35/00	(2006.01) C12N 5/10	(2006.01)
A61P 35/04	(2006.01) G01N 33/574	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)	
C07K 7/06	(2006.01)	
C07K 16/32	(2006.01)	
C12N 1/15	(2006.01)	
C12N 1/19	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2011 PCT/JP2011/006551**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12073459**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2011 E 11846000 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2646546**

54 Título: **Péptidos de TOMM34 y vacunas que incluyen los mismos**

30 Prioridad:

02.12.2010 US 419181 P

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

30.07.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

NAKAMURA, YUSUKE;
TSUNODA, TAKUYA;
OSAWA, RYUJI;
YOSHIMURA, SACHIKO;
WATANABE, TOMOHISA y
NAKAYAMA, GAKU

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 677 118 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 TOMM34 y vacunas que incluyen los mismos

Campo técnico

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

Técnica anterior

10 Se ha demostrado que los CTLs CD8 positivos reconocen péptidos epitópicos derivados de antígenos asociados a tumores (TAAs) en la molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y a continuación destruyen las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia de antígenos del melanoma (MAGE) como el primer ejemplo de TAAs, se han descubierto muchos otros TAAs a través de enfoques inmunológicos (NPLs 1, 2), y algunos de estos TAAs están ahora en proceso de desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas. Por ejemplo, el documento US 2008/274129 proporciona péptidos y composiciones que comprenden al menos un epítipo de HLA-A2 o análogo procedente de CEA, HER2/neu, MAGE2, MAGE3 o p53.

15 Un TAA favorable es indispensable para la proliferación y la supervivencia de las células cancerosas, como una diana para inmunoterapia, debido a que el uso de estos TAAs puede minimizar el riesgo bien descrito de escape inmunitario de células cancerosas atribuible a eliminación, mutación o regulación a la baja de TAAs como consecuencia de selección inmunitaria conducida terapéuticamente. Según esto, la identificación de nuevos TAAs capaces de inducir respuestas inmunitaria antitumorales potentes y específicas garantiza que esté en marcha un desarrollo adicional y así la aplicación clínica de estrategias de vacunación con péptidos para diversos tipos de cáncer (NPLs 3 a 10). Hasta la fecha, se han presentado diversos exámenes clínicos que usan estos péptidos derivados de TAA. Desgraciadamente, muchos de los exámenes para vacunas contra el cáncer actuales han mostrado solo un bajo grado de respuesta objetiva (NPLs 11 a 13). Según esto, sigue habiendo una necesidad de nuevos TAAs como dianas inmunoterapéuticas.

20 El gen TOMM34 (Nº de Registro del GenBank NM_006809), una translocasa de la membrana mitocondrial externa 34, se ha identificado a partir de las bases de datos de EST y ADNc de ser humano y se ha predicho que codifica una proteína que contiene motivos de repetición de tetratricopéptido (TPR) degenerados (NPL 14). La proteína codificada por este gen está implicada en la importación de proteínas precursoras al interior de la mitocondria. Esta proteína tiene una actividad similar a las chaperonas, uniéndose a la porción madura de proteínas desplegadas y ayudando a su importación al interior de la mitocondria (NPL 15).

25 En un estudio reciente, se indicaba que TOMM34 frecuentemente se regula al alza en el cáncer colorrectal mediante análisis del perfil de expresión génica usando una micromatriz de ADNc que consiste en 23040 genes. Por otra parte, la disminución de la expresión de TOMM34 por ARNsi en líneas celulares de cáncer de color atenúa el crecimiento de células de cáncer de colon (NPL 16). [PTL1] divulga métodos que comprenden determinar el nivel de expresión de TOMM34 para el diagnóstico al discriminar entre células de cáncer de colon y células normales.

Lista de citas

40 Bibliografía de patentes

[PTL 1] PCT/JP2006/314947 correspondiente al documento WO 2007/013576

Bibliografía no relacionada con las patentes

[NPL 1] Boon T, Int J Cancer 1993, 54(2): 177-80

[NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996, 183(3): 725-9

45 [NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996, 88(20): 1442-55

[NPL 4] Butterfield LH y cols., Cancer Res 1999, 59(13): 3134-42

[NPL 5] Vissers JL y cols., Cancer Res 1999, 59(21): 5554-9

- [NPL 6] van der Burg SH y cols., J Immunol 1996, 156(9): 3308-14
- [NPL 7] Tanaka F y cols., Cancer Res 1997, 57(20): 4465-8
- [NPL 8] Fujie T y cols., Int J Cancer 1999, 80(2): 169-72
- [NPL 9] Kikuchi M y cols., Int J Cancer 1999, 81(3): 459-66
- 5 [NPL 10] Oiso M y cols., Int J Cancer 1999, 81(3): 387-94
- [NPL 11] Belli F y cols., J Clin Oncol 2002, 20(20): 4169-80
- [NPL 12] Coulie PG y cols., Immunol Rev 2002,188: 33-42
- [NPL 13] Rosenberg SA y cols., Nat Med 2004, 10(9): 909-15
- [NPL 14] Nuttal SD y cols., DNA Cell Biol. septiembre 1997;16(9):1067-74
- 10 [NPL 15] Mukhopadhyay A y cols., Arch Biochem Biophys. 1 de abril de 2002;400(1):97-104
- [NPL 16] Shimokawa y cols., Int J Oncol. agosto 2006;29(2):381-6

Sumario de la invención

15 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de nuevos péptidos que pueden servir como dianas adecuadas de inmunoterapia. Debido a que los TAAs son percibidos generalmente por el sistema inmunitario como "propios" y por lo tanto a menudo no tienen inmunogenicidad, el descubrimiento de dianas apropiadas es de extrema importancia. Según se apunta anteriormente, TOMM34 (por ejemplo, SEQ ID N° 41 y 42, también indicadas en el N° de Registro del GenBank NM_006809) se ha identificado como regulado al alza en cánceres, incluyendo, pero no limitados a, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), cáncer de vejiga urinaria, 20 cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer pulmonar microcítico (SCLC), cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC) y tumor de tejidos blandos. Así, la presente invención se enfoca a TOMM34 como un marcador apropiado del cáncer y un candidato para la diana de inmunoterapia.

25 En el transcurso de la presente invención, se identificaron péptidos epitópicos específicos de los productos génicos de TOMM34 que poseen la capacidad de inducir CTLs específicos para TOMM34. Según se analiza con más detalle posteriormente, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) obtenidas de un donante sano se estimularon usando péptidos candidatos a la unión a HLA-A*0201 derivados de TOMM34. A continuación, se establecieron líneas de CTLs con citotoxicidad específica contra las células diana HLA-A2 positivas impulsadas con cada uno de los péptidos candidatos. Los resultados demuestran en la presente que estos péptidos son péptidos epitópicos 30 restringidos por HLA-A2 que pueden inducir respuestas inmunitarias potentes y específicas contra células que expresan TOMM34. Estos resultados indican además que TOMM34 es fuertemente inmunogénico y los epítomos del mismo son dianas eficaces para la inmunoterapia de tumores.

35 Según esto, un objetivo de la presente invención es proporcionar péptidos aislados que se unan a antígeno HLA e incluyan la secuencia de aminoácidos de TOMM34 (SEQ ID N°: 42) o los fragmentos inmunológicamente activos de la misma. Se espera que estos péptidos tengan inducibilidad para CTL y, así, se puedan usar para inducir CTL in vitro o ex vivo, o se puedan administrar a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma 40 renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos. Esos péptidos preferidos son nonapéptidos o decapéptidos, y, más preferiblemente, un nonapéptido o decapéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N°: 1 a 20 y 22 a 40. De estos, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32 mostraban una inducibilidad para CTL particularmente fuerte y así se prefieren particularmente.

45 La presente invención también contempla péptidos modificados que tienen una secuencia de aminoácidos de un fragmento inmunológicamente activo de TOMM34 en el que uno, dos o más aminoácidos se sustituyen, eliminan, insertan o añaden, con la condición de que los péptidos modificados retengan la inducibilidad para CTL requerida del péptido no modificado original. De estos, se prefieren particularmente los péptidos que tienen una secuencia de

aminoácidos de SEQ ID N°: 1, 5, 31 o 32 en los que uno, dos o más aminoácidos se sustituyen, eliminan, insertan o añaden.

5 La presente invención abarca además polinucleótidos aislados que codifican cualesquiera péptidos de la presente invención. Estos polinucleótidos se pueden usar para inducir o preparar APCs que tienen inducibilidad para CTL. Como los péptidos anteriormente descritos de la presente invención, estas APCs se pueden administrar a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres.

10 Cuando se administran a un sujeto, los presentes péptidos se presentan sobre la superficie de APCs a fin de inducir CTLs que eligen como diana los péptidos respectivos. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones o agentes que incluyan cualesquiera péptidos o polinucleótidos proporcionados por la presente invención para inducir CTL. Estas composiciones o agentes, que incluyen cualesquiera péptidos o polinucleótidos, se pueden usar para el tratamiento y/o la profilaxis de cánceres o la prevención de una recaída posoperatoria del cáncer, ejemplos del cual incluyen, pero no se limitan a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos, y/o la prevención de una recaída posoperatoria de los mismos.

15 La presente invención también contempla agentes o composiciones farmacéuticos que incluyen o incorporan uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención formulados para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, particularmente un cáncer primario, o la prevención de una recaída posoperatoria del mismo. En lugar de o además de los presentes péptidos o polinucleótidos, los presentes agentes o composiciones farmacéuticos pueden incluir como ingredientes activos APCs o exosomas que presentan cualesquiera de los presentes péptidos.

20 Los péptidos o polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para inducir APCs que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el presente péptido, por ejemplo, al poner en contacto APCs derivadas de un sujeto con el péptido o introducir un polinucleótido que codifica un péptido de esta invención en APCs. Estas APCs tienen alta inducibilidad para CTL contra péptidos diana y son útiles para la inmunoterapia del cáncer. Según esto, la presente invención contempla ambos métodos para inducir APCs con inducibilidad para CTL y las APCs obtenidas mediante estos métodos.

25 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar métodos para inducir CTLs, incluyendo estos métodos la etapa de cocultivar células CD8 positivas con APCs o exosomas que presentan el péptido de la presente invención sobre su superficie o la etapa introducir un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos subunitarios del receptor de células T (TCR), en donde el TCR formado por estos polipéptidos subunitarios es capaz de unirse a un complejo de un antígeno HLA y el presente péptido sobre una superficie celular. Los CTLs obtenidos mediante estos métodos son útiles en el tratamiento y la prevención de cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos.

30 Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar APCs aisladas que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención. La presente invención proporciona además CTLs aislados que eligen como diana péptidos de la presente invención. Estas APCs y estos CTLs se pueden usar para la inmunoterapia del cáncer.

35 Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra un cáncer en un sujeto que lo necesite, incluyendo estos métodos la etapa de administrar al sujeto una composición o un agente que incluya uno o más péptidos de la presente invención, polinucleótidos que codifican el péptido de la presente invención o exosomas o APCs que presentan el péptido de la presente invención.

40 La aplicabilidad de la presente invención se extiende a cualquiera de un número de enfermedades que se refieren a o surgen de la sobreexpresión de TOMM34, tales como cáncer, incluyendo cánceres ejemplares, pero no limitados a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos.

45 La presente invención se caracteriza por las realizaciones que se definen en las reivindicaciones. Así, se refiere a los siguientes puntos:

60 1. Un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32 que retiene la capacidad para unirse a un antígeno HLA, en donde el antígeno HLA es HLA-A2.

- 5 2. Un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que se sustituyen uno o dos aminoácidos en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32 para dar un péptido modificado que retiene la capacidad para unirse a un antígeno HLA y la inducibilidad para linfocitos T citotóxicos (CTL), en donde el antígeno HLA es HLA-A2, en donde la sustitución o las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en:
- (a) el segundo aminoácido desde el extremo N se sustituye por metionina, y
 - (b) el aminoácido C-terminal se sustituye por valina o leucina.
3. Un polinucleótido aislado que codifica el péptido del punto 1 o 2.
4. Una composición farmacéutica que comprende:
- 10 (a) uno o más péptidos del punto 1 o 2;
- (b) uno o más polinucleótidos del punto 3;
- (c) una o más APCs que presentan un complejo del péptido del punto 1 o 2 y un antígeno HLA sobre su superficie;
- 15 (d) uno o más exosomas que presentan un complejo del péptido de uno cualquiera del punto 1 o 2 y un antígeno HLA sobre su superficie; o
- (e) uno más CTLs que reconocen una célula que presenta un complejo del péptido del punto 1 o 2 y un antígeno HLA sobre su superficie,
- en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable,
- para el uso en
- 20 (i) el tratamiento de un cáncer existente,
- (ii) la profilaxis de un cáncer,
- (iii) la prevención de una recaída posoperatoria de un cáncer, o
- (vi) combinaciones de los mismos,
- en donde el antígeno HLA del sujeto que se va a tratar es HLA-A2.
- 25 5. Un método *in vitro* para inducir una célula que presenta antígeno (APC) con inducibilidad para CTL, que comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) poner en contacto una APC con el péptido del punto 1 o 2 *in vitro* o *ex vivo*, y
 - (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido del punto 1 o 2 en una APC.
6. Un método *in vitro* para inducir un CTL, que comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- 30 (a) cocultivar una célula T CD8-positiva con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido del punto 1 o 2,
- (b) cocultivar una célula T CD8-positiva con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido del punto 1 o 2, y
- 35 (c) introducir en una célula T un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos subunitarios del receptor de células T (TCR), en donde el TCR formado por dichos polipéptidos subunitarios de TCR

es capaz de unirse a un complejo de un antígeno de HLA y el péptido del punto 1 o 2 sobre una superficie celular,

en donde el antígeno HLA es HLA-A2

5 7. Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido del punto 1 o 2.

8. La APC del punto 7, que se induce mediante un método para inducir una célula que presenta antígeno (APC) con inducibilidad para CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

(a) poner en contacto una APC con el péptido del punto 1 o 2 in vitro o ex vivo, y

(b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido del punto 1 o 2 en una APC.

10 9. Un CTL aislado que elige como diana cualquiera de los péptidos del punto 1 o 2.

10. El CTL del punto 9, que es inducido mediante un método para inducir un CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

(a) cocultivar una célula T CD8-positiva con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido del punto 1 o 2,

15 (b) cocultivar una célula T CD8-positiva con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido del punto 1 o 2, y

20 (c) introducir en una célula T un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos subunitarios del receptor de células T (TCR), en donde el TCR formado por dichos polipéptidos subunitarios del TCR es capaz de unirse a un complejo de un antígeno de HLA y el péptido del punto 1 o 2 sobre una superficie celular,

en donde el antígeno HLA es HLA-A2.

11. Un vector que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el péptido del punto 1 o 2.

12. Una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión del punto 11.

25 13. Un exosoma que presenta un complejo que comprende el péptido del punto 1 o 2 y un antígeno HLA, en donde el antígeno HLA es HLA-A2

14. Un anticuerpo contra el péptido del punto 1 o 2.

15. Un estuche de diagnostico que comprende el péptido del punto 1 o 2, el polinucleótido del punto 3 o el anticuerpo del punto 14.

La presente divulgación proporcionar los siguientes [1] a [20]:

30 [1] Un péptido aislado resultante de (a) o (b):

(a) un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 1, 5 31 and 32;

35 (b) un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan, insertan o añaden a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32 para dar un péptido modificado que retiene la capacidad para unirse a un antígeno HLA y la inducibilidad para linfocitos T citotóxicos (CTL);

[2] El péptido aislado de [1], en donde el antígeno HLA es HLA-A2;

- [3] El péptido aislado de [1] o [2], en donde dicho péptido es un nonapéptido o decapeptido;
- [4] El péptido de uno cualquiera de [1] a [3], que tienen al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 (a) el segundo aminoácido desde el extremo N es o está modificado para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina y metionina, y
- (b) el aminoácido C-terminal es o está modificado para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina y leucina;
- [5] Un polinucleótido aislado que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];
- 10 [6] Una composición para inducir CTL, en donde la composición comprende uno o más péptidos de uno cualquiera de [1] a [4], o uno o más polinucleótidos de [5];
- [7] Una composición farmacéutica que comprende:
- (a) uno o más péptidos de uno cualquiera de [1] a [4];
- (b) uno o más polinucleótidos de [5];
- 15 (c) una o más APCs o exosomas que presentan un complejo del péptido de una cualquiera de [1] a [4] y un antígeno HLA sobre su superficie; o
- (d) uno o más CTLs que reconocen una célula que presenta un complejo del péptido de uno cualquiera de [1] a [4] y un antígeno HLA sobre su superficie,
- en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable,
- formulada para un propósito seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 (i) el tratamiento de un cáncer existente,
- (ii) la profilaxis de un cáncer,
- (iii) la prevención de una recaída posoperatoria de un cáncer, y
- (vi) combinaciones de los mismos;
- 25 [8] La composición farmacéutica de [7] formulada para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2;
- [9] Un método para inducir una célula que presenta antígeno (APC) con inducibilidad para CTL, que comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) poner en contacto una APC con el péptido de una cualquiera de [1] a [4] in vitro, ex vivo o in vivo, y
- (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] en una APC.
- 30 [10] Un método para inducir un CTL, que comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) cocultivar una célula T CD8-positiva con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [4],
- (b) cocultivar una célula T CD8-positiva con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de uno cualquiera de [1] a [4], y

(c) introducir en una célula T un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos subunitarios del receptor de células (TCR), en donde el TCR formado por dichos polipéptidos subunitarios del TCR es capaz de unirse a un complejo de un antígeno de HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] sobre una superficie celular;

5 [11] Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de uno cualquiera de [1] a [4];

[12] La APC de [11], que es inducida mediante un método para inducir una célula que presenta antígeno (APC) con inducibilidad para CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

(a) poner en contacto una APC con el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] in vitro, ex vivo o in vivo, y

10 (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] en una APC;

[13] Un CTL aislado que elige como diana cualquiera de los péptidos de [1] a [4];

[14] El CTL de [13], que es inducido mediante un método para inducir un CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

15 (a) cocultivar una célula T CD8-positiva con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [4],

(b) cocultivar una célula T CD8-positiva con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de uno cualquiera de [1] a [4], y

20 (c) introducir en una célula T un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos subunitarios del receptor de células (TCR), en donde el TCR formado por dichos polipéptidos subunitarios del TCR es capaz de unirse a un complejo de un antígeno de HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] sobre una superficie celular;

[15] Un método para inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido de [1] a [4], un fragmento inmunológicamente activo del mismo o un polinucleótido que codifica el péptido o el fragmento;

25 [16] Un vector que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];

[17] Una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión de [16];

[18] Un exosoma que presenta un complejo que comprende el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] y un antígeno HLA;

30 [19] Un anticuerpo contra el péptido de uno cualquiera de [1] a [4], o un fragmento inmunológicamente activo del mismo; y

[20] Un estuche de diagnóstico que comprende el péptido de uno cualquiera de [1] a [4], el polinucleótido de [5] o un anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo de [19].

Los objetivos y las características de la invención se harán más claramente evidentes cuando la siguiente descripción detallada se lea junto con las figuras y los ejemplos adjuntos.

35

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 sigue.

5 [fig. 1] La Figura 1 está compuesta por una serie de fotografías, (a)-(e), que representan los resultados de un ensayo de inmunotransferencia con enzimas ligadas (ELISPOT) de interferón (IFN)-gamma sobre CTLs que eran inducidos con péptidos derivados de TOMM34. Los CTLs en el número de pocillo N° 4 con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1) (a), en el N° 2 con TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID N°: 5) (b), en el N° 4 con TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID N°: 31) (c) y en el N° 2 con TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID N°: 32) (d) mostraban una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadrado en el pocillo de estas fotos indica que las células procedentes del correspondiente pocillo se expandían para establecer líneas de CTL. En contraste, como es el caso típico de los datos negativos, no se mostraba la producción de IFN-gamma a partir del CTL estimulado con TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID N°: 21) (e). En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana impulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no impulsadas con péptidos.

10 [fig. 2] La Figura 2 es una gráfica lineal que representa la producción de IFN-gamma de la línea de CTL estimulada con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1). La cantidad de IFN-gamma que producía el CTL se midió mediante un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) de IFN-gamma. Los resultados demuestran que la línea de CTL establecida mediante la estimulación con este péptido muestra una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana impulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no impulsadas con péptidos.

15 [fig. 3] La Figura 3 es una gráfica lineal que representa la producción de IFN-gamma del clon de CTL establecido mediante dilución limitativa a partir de la línea de CTL estimulada con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1). Los resultados demuestran que el clon de CTL establecido mediante la estimulación con este péptido mostraba una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana impulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no impulsadas con péptidos.

20 [fig. 4] La Figura 4 es una gráfica lineal que representa la actividad de CTL específica contra células diana que expresan TOMM34 y HLA-A*0201. Se prepararon como controles células COS7 transfectadas con HLA-A*0201 o la longitud completa del gen TOMM34. La línea CTL establecida con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1) mostraba actividad de CTL específica contra células COS7 transfectadas tanto con TOMM34 como con HLA-A*0201 (rombo negro). Por otra parte, no se detectaba una actividad de CTL significativa contra células diana que expresaban bien HLA-A*0201 (triángulo) o bien TOMM34 (círculo).

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, se describen ahora los métodos, los dispositivos y los materiales preferidos. Sin embargo, antes de que se describan los presentes materiales y métodos, se debe entender que estas descripciones son meramente ilustrativas y no pretenden limitarse. También se debe entender que la presente invención no se limita 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

45 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por un experto normal en la técnica a la pertenece la presente invención. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

50 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 "aislado" y "purificado" usados en relación con una sustancia (p. ej., un péptido, un anticuerpo, un polinucleótido, etc.) indican que la sustancia está sustancialmente libre de al menos una sustancia que también

- puede estar incluida en la fuente natural. Así, un péptido aislado o purificado se refiere a un péptido que están sustancialmente libres de material celular tal como un carbohidrato, un lípido u otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente de células o tejido de la que se deriva el péptido o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. El término "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un péptido en las que el péptido se separa de componentes celulares de las células a partir de las que se aísla o se produce recombinantemente. Así, un péptido que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de polipéptido que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en la presente "proteína contaminante"). Cuando el péptido se produce recombinantemente, preferiblemente también está sustancialmente libre de medio de cultivo, lo que incluye preparaciones de péptido con menos de aproximadamente 20%, 10% o 5% de medio de cultivo del volumen de la preparación de péptido. Cuando el péptido se produce mediante síntesis química, preferiblemente está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, lo que incluye preparaciones de péptido con menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de precursores químicos u otros productos químicos implicados en la síntesis del péptido del volumen de la preparación de péptido. Que una preparación de péptido particular contenga un péptido aislado o purificado se puede mostrar, por ejemplo, mediante la aparición de una sola banda después de la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) de la preparación de proteína y tinción con azul brillante de Coomassie o similares del gel. En una realización preferida, los péptidos y polinucleótidos de la presente invención están aislados o purificados.
- Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan intercambiamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácido en los que uno o más residuos de aminoácido es 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 a polímeros de aminoácido presentes en la naturaleza.
- El término "oligopéptido" usado a veces en la presente memoria descriptiva se usa para referirse a péptidos de la presente invención que tienen una longitud de 20 residuos o menos, típicamente 15 residuos o menos y típicamente está compuesto por entre aproximadamente 8 y aproximadamente 11 residuos, a menudo 9 o 10 residuos.
- El término "aminoácido", según se usa en la presente, se refiere a aminoácidos presentes en la naturaleza y sintéticos, así como análogos de aminoácido y miméticos de aminoácido que funcionan de forma similar a los aminoácidos presentes en la naturaleza. El aminoácido puede ser bien L-aminoácidos o bien D-aminoácidos. 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, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina). La expresión "análogo de aminoácido" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica (un carbono alfa 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, sulfóxido, metioninometilsulfonio). La expresión "mimético de aminoácido" se refiere a compuestos químicos que tienen estructuras diferentes pero funciones similares a los aminoácidos generales.
- Los aminoácidos se pueden mencionar en la presente por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.
- Los términos "gen", "polinucleótidos" y "ácidos nucleicos" se usan intercambiamente en la presente y, a menos que se indique específicamente otra cosa, son similares a los aminoácidos mencionados por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.
- El término "composición", según se usa en la presente, está destinado a abarcar un producto que incluye los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directamente o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas. Este término, en relación con una "composición farmacéutica", está destinado a abarcar un producto que incluye el ingrediente o los ingredientes activos y cualquier ingrediente o ingredientes inertes que constituyan el portador, así como cualquier producto que resulte, directamente o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de cualesquiera dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Según esto, en el contexto de la presente invención, el término "composición farmacéutica" se refiere a cualquier composición elaborada al mezclar un compuesto o una sustancia de la presente invención y un portador farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable. La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" o "portador fisiológicamente aceptable", según se usa en la presente, significa un material, composición, sustancia, compuesto o vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, incluyendo, pero no limitados a, un material de carga, diluyente, excipiente, disolvente o encapsulante líquido o sólido.
- El término "ingrediente activo" se refiere en la presente a una sustancia en una composición que es biológicamente o fisiológicamente activa. Particularmente, en el contexto de una composición farmacéutica, el término "ingrediente activo" se refiere a una sustancia que muestra un efecto farmacológico objetivo. Por ejemplo, en el caso de composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, ingredientes activos en las

composiciones pueden conducir a al menos una acción biológica o fisiológicamente sobre células y/o tejidos cancerosos directamente o indirectamente. Preferiblemente, esta acción puede incluir reducir o inhibir el crecimiento de células cancerosas, dañar o destruir células y/o tejidos cancerosos, etc. Típicamente, el efecto indirecto de los ingredientes activos son inducciones de CTLs que reconocen o destruyen células cancerosas. Antes de ser formulado, el "ingrediente activo" también se puede denominar "principio activo", "sustancia farmacológica" o "producto técnico".

A menos que se defina otra cosa, el término "cáncer" se refiere a los cánceres que sobreexpresan el gen TOMM34, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos.

A menos que se defina otra cosa, los términos "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" se usan intercambiamente en la presente y, a menos que se indique específicamente otra cosa, 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 estas células.

A menos que se defina otra cosa, los términos "HLA-A2" se refiere al tipo HLA-A2 que contiene los subtipos, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 y HLA-A*0250.

A menos que se defina otra cosa, el término "estuche", según se usa en la presente, se usa en referencia a una combinación de reactivos y otros materiales. Se contempla en la presente que el estuche puede incluir una micromatriz, un chip, un marcador, etc. No se pretende que el término "estuche" esté limitado a una combinación particular de reactivos y/o materiales.

Según se usa en la presente, en el contexto de un sujeto o paciente, la expresión "el antígeno HLA del sujeto (o paciente) es HLA-A2" se refiere a que el sujeto o paciente posee homocigóticamente o heterocigóticamente gen de antígeno HLA-A2 como la molécula de Clase I del MHC (complejo principal de histocompatibilidad), y el antígeno HLA-A2 se expresa en células del sujeto o paciente como un antígeno HLA.

En la medida en que los métodos y las composiciones de la presente invención encuentren utilidad en el contexto del "tratamiento" del cáncer, un tratamiento se considera "eficaz" si conduce a un beneficio clínico tal como una reducción en la expresión del gen TOMM34, o una disminución en el tamaño, la relevancia o el potencial metastásico del cáncer en el sujeto. Cuando el tratamiento se aplica profilácticamente, "eficaz" significa que retarda o previene la formación de cánceres o previene o alivia un síntoma clínico del cáncer. La eficacia se determina en asociación con cualquier método conocidos para diagnosticar o tratar el tipo de tumor particular.

En la medida en que los métodos y las composiciones de la presente invención encuentren utilidad en el contexto de "prevención" y la "profilaxis" del cáncer, estos términos se usan intercambiamente en la presente para hacer referencia a cualquier actividad que reduzca la carga de mortalidad o morbilidad de 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 de prevención y profilaxis secundario y terciario abarcan actividades destinadas a la prevención y la profilaxis de la progresión de una enfermedad y la aparición de síntomas así como reducir el impacto negativo de una enfermedad ya establecida al restaurar la función y reducir complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y la profilaxis pueden incluir una amplia gama de terapias profilácticas destinadas a aliviar la gravedad del trastorno particular, p. ej. reducir la proliferación y la metástasis de tumores.

En el contexto de la presente invención, el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer y/o la prevención de una recaída posoperatoria del mismo incluyen cualquiera de las siguientes etapas, tales como la retirada quirúrgica de células cancerosas, la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la involución o la regresión de un tumor, la inducción de la remisión y la supresión de la presencia de cáncer, la regresión del tumor y la reducción o inhibición de una metástasis. El tratamiento y/o la profilaxis eficaces del cáncer disminuyen la mortalidad y mejoran el pronóstico de individuos que tienen cáncer, disminuyen los niveles de marcadores tumorales en la sangre y alivian síntomas detectables que acompañan al cáncer. Por ejemplo, la reducción o la mejora de síntomas constituye el tratamiento eficaz y/o la profilaxis incluyen 10%, 20%, 30% o más reducción, o una enfermedad estable.

En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere a inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas que son específicamente reactivos para una proteína diseñada o un péptido de la misma. Un anticuerpo puede incluir anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos fusionados a otras proteínas o radioetiquetas y fragmentos de anticuerpo. Por otra parte, un anticuerpo se usa en la presente en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos)

formados por al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo con la condición de que exhiban la actividad biológica deseada. Un "anticuerpo" indica todas las clases (p. ej., IgA, IgD, IgE, IgG y IgM).

5 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

II. Péptidos

Los péptidos de la presente invención descritos con detalle posteriormente se pueden denominar péptido o péptidos TOMM34.

10 Para demostrar que los péptidos derivados de TOMM34 funcionan como un antígeno reconocido por CTLs, se analizaron péptidos derivados de TOMM34 (SEQ ID N°: 42) para determinar si eran epítomos antigénicos restringidos por HLA-A2 que son alelos de HLA comúnmente encontrados (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).
15 Candidatos de péptidos que se unen a HLA-A2 derivados de TOMM34 se identificaron usando la información sobre sus afinidades hacia HLA-A2. Se identificaron los siguientes péptidos candidato;

TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1),

20 TOMM34-A02-9-77 (SEQ ID N°: 2),

TOMM34-A02-9-52 (SEQ ID N°: 3),

TOMM34-A02-9-110 (SEQ ID N°: 4),

25 TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID N°: 5),

TOMM34-A02-9-230 (SEQ ID N°: 6),

30 TOMM34-A02-9-103 (SEQ ID N°: 7),

TOMM34-A02-9-80 (SEQ ID N°: 8),

TOMM34-A02-9-255 (SEQ ID N°: 9),

35 TOMM34-A02-9-23 (SEQ ID N°: 10),

TOMM34-A02-9-195 (SEQ ID N°: 11),

40 TOMM34-A02-9-111 (SEQ ID N°: 12),

TOMM34-A02-9-238 (SEQ ID N°: 13),

TOMM34-A02-9-1 (SEQ ID N°: 14),

45 TOMM34-A02-9-113 (SEQ ID N°: 15),

TOMM34-A02-9-253 (SEQ ID N°: 16),

50 TOMM34-A02-9-239 (SEQ ID N°: 17),

TOMM34-A02-9-144 (SEQ ID N°: 18),

TOMM34-A02-9-142 (SEQ ID N°: 19),

55 TOMM34-A02-9-279 (SEQ ID N°: 20),

TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID N°: 21),

60 TOMM34-A02-10-97 (SEQ ID N°: 22),

TOMM34-A02-10-79 (SEQ ID N°: 23),

TOMM34-A02-10-237 (SEQ ID N°: 24),

TOMM34-A02-10-135 (SEQ ID N°: 25),
 TOM1VI34-A02-10-219 (SEQ ID N°: 26),
 5 TOMM34-A02-10-238 (SEQ ID N°: 27),
 TOMM34-A02-10-127 (SEQ ID N°: 28),
 10 TOMM34-A02-10-113 (SEQ ID N°: 29),
 TOMM34-A02-10-241 (SEQ ID N°: 30),
 TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID N°: 31),
 15 TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID N°: 32),
 TOMM34-A02-10-195 (SEQ ID N°: 33),
 20 TOMM34-A02-10-112 (SEQ ID N°: 34),
 TOMM34-A02-10-194 (SEQ ID N°: 35)
 TOMM34-A02-10-299 (SEQ ID N°: 36)
 25 TOMM34-A02-10-141 (SEQ ID N°: 37)
 TOMM34-A02-10-160 (SEQ ID N°: 38)
 30 TOMM34-A02-10-175 (SEQ ID N°: 39) y
 TOMM34-A02-10-186 (SEQ ID N°: 40).

35 Por otra parte, después de la estimulación in vitro de células T por células dendríticas (DCs) cargadas con estos péptidos, los CTLs se establecieron satisfactoriamente usando cada uno de los siguientes péptidos;

TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1),
 TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID N°: 5),
 40 TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID N°: 31) y
 TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID N°: 32).

45 Estos CTLs establecidos mostraban una potente actividad de CTL específica contra células diana impulsadas con los péptidos respectivos. Los resultados de la presente demuestran que TOMM34 es un antígeno reconocido por CTL y que los péptidos probados son péptidos epitópicos de TOMM34 restringidos por HLA-A2.

50 Puesto que el gen TOMM34 se sobreexpresa en células y tejidos cancerosos, incluyendo, pero no limitados a, los de AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos, pero no se expresa en la mayoría de los órganos normales, es una buena diana para la inmunoterapia. Así, la presente invención proporciona nonapéptidos (péptidos compuestos por nueve residuos de aminoácido) y decapeptidos (péptidos compuestos por diez residuos de aminoácido) de epítomos reconocidos por CTL procedentes de TOMM34. 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 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 42 o es un fragmento inmunológicamente activo de la misma. Específicamente, la presente invención proporciona péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32. Más específicamente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona péptidos que consisten en la
 60 secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32.

65 Generalmente, se pueden usar programas de software adecuados disponibles actualmente, por ejemplo, en Internet, tales como los descritos en Parker KC y cols., J Immunol 1994, 152(1): 163-75, para calcular las afinidades de unión entre diversos péptidos y antígenos HLA informáticamente. La afinidad de unión con antígenos HLA se puede medir según se describe, por ejemplo, en Parker KC y cols., J Immunol 1994, 152(1): 163-75; y Kuzushima K y cols., Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV y cols. BMC Bioinformatics. 2007; 8: 424, y Buus S y cols. Tissue Antigens.,

62:378-84, 2003. Métodos para determinar la afinidad de unión se describen, por ejemplo, en the Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190 y Protein Science, 2000, 9: 1838-1846. Por lo tanto, se pueden utilizar fácilmente estos programas de software para seleccionar los fragmentos derivados de TOMM34 que tienen alta afinidad de unión con antígenos HLA. Según esto, la presente invención abarca péptidos compuestos por cualesquiera fragmentos derivados de TOMM34 que tengan alta afinidad de unión con antígenos HLA determinada mediante estos programas conocidos. Por otra parte, estos péptidos puede incluir la secuencia de longitud completa de TOMM34 (SEQ ID N°: 42).

Los péptidos de la presente invención, particularmente los nonapéptidos y decapeptidos de la presente invención, pueden estar flanqueados por residuos de aminoácido adicionales con la condición de que el péptido retenga su inducibilidad para CTL. Los residuos de aminoácido adicionales particulares pueden estar compuestos por cualquier tipo de aminoácidos con la condición de que no deterioren la inducibilidad para CTL del péptido original. Así, la presente invención abarca péptidos que tienen afinidad de unión para antígenos HLA, en particular incluyendo péptidos derivados de TOMM34. Estos péptidos tienen, por ejemplo, menos de aproximadamente 40 aminoácidos, a menudo menos de aproximadamente 20 aminoácidos, habitualmente menos de aproximadamente 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos.

Generalmente, se sabe que las modificaciones de uno o más aminoácidos en un péptido no influyen en la función del péptido, o en algunos casos incluso potencian la función deseada de la proteína original. De hecho, se ha sabido que los péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos por una secuencia de aminoácidos modificada al sustituir, eliminar, insertar o añadir uno, dos o varios residuos de aminoácido en una 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, según una realización de la presente invención, el péptido que tiene inducibilidad para CTL de la presente invención puede estar compuesto por el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32, en la que uno, dos o incluso más aminoácidos se añaden, eliminan, insertan y/o sustituyen.

Un experto en la técnica reconocerá que las modificaciones individuales (es decir, eliminaciones, inserciones, adiciones o sustituciones) en una secuencia de aminoácidos que altera un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de la secuencia de aminoácidos global da como resultado la conservación de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original; se denomina así "sustitución conservativa" o "modificación conservativa", en donde la alteración de una proteína da como resultado una proteína con funciones similares. Tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Ejemplos de propiedades de las cadenas laterales de aminoácido son aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilo (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común; una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene grupos hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene átomos de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene bases (R, K, H); y una cadena lateral que contiene grupos aromáticos (H, F, Y, W). Además, los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son 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 estos péptidos modificados conservativamente son péptidos de la presente invención. Sin embargo, el péptido de la presente invención no se restringe a los mismos y puede incluir modificaciones no conservativas, con la condición de que el péptido modificado resultante retenga la inducibilidad para CTL del péptido no modificado original. Por otra parte, los péptidos modificados no excluyen péptidos inducibles de CTL de variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de TOMM34.

Residuos de aminoácido se pueden insertar, sustituir o añadir a los péptidos de la presente invención o, alternativamente, residuos de aminoácido se pueden eliminar de los mismos para alcanzar una afinidad de unión superior. Para retener la inducibilidad para CTL requerida, preferiblemente se modifica (es decir, elimina, inserta, añade o sustituye) 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, 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos que se va a modificar puede ser 20% o menos, por ejemplo, 15% o menos, por ejemplo 10% o menos, por ejemplo 1 a 5%.

Por otra parte, los péptidos pueden estar sustituidos o añadidos por estos residuos de aminoácido para alcanzar una afinidad de unión superior. Cuando se usan en inmunoterapia, los presentes péptidos se presentan sobre la superficie de una célula o exosoma 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 por unión a antígenos HLA (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), se pueden introducir modificaciones basadas en esta regularidad en los péptidos inmunogénicos de la presente invención.

Por ejemplo, los péptidos que poseen alta afinidad de unión a HLA-A2 tienden a tener el segundo aminoácido desde el extremo N sustituido por leucina o metionina. Asimismo, los péptidos en los que el extremo C está sustituido por valina o leucina también se puede usar favorablemente. Según esto, los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre SEQ ID N^o: 1, 5, 31 y 32 en las que el segundo aminoácido desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de dicha SEQ ID N^o está sustituido por leucina o metionina, y/o el extremo C de la secuencia de aminoácidos de dicha SEQ ID NO está sustituido por valina o leucina están abarcados por la presente invención. Las sustituciones se pueden introducir no solo en los aminoácidos terminales sino también en la posición de reconocimiento de péptidos potencial del receptor de células T (TCR). Varios estudios han demostrado que un péptido con sustituciones de aminoácidos puede ser igual a o mejor que el original, por ejemplo CAP1, p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎, Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ o gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba y cols. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann y cols. J Immunol. (2002);168(3): 1338-47., S. O. Dionne y cols. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 y S. O. Dionne y cols. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

La presente invención también contempla la adición de uno, dos o varios aminoácidos al extremo N y/o C de los presentes péptidos. Estos péptidos modificados con alta afinidad de unión a antígeno HLA e inducibilidad para CTL retenida también se incluyen en la presente invención.

Por ejemplo, la presente invención proporciona un péptido aislado de menos de 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud que se une a un antígeno HLA, tiene inducibilidad para CTL y comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre:

(i) una secuencia de aminoácidos se selecciona de entre SEQ ID N^o: 1 y 5;

(ii) una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios aminoácidos se modifican en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID: N^o 1 y 5, y

(iii) la secuencia de aminoácidos de (ii), en donde la secuencia de aminoácidos tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido desde el extremo N de dicha SEQ ID N^o es metionina; y

(b) el aminoácido C-terminal de dicha SEQ ID N^o se selecciona de entre valina y leucina.

Por otra parte, la presente invención también proporciona un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12 o 11 aminoácidos de longitud que se une a un antígeno HLA, tiene inducibilidad para CTL y comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre:

(i') una secuencia de aminoácidos se selecciona de entre SEQ ID N^o: 31 y 32;

(ii') una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios aminoácidos se modifican en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N^o: 31 y 32, y

(iii') la secuencia de aminoácidos de (ii'), en donde la secuencia de aminoácidos tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido desde el extremo N de dicha SEQ ID N^o es metionina; y

(b) el aminoácido C-terminal de dicha SEQ ID N° se selecciona de entre valina y leucina.

5 Cuando estos péptidos se ponen en contacto con APCs, esos péptidos se unen con antígenos HLA sobre APCs para ser presentados sobre APCs como complejos con antígenos HLA. Alternativamente, esos péptidos se introducen en APCs y se procesan hasta fragmentos que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre (i)-(iii) y (i')-(iii')

10 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 o síntomas alérgicos contra sustancias específicas. Por lo tanto, se pueden realizar búsquedas de homología usando bases de datos disponibles para evitar situaciones en las que la secuencia del péptido coincide con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando se hace evidente a partir de las búsquedas de homología que no existe ni siquiera un péptido con una diferencia de 1 o 2 aminoácidos con el péptido buscado, el péptido buscado se puede modificar a fin de incrementar su afinidad de unión con antígenos HLA y/o incrementar su inducibilidad para CTL sin peligro de estos efectos secundarios.

15 Aunque se espera que los péptidos que tienen alta afinidad de unión a los antígenos HLA que se describen anteriormente sean muy eficaces, los péptidos candidatos, que se seleccionan según la presencia de alta afinidad de unión como un indicador, se examinan adicionalmente con respecto a la presencia de inducibilidad para CTL. En la presente, la expresión "inducibilidad para CTL" indica la capacidad del péptido para inducir CTLs cuando se presenta sobre células que presentan antígeno (APCs). Además, "inducibilidad para CTL" incluye la capacidad del péptido para inducir la activación de CTL, la proliferación de CTL, promover la lisis por CTL de células diana y para incrementar la producción de IFN-gamma por CTL.

20 La confirmación de la inducibilidad para CTL se puede efectuar al inducir APCs que soportan antígenos del MHC humano (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DCs)), o más específicamente DCs derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana y, después de la estimulación con los péptidos, mezclar con células T CD8-positivas y a continuación medir el IFN-gamma 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, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 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 radioetiquetar con ⁵¹Cr y similares y la actividad citotóxica se pueden calcular a partir de la radiactividad liberada de las células diana. Alternativamente, se puede examinar al medir IFN-gamma producido y liberado por CTL en presencia de APCs que soportan péptidos inmovilizados, y visualizar la zona de inhibición de media usando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

25 Al examinar la inducibilidad para CTL de los péptidos que se describen anteriormente, se descubrió que los nonapéptidos o decapeptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32 mostraban una inducibilidad para CTL particularmente alta así como alta afinidad de unión a un antígeno HLA. Así, estos péptidos se ejemplifican como realizaciones preferidas de la presente invención.

30 Por otra parte, los análisis de homología demuestran que estos péptidos no tienen una homología significativa con péptidos derivados de cualesquiera otros productos génicos humanos conocidos. Según esto, se puede disminuir la posibilidad de respuestas inmunitarias desconocidas o indeseadas que surgen cuando se usan para inmunoterapia. Por lo tanto, también desde este aspecto, estos péptidos encuentran uso para producir inmunidad en pacientes con cáncer contra TOMM34. Así, los péptidos preferidos de la presente invención son los péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32.

35 Además de las modificaciones de los presentes péptidos, analizadas anteriormente, los péptidos de la presente invención también se pueden conectar a otros péptidos, con la condición de que retengan la inducibilidad para CTL, y más preferiblemente también retiene la unión a HLA requerida. Ejemplos de "otros" péptidos adecuados incluyen: los péptidos de la presente invención o los péptidos inducibles de CTL derivados de otros TAAs. Los conectores entre los péptidos son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, AAY (P. M. Daftarian y cols., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Suttmuller y cols., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) o K (S. Ota y cols., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura y cols., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715).

40 Por ejemplo, también se pueden usar péptidos asociados a tumores distintos de TOMM34 de forma sustancialmente simultánea para incrementar la respuesta inmunitaria a través de HLA clase I y/o clase II. Está bien establecido que las células cancerosas pueden expresar más de un gen asociado a tumor. Así, está dentro del alcance de la experimentación habitual para un experto normal en la técnica determinar si un sujeto particular expresa genes asociados a tumores adicionales, y a continuación incluir péptidos que se unen a HLA clase I y/o HLA clase II derivados de productos de expresión de estos genes en composiciones y vacunas de TOMM34.

Ejemplos de péptidos que se unen a HLA clase I y HLA clase II son conocidos por los expertos normales en la técnica (por ejemplo, véase Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995), y así se pueden usar en la invención de un modo similar a los divulgados en la presente. Así, un experto normal en la técnica puede preparar fácilmente polipéptidos que incluyen uno o más péptidos de TOMM34 y uno o más de los péptidos distintos a TOMM34, o ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos, usando procedimientos estándar de biología molecular.

Los péptidos descritos anteriormente se denominan en la presente "polítopos", es decir, grupos de dos o más péptidos potencialmente inmunogénicos o estimulantes de la respuesta inmunitaria que se pueden enlazar entre sí en diversas disposiciones (p. ej., concatenados, solapados). El polítopo (o el ácido nucleico que codifica el polítopo) se puede administrar en un protocolo de inmunización estándar, p. ej., a animales, para probar la eficacia del polítopo para estimular, potenciar y/o provocar una respuesta inmunitaria.

Los péptidos se pueden enlazar entre sí directamente o a través del uso de secuencias de flaqueo para formar polítopos, y el uso de polítopos como vacunas es muy conocidos en la técnica (véanse, p. ej., Thomson y cols., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert y cols., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson y cols., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn y cols., J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990). Polítopos que contienen diversos números y combinaciones de epítomos se pueden preparar y probar con respecto al reconocimiento por CTLs y con respecto a la eficacia para incrementar una respuesta inmunitaria.

Los péptidos de la presente invención se pueden conectar además a otras sustancias, con la condición de que retengan la inducibilidad para CTL del péptido original. Ejemplos de sustancias adecuadas pueden incluir: péptidos, lípidos, azúcar y cadenas sacáricas, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glicosilación, oxidación de cadenas laterales o fosforilación; con la condición de que las modificaciones destruyan la actividad biológica de los péptidos que se describen en la presente. Estos tipos de modificaciones se pueden realizar para conferir funciones adicionales (p. ej., función de elección como diana y función de aporte) o para estabilizar el polipéptido.

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 no naturales; este concepto también se puede adoptar para los presentes polipéptidos. La estabilidad de una polipéptido se puede ensayar de un número de modos. Por ejemplo, se pueden usar peptidasas y diversos medios biológicos, tales como plasma y suero humanos, para probar la estabilidad (véase, p. ej., Verhoef y cols., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

Por otra parte, según se apunta anteriormente, entre los péptidos modificados que de los que se han sustituido, eliminado, insertado 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. Por lo tanto, la presente invención también proporciona el método de cribado o selección de péptidos modificados que tienen una actividad igual o superior en comparación con los originales. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

a: sustituir, eliminar, insertar o añadir al menos un residuo de aminoácido de un péptido de la presente invención,

b: determinar la actividad de dicho péptido, y

c: seleccionar el péptido que tiene una actividad igual o superior en comparación con el original.

En la presente, dicha actividad puede incluir actividad de unión al MHC, inducibilidad para APC o CTL y actividad citotóxica.

Cuando los péptidos de la presente intención incluyen un residuo de cisteína, los péptidos tienden a formar dímeros a través de un enlace disulfuro entre grupos SH de los residuos de cisteína. Por lo tanto, también se incluyen dímeros del péptido de la presente invención en los péptidos de la presente invención.

III. Preparación de péptidos de TOMM34

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar usando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar sintéticamente, mediante tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar individualmente o como polipéptidos más largos que incluyen dos o más péptidos. Los péptidos se pueden aislar, es decir, purificar o aislar sustancialmente libres de otras proteínas de la célula hospedadora presentes en la naturaleza y fragmentos de las mismas, o cualesquiera otras sustancias químicas.

Los péptidos de la presente invención pueden contener modificaciones, tales como glicosilación, oxidación de la cadena lateral o fosforilación, con tal de que estas modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido

original. Otras modificaciones ilustrativas incluyen la incorporación de D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácido que se pueden usar, por ejemplo, para incrementar la semivida en suero de los péptidos.

5 Un péptido de la presente invención se puede obtener a través de síntesis química basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Por ejemplo, métodos de síntesis de péptidos convencionales que se pueden adoptar para la síntesis incluyen:

(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;

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

(v) Development of Pharmaceuticals (segundo volumen) (en japonés), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;

(vi) WO99/67288; y

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

15 Alternativamente, los presentes péptidos se pueden obtener adaptando cualesquiera métodos de manipulación 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, se prepara un vector adecuado que aloja un polinucleótido que codifica el péptido buscado en una forma expresable (p. ej., aguas abajo de una secuencia reguladora correspondiente a una secuencia promotora) y se transforma en una célula hospedadora adecuada. Estos vectores y células hospedadoras también se proporcionan mediante la presente
20 invención. A continuación, la célula hospedadora se cultiva para producir el péptido de interés. El péptido también se puede producir in vitro adoptando un sistema de traducción in vitro.

IV. Polinucleótidos

25 La presente invención proporciona polinucleótido que codifican cualquiera de los susodichos péptidos de la presente invención. Estos incluyen polinucleótidos derivados del gen de TOMM34 presente en la naturaleza (por ejemplo, SEQ ID N°: 42 (N° de Registro del GenBank NM_006809)) y 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 aminoácidos funcionalmente idénticos
30 codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Así, en cualquier posición en la que una alanina esté especificada por un codón, el codón puede ser alterado hasta cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones del ácido nucleico son "variaciones sinónimas", que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente que codifica un péptido también describe cada
35 posible variación sinónima del ácido nucleico. Un experto normal en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para la metionina, y TGG, que es normalmente 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 está descrita implícitamente en cada secuencia divulgada.

40 El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto por ADN, ARN y derivados de los mismos. Como se sabe bien 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 reconocerá que también se pueden incluir en los polinucleótidos bases no presentes en la naturaleza.

45 El polinucleótido de la presente invención puede codificar múltiples péptidos de la presente invención con o sin secuencias de interpuestas. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos interpuesta proporciona un sitio de escisión (p. ej., una secuencia de reconocimiento enzimático) del polinucleótido o los péptidos traducidos. Por otra parte, el polinucleótido puede incluir secuencias adicionales a la secuencia codificante que codifica el péptido de la presente
50 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 similares. En general, estos polinucleótidos recombinantes se pueden preparar mediante la

manipulación de polinucleótidos a través de técnicas recombinantes convencionales usando, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

5 Se pueden usar técnicas de síntesis tanto recombinantes como químicas para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, un polinucleótido se puede producir mediante la 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.

V. Exosomas

15 La presente invención proporciona además vesículas intracelulares, denominadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de esta invención y antígenos HLA sobre su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, usando métodos detallados en las Publicaciones de Solicitud de Patente Japonesa Kohyo N° Hei 11-510507 y WO99/03499, y se pueden preparar usando APCs obtenidas de pacientes que están sometidos a tratamiento y/o prevención. Los exosomas de esta invención se pueden inocular como vacunas, de forma similar a los péptidos de esta invención.

20 El tipo de antígenos HLA incluido en los complejos debe coincidir con el del sujeto que requiere el tratamiento y/o la prevención. Por ejemplo, en la población japonesa, HLA-A2, particularmente HLA-A*0201 y HLA-A*0206, son bastante preponderantes y por lo tanto serían apropiados para el tratamiento de pacientes japoneses. El uso del tipo HLA-A2 que se expresa altamente entre las poblaciones japonesa y caucásica es favorable para obtener resultados eficaces, y subtipos tales como HLA-A*0201 y HLA-A*0206 encuentran uso. Típicamente, en la clínica, el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento se investiga por adelantado, lo que permite una selección apropiada de péptidos que tienen altos niveles de afinidad de unión a este antígeno, o que tienen inducibilidad para CTL mediante presentación de antígeno. Por otra parte, a fin de obtener péptidos que muestren alta afinidad de unión e inducibilidad para CTL, se puede realizar la sustitución, eliminación, inserción o adición de uno, dos o varios aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido parcial de TOMM34 presente en la naturaleza.

30 Cuando el exosoma de la presente invención posee tipo HLA-A2 como un antígeno HLA, los péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32 tienen particular utilidad.

VI. Células que presentan antígeno (APCs)

35 La presente invención también proporciona células que presentan antígeno aisladas (APCs) que presentan complejos formados entre antígenos HLA y los péptidos de esta invención sobre su superficie. Las APCs se pueden derivar de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar como vacunas por sí mismas o en combinación con otros fármacos incluyendo los péptidos de esta invención, exosomas o CTLs.

40 Las APCs no se limitan a un tipo particular de células. Ejemplos de APCs incluyen, pero no se limitan a, células dendríticas (DCs), células de Langerhans, macrófagos, células B y células T activadas, que se sabe que presentan antígenos proteínicos sobre su superficie celular a fin de que sean reconocidos por los linfocitos. Puestos que las DCs son unas APCs representativas que tienen la acción inductora de CTL más fuerte entre las APCs, las DCs encuentran uso como las APCs de la presente invención.

45 Por ejemplo, las APCs de la presente invención se pueden obtener al inducir DCs procedentes de monocitos de sangre periférica y a continuación ponerlos en contacto (estimularlos) con los péptidos de esta invención in vitro, ex vivo o in vivo. Cuando los péptidos de esta invención se administran a los sujetos, APCs que presentan los péptidos de esta invención son inducidas en el cuerpo del sujeto. La expresión "inducir una APC" incluye poner en contacto (estimular) una célula con los péptidos de la presente invención, o introducir un polinucleótido que codifica los péptidos de la presente invención en una célula para presentar un complejo formado entre un antígeno HLA y los péptidos de la presente invención sobre la superficie de la célula. Por lo tanto, las APCs de esta invención se pueden obtener al recoger las APCs del sujeto después de administrar los péptidos de esta invención al sujeto. Alternativamente, las APCs de esta invención se pueden obtener al poner en contacto APCs recogidas de un sujeto con el péptido de esta invención.

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

a: recoger APCs de un primer sujeto,

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

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

El primer sujeto y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo, o pueden ser individuos diferentes. Las APCs obtenidas mediante la etapa b pueden servir como una vacuna para el tratamiento y/o la prevención de un cáncer, ejemplos del cual incluyen, pero no se limitan a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos.

En el contexto de la presente invención, se pueden utilizar los péptidos de la presente invención para fabricar una composición o un agente farmacéuticos capaces de inducir células que presentan antígeno. Se proporciona en la presente un método o procedimiento para fabricar una composición o un agente farmacéuticos para inducir células que presentan antígeno y preferiblemente incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona el uso de los péptidos de la presente invención para inducir células que presentan antígeno.

Según un aspecto de la presente invención, las APCs de la presente invención tienen un alto nivel de inducibilidad para CTL. En la expresión "alto nivel de inducibilidad para CTL", el alto nivel significa que la inducibilidad para CTL es relativamente alta en comparación con el nivel que se detectaba en APCs no puestas en contacto con péptido. Estas APCs que tienen un alto nivel de inducibilidad para CTL se pueden preparar mediante un método que incluye la etapa de transferir un polinucleótido que codifica el péptido de esta invención a APCs in vitro así como el método mencionado anteriormente. Los polinucleótidos introducidos pueden estar en la forma de ADNs o ARNs. Ejemplos de métodos para la introducción incluyen, sin limitaciones particulares, diversos métodos realizados convencionalmente en este campo, tales como lipofección, electroporación y se puede usar el método del fosfato cálcico. Más específicamente, se puede realizar como se describe en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; Traducción Japonesa Publicada de la Publicación Internacional N° 2000-509281. Al transferir el gen que codifica el péptido de la presente invención al interior de APCs, el gen sufre transcripción, traducción y similares en la célula y a continuación la proteína obtenida se procesa mediante el MHC Clase I o Clase II, y avanza a través de una ruta de presentación para presentar los péptidos de la presente invención.

Alternativamente, las APCs de la presente invención se pueden preparar mediante un método que incluye la etapa de poner en contacto APCs con el péptido de la presente invención.

En algunas realizaciones, las APCs de la presente invención presentan complejos de antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre su superficie.

VII. Linfocitos T citotóxicos (CTLs)

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 similares a los péptidos de por sí. Así, la presente invención proporciona CTLs aislados que son inducidos o activados específicamente por cualquiera de los presentes péptidos.

Estos CTLs se pueden obtener al (1) administrar el péptido o los péptidos de la presente invención a un sujeto, (2) poner en contacto (estimular) APCs y células T CD8-positivas derivadas del sujeto, o leucocitos mononucleares de sangre periférica in vitro con el péptido o los péptidos de la presente invención, (3) poner el contacto las células T CD8-positivas o los leucocitos mononucleares de sangre periférica in vitro con las APCs o los exosomas que presentan un complejo de un antígeno de HLA y el péptido de la presente invención sobre su superficie o (4) introducir un polinucleótido/polinucleótidos que codifican subunidades del receptor de células T (TCR), en donde el TCR formado por estas subunidades de TCR es capaz de unirse a un complejo de un antígeno de HLA y el péptido de esta invención sobre una superficie celular. Estas APCs o exosomas para el método de (3) se pueden preparar mediante los métodos descritos anteriormente. Detalles del método de (4) se describe posteriormente en la sección "VIII. Receptor de células T (TCR)".

Los CTLs 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 esta invención o exosomas con el propósito de regular los efectos. Los CTLs obtenidos actúan específicamente contra células diana que presentan los péptidos de esta invención, por ejemplo, los mismos péptidos usados para la inducción. Las células diana pueden ser células que expresan endógenamente TOMM34, tales como células cancerosas, o células que se transfectan con el gen TOMM34; y células que presentan un péptido de esta invención

sobre la superficie celular debido a la estimulación por el péptido también pueden servir como diana del ataque de CTL activados.

5 En algunas realizaciones, los CTLs de la presente invención son CTLs que reconocen células que presentan complejos de un antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre su superficie. En el contexto del CTL, la expresión "reconoce una célula" se refiere a la unión de un complejo de un antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre la superficie celular a través de su TCR y que muestra actividad citotóxica específica contra la célula. En la presente, "actividad citotóxica específica" se refiere a mostrar actividad citotóxica contra la célula que presenta un complejo de un antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención pero no otras células.

10 VIII. Receptor de células T (TCR)

La presente invención también proporciona una composición que incluye un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de células T (TCR), y métodos para usar los mismos. Estas subunidades de TCR tienen la capacidad de formar TCRs que confieren especificidad contra células tumorales que expresan TOMM34 a células T. Al usar los métodos conocidos en la técnica, se pueden identificar el polinucleótido/los polinucleótidos que codifican cada una de las cadenas alfa y beta de las subunidades de TCR del CTL inducido con los péptidos de la presente invención (documento WO2007/032255 y 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 los análisis pueden ser, por ejemplo, cebadores 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (SEQ ID N°: 43) como cebadores laterales 5' y cebadores 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID N°: 44) específicos para la región C de la cadena alfa de TCR, cebadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (SEQ ID N°: 45) específicos para la región C1 de la cadena beta de TCR o cebadores 3-TRbeta-C2 (5'- ctagcctctggaatcctttctct-3') (SEQ ID N°: 46) específicos para la región C2 de la cadena beta de TCR como cebadores laterales 3', pero no limitados a estos. Los TCRs derivados se pueden unir a células diana que presentan el péptido de TOMM34 de la presente invención con alta avidéz y opcionalmente median en la destrucción eficaz de células diana que presentan el péptido de TOMM34 de la presente invención in vivo e in vitro.

El polinucleótido/los polinucleótidos que codifican las subunidades de TCR (es decir, el polinucleótido que codifica ambas subunidades de TCR o los polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR) se pueden incorporar en vectores adecuados, p. ej., vectores retrovirales. Estos vectores son muy conocidos en la técnica. El polinucleótido o los vectores que los incluyen se pueden transferir útilmente a una célula T (p. ej., una célula T CD8-positiva), por ejemplo, una célula T procedente de un paciente. Ventajosamente, la presente invención proporciona una composición lista para usar que permite la modificación rápida de las propias células T de un 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 contra el péptido de la presente invención es un receptor capaz de reconocer específicamente un complejo de un péptido de la presente invención y antígeno HLA, dando una célula T específica contra una célula diana que presenta un complejo del péptido de la presente invención y un antígeno HLA cuando el TCR se expresa sobre la superficie de la célula T. Se puede confirmar mediante cualesquiera métodos conocidos que los CTLs preparados al introducir el polipéptido o los polipéptidos que codifican estas subunidades de TCR pueden reconocer específicamente estas células diana. Ejemplos preferidos de estos métodos incluyen, por ejemplo, análisis de tetrámeros usando una molécula de HLA y el péptido de la presente invención, y ensayo ELISPOT. Mediante un ensayo ELISPOT, se puede conformar que el CTL preparado mediante el método descrito anteriormente puede reconocer específicamente las células diana y que las señales generadas por este reconocimiento se pueden transmitir intracelularmente. Por otra parte, también se puede confirmar mediante métodos conocidos que los CTLs preparados mediante el método descrito anteriormente tiene actividad citotóxica específica contra las células diana. Ejemplos de estos métodos incluyen, por ejemplo, un ensayo de liberación de cromo usando células que expresan tanto antígeno HLA-A2 como TOMM34.

50 En un aspecto, la presente invención proporciona CTLs que se preparan mediante transducción con el polinucleótido/los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de subunidades de TCR (es decir, el polinucleótido que codifica ambas subunidades de TCR o los polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR), en donde el TCR formado por estas subunidades de TCR se puede unir a un complejo del péptido de TOMM34 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32 y antígeno HLA-A2 sobre una superficie celular.

Los CTLs transducidos son capaces de dirigirse a células cancerosas in vivo y se pueden expandir mediante métodos de cultivo muy conocidos in vitro (p. ej., Kawakami y cols., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Los CTLs de la presente invención se pueden usar para formar una composición inmunogénica útil en cualquiera o ambos del tratamiento y la prevención del cáncer en un paciente que necesite terapia o protección (documento WO2006/031221).

IX. Agentes o composiciones farmacéuticos

5 Puesto que la expresión de TOMM34 es específicamente elevada en el cáncer, ejemplos del cual incluyen, pero no se limitan a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos en comparación con tejido normal, los péptidos de o los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/o la prevención de una recaída posoperatoria del mismo. Así, la presente invención proporciona un agente o una composición farmacéuticos formulados para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/o para la prevención de una recaída posoperatoria del mismo, incluyendo esta composición como un ingrediente activo uno o más de los péptidos o polinucleótidos de esta invención como un ingrediente activo. Alternativamente, los presentes péptidos se pueden expresar sobre la superficie de cualquiera de los exosomas o las células precedentes, tales como APCs para el uso como agentes o composiciones farmacéuticos. Además, los susodichos CTLs que eligen como diana cualquiera de los péptidos de la presente invención también se pueden usar como el ingrediente activo de los presentes agentes o composiciones farmacéuticos.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también encuentran uso como una vacuna. En el contexto de la presente invención, la expresión "vacuna" (también denominada una "composición inmunogénica") se refiere a una composición que tiene la función de mejorar, potenciar y/o inducir inmunidad antitumoral al inocularla en animales.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir cánceres, y/o la prevención de una recaída 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.

30 En otra realización, la presente invención también proporciona el uso de un ingrediente activo en la fabricación de una composición o un agente farmacéuticos para tratar un cáncer o un tumor, dicho ingrediente activo seleccionado de entre:

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica este 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.

35 Alternativamente, la presente invención proporciona además un ingrediente activo para el uso en el tratamiento y/o la prevención de cánceres o tumores, dicho ingrediente activo seleccionado de entre:

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica este 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.

40 Alternativamente, la presente invención proporciona además un método o procedimiento para fabricar una composición o un agente farmacéuticos para tratar o prevenir un cáncer o un tumor, en donde el método o el procedimiento incluye la etapa de formular un portador farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable con un ingrediente activo seleccionado de entre:

- 45 (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica este 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 otra realización, la presente invención también proporciona un método o un procedimiento para fabricar una composición o un agente farmacéuticos para tratar o prevenir un cáncer o un tumor, en donde el método o el procedimiento incluye las etapas de mezclar un ingrediente activo con un portador farmacéuticamente 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 este 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.

Los agentes o composiciones farmacéuticos de la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir el cáncer, y/o para prevenir una recaída posoperatoria del cáncer en sujetos o pacientes que incluyen 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.

Según la presente invención, se ha encontrado que los péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32 son péptidos epitópicos restringidos por HLA-A2 o los candidatos que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica. Por lo tanto, los presentes agentes o composiciones farmacéuticos que incluyen cualquiera de estos péptidos con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32 son particularmente adecuados para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Lo mismo se aplica a agentes o composiciones farmacéuticos que incluyen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de esta invención).

Los cánceres que se van a tratar mediante los agentes o composiciones farmacéuticos de la presente invención no están limitados e incluyen cualquier cáncer en el que esté implicado TOMM34 (p. ej., se sobreexpresen), incluyendo, pero no limitados a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos.

Los agentes o composiciones farmacéuticos de la presente invención pueden contener además de los susodichos ingredientes activos otros péptidos que tiene la capacidad para inducir CTLs contra células cancerosas, otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, o similares. Ejemplos de estos "otros" péptidos que tienen la capacidad para inducir CTLs contra células cancerosas incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos del cáncer (p. ej., TAAs identificados).

Si es necesario, los agentes o composiciones farmacéuticos de la presente invención pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como un ingrediente activo, con la condición 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 o composiciones 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 la uno o más de otras composiciones farmacológicas. Las cantidades de medicamento y composición farmacológica dependen, por ejemplo, de qué tipo de composición o composiciones farmacológicas se usen, la enfermedad que se trate y la programación y las vías de administración.

Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que, además de los ingredientes mencionados particularmente en la presente, los agentes o composiciones farmacéuticos de la presente invención pueden incluir además otras sustancias convencional en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión (p. ej., cargas, aglutinantes, diluyentes, etc.).

En una realización de la presente invención, los presentes agentes o composiciones farmacéuticos se pueden envasar en artículos de fabricación, p. ej., como 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 los presentes agentes o composiciones farmacéuticos con una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta sobre el recipiente debe indicar que el agente o 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 un agente o composición farmacéuticos de la presente invención puede incluir además opcionalmente un segundo recipiente que aloja un diluyente farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, cargas, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

Las composiciones farmacéuticas, si se desea, se pueden presentar en un paquete o dispositivo distribuidor que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete puede incluir, por ejemplo, una lamina de metal o plástico, tal como un blíster. El paquete o dispositivo distribuidor puede estar acompañado por instrucciones para la administración.

(1) Agentes o composiciones farmacéuticos que contienen los péptidos como el ingrediente activo

Los péptidos de esta invención se pueden administrar directamente como un agente o composición farmacéuticos o, si es necesario, se pueden formular mediante métodos de formulación convencionales. En el último uso, además de los péptidos de esta invención, se pueden incluir portadores, excipientes y similares que se usan normalmente para fármacos, según sea apropiado, sin limitaciones particulares. Ejemplos de estos portadores son agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón de fosfato, fluido de cultivo y similares. Por otra parte, los agentes o las composiciones farmacéuticos pueden contener, según sea necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares. Los agentes o las composiciones farmacéuticos de esta invención se pueden usar contra el cáncer.

Los péptidos de esta invención se pueden preparar en una combinación, que incluye dos o más de los péptidos de la presente invención, para inducir CTL in vivo. Los péptidos pueden estar en un cóctel o se pueden conjugar entre sí usando técnicas estándar. Por ejemplo, los péptidos pueden estar conectados químicamente o se pueden expresar como una sola secuencia polipeptídica de fusión que puede tener uno o varios aminoácidos como un conector (p. ej., Lysine linker: K. S. Kawamura y cols. J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715). Los péptidos de la combinación pueden ser iguales o diferentes. Al administrar los péptidos de esta invención, los péptidos son presentados en una alta densidad por los antígenos HLA sobre APCs, a continuación se inducen CTLs que reaccionan específicamente hacia el complejo formado entre el péptido exhibido y el antígeno HLA. Alternativamente, APCs (p. ej., DCs) se retiran de los sujetos y a continuación se estimulan mediante los péptidos de la presente invención para obtener APCs que presentan cualquiera de los péptidos de esta invención sobre su superficie celular. Estas APCs se readministran a los sujetos para inducir CTLs en los sujetos, como resultado, se puede incrementar la agresividad hacia el endotelio asociado al tumor.

Los agentes o las composiciones farmacéuticos para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que incluyen cualquier péptido de esta invención como el ingrediente activo, pueden incluir adicionalmente un adyuvante de modo que se establezca efectivamente una inmunidad celular, o se pueden administrar con otros ingredientes activos, y se pueden administrar mediante la formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a un compuesto que potencia la respuesta inmunitaria contra la proteína cuando se administra junto (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Un adyuvante que se puede aplicar incluye los descritos en la bibliografía (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Adyuvantes ejemplares incluyen fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina del cólera, toxina de salmonella, adyuvante incompleto de Freund (IFA), adyuvante completo de Freund (CFA), IS-COMatrix, GM-CSF, CpG, emulsión de aceite en agua, y similares, pero no se limitan a los mismos. 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.

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 con un metal alcalino, sales con un metal, sales con una base orgánica, sales con un ácido orgánico y sales con un ácido inorgánico. Según se usa en la presente, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que retienen la eficacia y las propiedades biológicas del compuesto y que se obtienen mediante la reacción con ácido o bases inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

En algunas realizaciones, los agentes o las composiciones farmacéuticos de la presente invención pueden incluir además un componente que ceba CTL. Los lípidos se han identificado como sustancias o composiciones capaces de cebar CTL in vivo contra antígenos virales. Por ejemplo, residuos de ácido palmítico se pueden ligar a los grupos amino épsilon y alfa 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 lípido que ceba respuestas de CTL, se pueden usar lipoproteínas de E. coli, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS), para cebar CTL cuando están ligadas covalentemente a un péptido apropiado (véase, p. ej., Deres y cols., Nature 1989, 342: 561-4).

Ejemplos de métodos de administración adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, oral, inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraósea, peritoneal e intravenosa, o similares, y administración sistémica o administración local en la proximidad de los sitios elegidos como diana. La administración se puede realizar mediante una sola administración o reforzarse mediante múltiples administraciones. La dosis de los péptidos de esta 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 es normalmente de 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo, de 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, de 0,1 mg a 10 mg, por ejemplo, de 0,5 mg a 5 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.

(2) Agentes o composiciones farmacéuticos que contienen polinucleótidos como el ingrediente activo

Los agentes o las composiciones farmacéuticos de la presente invención también pueden incluir ácidos nucleicos que codifican los péptidos divulgados en la presente en 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 tipo casete de recombinación homóloga). 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).

Los péptidos de la presente invención también se pueden expresar mediante vectores virales o bacterianos. Ejemplos de vectores de expresión incluyen hospedadores virales atenuados, tales como virus vacunal 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 introducirlo en un hospedador, el virus vacunal recombinante expresa el péptido inmunogénico, y de ese modo produce 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 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., por ejemplo vectores adenovirales y de virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores de *Salmonella typhi*, vectores de toxina del carbunco destoxificados, 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.

El aporte de un polinucleótido a un paciente puede ser bien directo, en cuyo caso el paciente es expuesto 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 paciente. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapias génicas in vivo y ex vivo.

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 son aplicables a la presente invención son descritos por Ausubel y cols. en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; y Krieger en *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990.

Como la administración de péptidos, la administración de polinucleótidos se puede realizar oralmente, mediante inyección intradérmica, subcutánea, intraósea, peritoneal y/o intravenosa, o similares, p. ej., encuentra uso la administración sistémica o la administración local a la proximidad de los sitios elegidos como diana. La administración se puede realizar mediante una sola administración o se puede reforzar mediante múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el portador adecuado o las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de esta invención se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad que se vaya a tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración, y similares, y es normalmente de 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, de 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, de 0,1 mg a 10 mg, por ejemplo, de 0,5 mg a 5 mg y se puede administrar de una vez cada unos pocos días a una vez cada unos pocos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente la dosis adecuada.

X. Métodos que usan los péptidos, exosomas, APCs y CTLs

Los péptidos y los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para preparar o inducir APCs y CTLs. Los exosomas y las APCs de la presente invención también se pueden usar para inducir CTLs. Los péptidos, los

polinucleótidos, los exosomas y las APCs se pueden usar en combinación con cualesquiera otros compuestos con la condición de que los compuestos adicionales no inhiban su inducibilidad para CTL. Así, cualquiera de los susodichos agentes o composiciones farmacéuticos de la presente invención se pueden usar para inducir CTLs. Además de estos, también se pueden usar los que incluyen los péptidos y polinucleótidos para inducir APCs según se explica posteriormente.

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

La presente invención proporciona métodos para inducir APCs con alta inducibilidad para CTL usando los péptidos o polinucleótidos de esta invención.

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

a: recoger APCs de un sujeto:, y

b: poner en contacto las APCs de la etapa a con el péptido de la presente invención.

Las APCs no se limitan a un tipo particular de células. Ejemplos de APCs incluyen, pero no se limitan a, DCs, células de Langerhans, macrófagos, células B y células T activadas, que se sabe que presentan antígenos proteínicos sobre su superficie celular a fin de que sean reconocidos por linfocitos. Preferiblemente, se pueden usar DCs ya que tienen la inducibilidad para CTL más fuerte entre las APCs. Cualesquiera péptidos de la presente invención se pueden usar por sí mismos o con otros péptidos de esta invención.

Por otra parte, cuando los péptidos de la presente invención se administran a un sujeto, las APCs se ponen en contacto con los péptidos in vivo, por consiguiente, las APCs con alta inducibilidad para CTL son inducidas en el cuerpo del sujeto. Así, el método de la presente invención puede incluir administrar los péptidos de esta invención a un sujeto. De forma similar, cuando los polinucleótidos de esta invención se administran a un sujeto en una forma expresable, los péptidos de esta invención se expresan y se ponen en contacto con APCs in vivo, por consiguiente, las APCs con alta inducibilidad para CTL son inducidas en el cuerpo del sujeto. Así, en lugar de la susodicha etapa, el método de la presente invención puede incluir administrar los polinucleótidos de esta invención a un sujeto. La "forma expresable" se describe anteriormente en la sección "IX. Agentes o composiciones farmacéuticos, (2) Agentes o composiciones farmacéuticos que contienen polinucleótidos como el ingrediente activo".

Alternativamente, el método de la presente invención puede incluir introducir el polinucleótido de esta invención en una APC para inducir una APC con inducibilidad para CTL. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

a: recoger APCs de un sujeto:, y

b: introducir un polinucleótido que codifica el péptido de esta invención.

La etapa b se puede realizar como se describe anteriormente en la sección "VI. Células que presentan antígeno".

Alternativamente, la presente invención proporciona un método para preparar una célula que presenta antígeno (APC) que induce específicamente actividad de CTL contra TOMM34, en donde el método incluye una de las siguientes etapas:

(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.

Alternativamente, la presente invención proporciona métodos para inducir APC que tiene inducibilidad para CTL, en donde los métodos incluyen la etapa seleccionada del grupo que consiste en:

(a) poner en contacto una APC con el péptido de la presente invención, y

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

Los métodos de la presente invención se pueden llevar a cabo in vitro, ex vivo o in vivo. Preferiblemente, los métodos de la presente invención se pueden llevar a cabo in vitro o ex vivo. Las APCs usadas para la inducción de

APCs que tienen inducibilidad para CTL pueden ser preferiblemente APCs que expresan antígeno HLA-A2. Estas APCs se pueden preparar mediante los métodos bien conocidos en las técnicas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) obtenidas de un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Las APCs inducidas por el método de la presente invención pueden ser APCs que presentan un complejo del péptido de la presente invención y antígeno HLA (antígeno HLA-A2) sobre su superficie. Cuando APCs inducidas por el método de la presente invención se administran a un sujeto a fin de inducir respuestas inmunitarias contra el cáncer en el sujeto, el sujeto es preferiblemente el mismo del que se derivan las APCs. Sin embargo, el sujeto puede ser diferente del donante de APCs con la condición de que el sujeto tenga el mismo tipo de HLA con el donante de APCs.

5
10 En otra realización, la presente invención proporciona agentes o composiciones para el uso en la inducción de una APC que tiene inducibilidad para CTL, y estos agentes o composiciones incluyen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

15 En otra realización, la presente invención proporciona el uso del péptido de la presente invención o el polinucleótido que codifica el péptido en la fabricación de un agente o una composición formulados para inducir APCs.

Alternativamente, la presente invención proporciona además el péptido de la presente invención o el polipéptido que codifica el péptido para el uso en la inducción de una APC que tiene inducibilidad para CTL.

(2) Método para inducir CTLs

20 La presente invención también proporciona métodos para inducir CTLs usando los péptidos, los polinucleótidos o los exosomas o las APCs de esta invención.

La presente invención también proporciona métodos para inducir CTLs usando un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos (es decir, subunidades de TCR) que es capaz de formar un receptor de células T (TCR) que es capaz de reconocer un complejo de los péptidos de la presente invención y antígenos HLA. Preferiblemente, los métodos para inducir CTLs incluyen al menos una etapa seleccionada de entre:

- 25
- a) poner en contacto una célula T CD8-positiva 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
 - 30 b) introducir un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos que son capaces de formar un TCR que es capaz de reconocer un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA en una célula T CD8-positiva.

35 Cuando los péptidos, los polinucleótidos, las APCs o los exosomas de esta invención se administran a un sujeto, se induce CTL en el cuerpo del sujeto y se potencia la fuerza de la respuesta inmunitaria que elige como diana las células cancerosas. Así, en lugar de la susodicha etapa, los métodos de la presente invención pueden incluir la etapa de administrar los péptidos, los polinucleótidos, las APCs o los exosomas de esta invención a un sujeto.

Alternativamente, el CTL también se puede inducir al usarlos ex vivo y, después de inducir CTL, los CTLs activados se devuelven al sujeto. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

- a: recoger APCs del sujeto,;
- 40 b: poner en contacto con las APCs de la etapa a, con el péptido de la presente invención,; y
- c: cocultivar las APCs de la etapa b con células T CD8-positivas.

45 Las APCs que se van a cocultivar con las células T CD8-positivas en la etapa c anterior también se pueden preparar al transferir un gen que incluye un polinucleótido de esta invención en APCs según se describe anteriormente en la sección "VI. Células que presentan antígeno", aunque la presente invención no se limita a esto y abarca cualquier APC que presente eficazmente el presente sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de esta invención.

50 Opcionalmente, se pueden utilizar los exosomas que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido de esta invención en lugar de las susodichas APCs. A saber, la presente invención puede incluir la etapa de cocultivar exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido de esta invención. Estos exosomas se pueden preparar mediante los métodos descritos anteriormente en la sección "V. Exosomas".

Por otra parte, el CTL de la presente invención se puede inducir al introducir en una célula T CD8-positiva un polinucleótido/polinucleótidos que codifican las subunidades de TCR, en donde el TCR formado por estas unidades de TCR es capaz de unirse a un complejo de un antígeno de HLA y el péptido de esta invención sobre una superficie celular. Esta transducción se puede realizar según se describe anteriormente en la sección "VIII. Receptor de células T (TCR)".

Los métodos de la presente invención se pueden llevar a cabo in vitro, ex vivo o in vivo. Preferiblemente, los métodos de la presente invención se pueden llevar a cabo in vitro o ex vivo. Las células T CD8-positivas usadas para la inducción de CTLs se pueden preparar mediante métodos muy conocidos en la técnica a partir de PBMCs obtenidas de un sujeto. En realizaciones preferidas, el donante para células T CD8-positivas puede ser un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Los CTLs inducidos por los métodos de la presente invención pueden ser CTLs que pueden reconocer células que presentan un complejo del péptido de la presente invención y antígeno HLA sobre su superficie. Cuando CTLs inducidos por el método de la presente invención se administran a un sujeto a fin de inducir respuestas inmunitarias contra el cáncer en el sujeto, el sujeto es preferiblemente el mismo del que se derivan las células T CD8-positivas. Sin embargo, el sujeto pueden ser uno diferente del donante de células T CD8-positivas con la condición de que el sujeto tenga el mismo tipo de HLA con el donante de células T CD8-positivas.

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

En otra realización, la presente invención proporciona un agente o una composición para inducir CTL, en donde el agente o la composición comprende uno o más péptidos, uno o más polinucleótidos o uno o más APCs o exosomas de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona el uso del péptido, el polinucleótido o la APC o el exosoma de la presente invención en la fabricación de un agente o una composición formulados para inducir un CTL.

Alternativamente, la presente invención proporciona además el péptido, el polinucleótido o la APC o el exosoma de la presente invención para el uso en la inducción de un CTL.

(3) Método para inducir una respuesta inmunitaria

Por otra parte, la presente invención proporciona métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra enfermedades relacionadas con TOMM34. Enfermedades adecuadas incluyen cáncer, ejemplos del cual incluyen, pero no se limitan a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos.

Los métodos de la presente invención incluyen la etapa de administrar agentes o composiciones que contienen cualquiera de los péptidos de la presente invención o polinucleótidos que los codifican. Alternativamente, el método de la presente invención puede incluir la etapa de administrar exosomas o APCs que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención. Para detalles, véase el punto de "IX. Agentes o composiciones farmacéuticos", particularmente la parte que describe el uso de los agentes o las composiciones farmacéuticos de la presente invención como vacunas. Además, los exosomas y las APCs 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 (APCs)" y (1) y (2) de "X. Métodos que usan los péptidos, los exosomas, las APCs y los CTLs", anteriormente.

La presente invención también proporciona un método o procedimiento para fabricar un agente o una composición farmacéuticas que inducen una respuesta inmunitaria, en donde el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

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

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un ácido nucleico que codifica un péptido tal como el divulgado en la presente en una forma expresable;

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

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

En el contexto de la presente invención, un cáncer que sobreexpresa TOMM34 se puede tratar con estos ingredientes activos. Ejemplos de este cáncer incluye, pero no se limita a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos. Según esto, antes de la

5 administración de las vacunas o las composiciones farmacéuticas que incluyen los ingredientes activos, es preferible confirmar si el nivel de expresión de TOMM34 en las células o los tejidos que se van a tratar se potencia 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) TOMM34, método que puede incluir las etapas de:

10 i) determinar el nivel de expresión de TOMM34 en células o tejido o tejidos obtenidos de un sujeto con el cáncer que se va a tratar;

ii) comparar el nivel de expresión de TOMM34 con un control normal; y

iii) administrar al menos un componente seleccionado de entre (a) a (d) descritos anteriormente a un sujeto con cáncer que sobreexpresa TOMM34 en comparación con control normal.

15 Alternativamente, la presente invención proporciona una vacuna o composición farmacéutica que incluye al menos un componente seleccionado de entre (a) a (d) descritos anteriormente, para el uso en la administración a un sujeto que tiene un cáncer que sobreexpresa TOMM34. En otras palabras, la presente invención proporciona además un método para identificar a un sujeto que va a ser tratado con un polipéptido de TOMM34 de la presente invención, incluyendo este método la etapa de determinar un nivel de expresión de TOMM34 en células o tejido o tejidos

20 derivados del sujeto, en donde un incremento del nivel en comparación con un nivel de control normal del gen indica que el sujeto tiene un cáncer que puede ser tratado con el polipéptido de TOMM34 de la presente invención. Los métodos para tratar el cáncer de la presente invención se describen con más detalle posteriormente.

Cualquier célula o tejido derivados de un sujeto se puede usar para la determinación de la expresión de TOMM34 con la condición de que incluya el producto de transcripción o traducción buscado de TOMM34. Ejemplos de muestras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, tejidos y fluidos corporales, tales como sangre, esputos y orina. Preferiblemente, la muestra de células o tejidos derivada del sujeto contiene una población celular que incluye una

25 célula epitelial, más preferiblemente una célula epitelial cancerosa o una célula epitelial derivada de un tejido que se sospecha que es canceroso. Además, si es necesario, la célula se puede purificar de los tejidos y fluidos corporales obtenidos, y a continuación se puede usar como la muestra derivada del sujeto.

30 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, ratón, rata, perro, gato, caballo y vaca.

35 Según la presente invención, se determina el nivel de expresión de TOMM34 en células o tejidos obtenidos de un sujeto. El nivel de expresión se puede determinar a nivel del producto de transcripción (ácido nucleico), usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARNm de TOMM34 se puede cuantificar usando sondas mediante métodos de hibridación (p. ej., hibridación Northern). La detección se puede llevar a cabo en un chip o una micromatriz. El uso de una micromatriz es preferible para detectar el nivel de expresión de TOMM34. Los expertos en la técnica pueden preparar estas sondas utilizando la información de secuencia de TOMM34. Por ejemplo, el

40 ADNc de TOMM34 se puede usar como las sondas. Si es necesario, las sondas se pueden etiquetar con una etiqueta adecuada, tal como tintes, sustancias fluorescentes e isótopos, y el nivel de expresión del gen se puede detectar como la intensidad de las etiquetas hibridadas.

45 Por otra parte, el producto de transcripción de TOMM34 se puede cuantificar usando cebadores mediante métodos de detección basados en la amplificación (p. ej., RT-PCR). Estos cebadores se pueden preparar basándose en la información de secuencia del gen.

Específicamente, una sonda o un cebador usados para el presente método se hibrida bajo condiciones restrictivas, moderadamente restrictivas o poco restrictivas al ARNm de TOMM34. Según se usa en la presente, la expresión "condiciones (de hibridación) restrictivas" se refiere a condiciones bajo las cuales 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 circunstancias diferentes. La hibridación específica de secuencias más largas se observa a temperaturas superiores que las secuencias más cortas. Generalmente, la temperatura de una condición restrictiva se selecciona para que sea aproximadamente 5 grados centígrados inferior que el punto de fusión término (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, al T_m , 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio. Típicamente, condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal sea 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

60

menos aproximadamente 30 grados centígrados para sondas o cebadores cortos (p. ej., de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 grados centígrados para sondas o cebadores más largos. También se pueden alcanzar condiciones restrictivas con la adición de sustancias desestabilizantes, tales como formamida.

5 Una sonda o un cebador de la presente invención es típicamente un oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido incluye típicamente una región de una secuencia nucleotídica que se hibrida bajo condiciones restrictivas a al menos aproximadamente 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 o 25, una secuencia nucleotídica de la hebra de sentido consecutiva de un ácido nucleico incluyendo una secuencia de TOMM34, o una secuencia nucleotídica de la hebra antisentido de un ácido nucleico incluyendo una secuencia de TOMM34, o de un mutante presente en la naturaleza de estas secuencias. En particular, por ejemplo, en una realización preferida, un oligonucleótido que tiene una longitud de 5-50 se puede usar como un cebador para amplificar los genes que se van a detectar. Más preferiblemente, ARNm o ADNc de un gen TOMM34 se puede detectar con una sonda o un cebador oligonucleotídicos de un tamaño específico, generalmente 15-30 b de longitud. El tamaño puede variar de al menos 10 nucleótidos, al menos 12 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos y las sondas y los cebadores pueden variar en tamaño de 5-10 nucleótidos, 10-15 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-25 nucleótidos y 25-30 nucleótidos. En realizaciones preferidas, la longitud de la sonda o el cebador oligonucleotídicos se puede seleccionar de 15-25. Procedimientos, dispositivos o reactivos de ensayo para la detección de un gen al usar tal sonda o cebador oligonucleotídicos son muy conocidos (p. ej. micromatriz de oligonucleótidos o PCR). En estos ensayos, las sonda o los cebadores pueden incluir secuencias marcadoras o conectoras. Además, las sondas o los cebadores se pueden modificar con una etiqueta o un ligando de afinidad detectables para ser capturados. Alternativamente, en procedimientos de detección basados en hibridación, un polinucleótido que tiene unos pocos cientos (p. ej., aproximadamente 100-200) de bases a unas pocas kilo(p. ej., aproximadamente 1000-2000) bases de longitud también se puede usar para una sonda (p. ej., ensayo de transferencia Northern o análisis de micromatriz de ADNc).

25 Alternativamente, se puede detectar el producto de traducción para el diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, se puede determinar la cantidad de proteína de TOMM34 (SEQ ID N°: 42) o el fragmento inmunológicamente de la misma. 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, también se puede usar para la detección cualquier fragmento modificación (p. ej., un anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo, con la condición de que el fragmento o el anticuerpo modificado retenga la capacidad de unión a la proteína de TOMM34. Estos anticuerpos contra los péptidos de la presente invención y los fragmentos de los mismos también son proporcionados por la presente invención. 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 estos anticuerpos y equivalentes de los mismos.

40 Como otro método para detectar el nivel de expresión del gen TOMM34 basado en su producto de traducción, la intensidad de la tinción se puede medir a través de análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo contra la proteína de TOMM34. A saber, en esta medida, una tinción fuerte indica un incremento de la presencia/el nivel de la proteína y, al mismo tiempo, un alto nivel de expresión del gen TOMM34.

45 Se puede determinar que el nivel de expresión de un gen diana, p. ej., el gen TOMM34, 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 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.

50 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". La diferencia entre un nivel de expresión de muestra y un nivel de control se puede normalizar al nivel de expresión de ácidos nucleicos de control, p. ej., genes constitutivos, cuyos niveles de expresión se sabe que no difieren dependiendo del estado canceroso o no canceroso de la célula. Genes de control ejemplares incluyen, pero no se limitan a, beta-actina, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa y proteína ribosómica P1.

55 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 patológicos (cancerosos o no cancerosos) se conocen. Además, células normales obtenidas de regiones no cancerosas de un órgano que tiene el cáncer que se va a tratar se pueden usar como control normal. Alternativamente, el nivel de control se puede determinar mediante un método estadístico basado en los resultados obtenidos al analizar el nivel o los niveles de expresión previamente determinados del gen TOMM34 en muestras procedentes de sujetos cuyos estados patológicos 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 TOMM34 en una muestra biológica se puede comparar con múltiples niveles de control, determinados 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 de los niveles de expresión del gen TOMM34 en una población con un estado patológico conocido. El valor estándar se puede obtener mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede usar como el valor estándar un intervalo de media +/- 2 D.E. o media +/- 3 D.E.

5 En el contexto de la presente invención, un nivel de control determinado a partir de una muestra biológica que se sabe que es no 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".

10 Cuando el nivel de expresión del gen TOMM34 se incrementa en comparación con el nivel de control normal, o es similar/equivalente al nivel de control canceroso, el sujeto se puede diagnosticar con un cáncer a tratar.

La presente invención también proporciona un método para (i) diagnosticar si un sujeto tiene el cáncer a tratar, y/o (ii) seleccionar a un sujeto para el tratamiento del cáncer, método que incluye las etapas de:

15 a) determinar el nivel de expresión de TOMM34 en células o tejido o tejidos obtenidos de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que se va a tratar;

b) comparar el nivel de expresión de TOMM34 con un nivel de control normal;

c) diagnosticar al sujeto del cáncer que se va a tratar, si el nivel de expresión de TOMM34 se incrementa en comparación con el nivel de control normal; y

20 d) seleccionar al sujeto para el tratamiento del cáncer, si el sujeto es diagnosticado del cáncer que se va a tratar, en la etapa c).

Alternativamente, este método incluye las etapas de:

a) determinar el nivel de expresión de TOMM34 en células o tejido o tejidos obtenidos de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que se va a tratar;

b) comparar el nivel de expresión de TOMM34 con un nivel de control canceroso;

25 c) diagnosticar al sujeto del cáncer que se va a tratar, si el nivel de expresión de TOMM34 es similar o equivalente al nivel de control canceroso; y

d) seleccionar al sujeto para el tratamiento del cáncer, si el sujeto es diagnosticado del cáncer que se va a tratar, en la etapa c).

30 La presente invención también proporciona un estuche de diagnóstico para diagnosticar o determinar a un sujeto que sufre o se sospecha que sufre un cáncer que puede ser tratado con el polipéptido de TOMM34 de la presente invención, que también pueden ser útil para valorar el pronóstico del cáncer y/o comprobar la eficacia o la aplicabilidad de una terapia contra el cáncer, particularmente una inmunoterapia contra el cáncer. Ejemplos ilustrativos de cánceres adecuados incluyen, pero no se limitan a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos. Más particularmente, el estuche incluye preferiblemente al menos un reactivo para detectar la expresión del gen TOMM34 en una célula derivada del sujeto, este reactivo seleccionado del grupo de:

(a) un reactivo para detectar ARNm del gen TOMM34;

(b) un reactivo para detectar la proteína de TOMM34 o el fragmento inmunológicamente de la misma; y

40 (c) un reactivo para detectar la actividad biológica de la proteína de TOMM34.

Ejemplos de reactivos adecuados para detectar ARNm del gen TOMM34 incluyen ácidos nucleicos que se unen específicamente a o identifican el ARNm de TOMM34, tales como oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a una porción del ARNm de TOMM34. Estos tipos de oligonucleótidos se ejemplifican por cebadores y sondas que son específicos para el ARNm de TOMM34. 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 TOMM34 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 TOMM34.

Por otra parte, ejemplos de reactivos adecuados para detectar la proteína de TOMM34 o el fragmento inmunológicamente de la misma pueden incluir anticuerpos para la proteína de TOMM34 o el fragmento inmunológicamente de la misma. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Por otra parte, cualquier fragmento o modificación (p. ej., un anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo se puede usar como el reactivo, con la condición de que el fragmento o el anticuerpo modificado retenga la capacidad de unión a la proteína de TOMM34 o el fragmento inmunológicamente de la misma. 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 estos anticuerpos y equivalentes de los mismos. Por otra parte, el anticuerpo se puede etiquetar con moléculas generadoras de señales a través de enlace directo o una técnica de etiquetado indirecta. Las etiquetas y los métodos para etiquetar anticuerpos y detectar la unión de los anticuerpos a sus dianas son muy conocidos en la técnica y cualesquiera etiquetas y métodos se pueden emplear para la presente invención. Por otra parte, se puede incluir en el estuche más de un reactivo para detectar la proteína de TOMM34.

El estuche puede contener más de uno de los susodichos reactivos. El estuche puede incluir además una matriz sólida y un reactivo para unirse a una sonda contra un gen TOMM34 o un anticuerpo contra un péptido de TOMM34, un medio y un recipiente para cultivar células, reactivos de control positivo y negativo y un anticuerpo secundario para detectar un anticuerpo contra un péptido de TOMM34. Por ejemplo, muestras de tejidos obtenidas de sujetos sin cáncer o que sufren cáncer 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, cinta, CD-ROM, etc.) con instrucciones de uso. Estos reactivos y similares pueden estar retenidos en un recipiente con una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

En una realización de la presente invención, cuando el reactivo es una sonda contra el ARNm de TOMM34, 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, conteniendo 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 TOMM34 presente en la muestra. Los sitios de detección se pueden configurar en cualquier conformación adecuadamente detectable y típicamente están en la conformación de una barra o un punto que abarca la anchura de una tira de ensayo.

El estuche de la presente invención puede incluir además una muestra de control positivo o una muestra estándar de TOMM34. La muestra de control positivo de la presente invención se puede preparar al recoger muestras positivas a TOMM34 y a continuación ensayar sus niveles de TOMM34. Alternativamente, una proteína o un polinucleótido de TOMM34 purificados se pueden añadir a las células que no expresan TOMM34 para formar la muestra positiva o la muestra estándar de TOMM34. En la presente invención, el TOMM34 purificado puede ser una proteína recombinante. El nivel de TOMM34 de la muestra de control positivo es, por ejemplo, mayor que el valor de corte.

En una realización, la presente invención proporciona además un estuche de diagnóstico que incluye una proteína o una proteína parcial de la misma reconocida específicamente por el anticuerpo de la presente invención o el fragmento del mismo.

Ejemplos del péptido parcial de la proteína de la presente invención incluyen polipéptidos que consisten en al menos 8, preferiblemente 15 y más preferiblemente 20 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la presente invención. El cáncer se puede diagnosticar al detectar un anticuerpo en una muestra (p. ej., sangre, tejido) usando una proteína o un péptido (polipéptido) de la presente invención. El método para preparar la proteína de la presente invención y los péptidos son como se describen anteriormente.

La presente invención proporciona métodos para diagnosticar un cáncer, que se pueden realizar al determinar la diferencia entre la cantidad de anticuerpo anti-TOMM34 y la de la muestra de control correspondiente según se describe anteriormente. Se sospecha que el sujeto sufre cáncer si las células o los tejidos del sujeto contienen anticuerpos contra los productos de expresión (TOMM34) del gen y se determina que la cantidad del anticuerpo anti-TOMM34 tiene mayor nivel que el valor de corte en comparación con el control normal.

En otra realización, un estuche de diagnóstico de la presente invención puede incluir el péptido de la presente invención y una molécula de HLA que se une al mismo. El método para detectar CTLs específicos de antígeno usando péptidos antigénicos y moléculas del HLA ya se ha establecido (por ejemplo, Altman JD y cols., Science, 1996, 274(5284): 94-6). Así, el complejo del péptido de la presente invención y la molécula de HLA se puede aplicar al método de detección para detectar CTLs específicos de antígeno tumoral, permitiendo de ese modo una

detección más temprana, recaída /o metástasis del cáncer. Además, se puede emplear para la selección de sujetos a los que se pueden aplicar los productos farmacéuticos, incluyendo el péptido de la presente invención como un ingrediente activo, o la valoración del efecto del tratamiento de los productos farmacéuticos.

5 Particularmente, según el método conocidos (véase, por ejemplo, Altman JD y cols., Science. 1996, 274(5284): 94-6), se puede preparar el complejo oligomérico, tal como el tetrámero, de la molécula del HLA radioetiquetada y el péptido de la presente invención. Con el uso del complejo, se puede realizar el diagnóstico, por ejemplo, al cuantificar los CTLs específicos de antígeno-péptido en los linfocitos de sangre periférica derivados del sujeto que se sospecha que sufre cáncer.

10 La presente invención proporciona además un método o agentes de diagnóstico para evaluar la respuesta inmunológica de un sujeto al usar epítomos peptídicos como los descritos en la presente. En una realización de la invención, péptidos restringidos por HLA A-2 como los descritos en la presente se usan como reactivos para evaluar o predecir una respuesta inmunitaria de un sujeto. La respuesta inmunitaria que se va a evaluar es inducida al poner en contacto un inmunógeno con células inmunocompetentes in vitro o in vivo. En realizaciones preferidas, las células inmunocompetentes para evaluar una respuesta inmunológica se puede seleccionar entre sangre periférica, un linfocito de sangre periférica (PBL) y una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). Métodos para recoger o aislar estas células inmunocompetentes son muy conocidos en las técnicas. En algunas realizaciones, se puede emplear como el reactivo cualquier agente que pueda dar como resultado la producción de CTLs específicos de antígeno que reconocen y se unen al epítomo o los epítomos peptídicos. El reactivo peptídico no necesita usarse como el inmunógeno. Sistemas de ensayo que se usan para este análisis incluyen desarrollos técnicos relativamente recientes tales como tetrámeros, tinción para linfocinas intracelulares y ensayos de liberación de interferón, o ensayos ELISPOT. En una realización preferida, las células inmunocompetentes que se van a poner en contacto con el reactivo peptídico pueden ser células que presentan antígeno incluyendo células dendríticas .

25 Por ejemplo, los péptidos de la presente invención se pueden usar en ensayos de tinción de tetrámeros para valorar células mononucleares de sangre periférica con respecto a la presencia de CTLs específicos de antígeno después de la exposición a un antígeno de células tumorales o un inmunógeno. El complejo tetrámero de HLA se puede usar para visualizar directamente CTLs específicos de antígeno (véanse, p. ej., Ogg y cols., Science 279 : 2103-2106, 1998; y Altman y cols., Science 174 : 94-96, 1996) y determinar la frecuencia de la población de CTLs específicos de antígeno en una muestra de células mononucleares de sangre periférica. Un reactivo tetrámero que usa un péptido de la invención se puede generar como sigue:

35 Un péptido que se une a una molécula del HLA se repliega en presencia de la correspondiente cadena pesada de HLA y microglobulina beta 2 para generar un complejo trimolecular. En el complejo, el extremo carboxilo de la cadena pesada se biotinila en un sitio que se manipulaba previamente en la proteína. A continuación, se añade estreptavidina al complejo para formar un tetrámero compuesto por el complejo trimolecular y estreptavidina. Por medio de estreptavidina etiquetada fluorescentemente, el tetrámero se puede usar para teñir células específicas para antígeno. Las células se pueden identificar, por ejemplo, mediante citometría de flujo. Este análisis se puede usar con propósitos de diagnóstico o pronóstico. Las células identificadas mediante el procedimiento también se pueden usar con propósitos terapéuticos.

45 La presente invención también proporciona reactivos para evaluar respuestas de recuerdo inmunitario (véase, p. ej., Bertoni et al, J. Clin. Invest. 100 : 503-513, 1997 y Penna y cols, J Exp. Med. 174 : 1565-1570, 1991) que comprenden péptidos de la presente invención. Por ejemplo, muestras de PBMC de paciente procedentes de individuos con cáncer que se va a tratar se analizan con respecto a la presencia de CTLs específicos de antígeno usando péptidos específicos. Una muestra de sangre que contiene células mononucleares se puede evaluar al cultivar las PBMCs y estimular las células con un péptido de la invención. Después de un período de cultivo apropiado, se puede analizar la población celular expandida, por ejemplo, con respecto a la actividad de CTL.

50 Los péptidos también se pueden usar como reactivos para evaluar la eficacia de una vacuna. Las PBMCs obtenidas de un paciente vacunado con un inmunógeno se pueden analizar usando, por ejemplo, cualquiera de los métodos descritos anteriormente. El paciente somete a tipaje para HLA y reactivos epitópicos peptídicos que reconocen las moléculas específicas para un alelo presentes en ese paciente se seleccionan con respecto al análisis. La inmunogenicidad de la vacuna se puede indicar por la presencia de CTLs específicos de un epítomo en la muestra de PBMC.

60 Los péptidos de la invención también se pueden usar para elaborar anticuerpos, usando técnicas muy conocidas en la especialidad (véanse, p. ej. CURRENTPROTOCOLSINIMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; y Antibodies A Laboratory Manual, Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), que pueden ser útiles como reactivos para diagnosticar o comprobar un cáncer. Estos anticuerpos pueden incluir los que reconocen un péptido en el contexto de una molécula de HLA, es decir, anticuerpos que se unen a un complejo de péptido-MHC.

65 Los péptidos y las composiciones de la presente invención tienen un número de usos adicionales, algunos de los cuales se describen en la presente. Por ejemplo, la presente invención proporciona un método para diagnosticar o detectar un trastorno caracterizado por la expresión de un polipéptido inmunogénico de TOMM34. Estos métodos

incluye la etapa de determinar el nivel de expresión del péptido de la presente invención, o un complejo del péptido de la presente invención y una molécula de HLA clase I en una muestra biológica. La expresión de un péptido o complejo de péptido y molécula de HLA clase I se puede determinar o detectar al ensayar con un socio de unión para el péptido o complejo. En una realización preferida, un socio de unión para el péptido o el complejo es un anticuerpo que reconoce y se une específicamente al péptido. La expresión de TOMM34 en una muestra biológica, tal como una biopsia tumoral, también se puede probar mediante protocolos de amplificación por PCR estándar usando cebadores de TOMM34. Un ejemplo de expresión tumoral se presenta aquí y una divulgación adicional de condiciones y cebadores ejemplares para la amplificación de TOMM34 se pueden encontrar en el documento WO2003/27322.

Preferiblemente, los métodos de diagnóstico incluyen la etapa de poner en contacto una muestra biológica aislada de un sujeto con un agente específico para el péptido de la presente invención para detectar la presencia del péptido de la presente invención en la muestra biológica. Según se usa en la presente, "poner en contacto" significa poner la muestra biológica en proximidad suficiente con el agente y bajo las condiciones apropiadas de, p. ej., concentración, temperatura, tiempo, fuerza iónica, para permitir la interacción específica entre el agente y el péptido de la presente invención que están presentes en la muestra biológica. En general, las condiciones para poner en contacto el agente con la muestra biológica son condiciones conocidas por los expertos normales en la técnica para facilitar una interacción específica entre una molécula y su cognado (p. ej., una proteína y su receptor, un anticuerpo y su antígeno proteínico, un ácido nucleico y su hebra complementaria) en una muestra biológica. Condiciones óptimas para facilitar una interacción específica entre una molécula y su cognado se describen en la Patente de EE. UU. N° 5.108.921, expedida a favor de Low y cols.

El método de diagnóstico de la presente invención se puede realizar en cualquiera de o tanto in vivo como in vitro. Según esto, la muestra biológica se puede situar in vivo o in vitro en la presente invención. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser un tejido in vivo y el agente específico para el polipéptido inmunogénico de TOMM34 se puede usar para detectar la presencia de estas moléculas en el tejido. Alternativamente, la muestra biológica se puede recoger o aislar in vitro (p. ej., una muestra de sangre, un espécimen de biopsia tumoral, un extracto tisular). En una realización particularmente preferida, la muestra biológica puede ser una muestra que contiene células, más preferiblemente una muestra que contiene células tumorales recogidas de un sujeto que va a ser diagnosticado o tratado.

Alternativamente, el diagnóstico se puede realizar mediante un método que permita la cuantificación directa de células T específicas de un antígeno al teñir con complejos multímeros de HLA etiquetados con fluoresceína (por ejemplo, Altman, J. D. y cols., 1996, *Science* 274 : 94; Altman, J. D. y cols., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 10330 ;). También se ha proporcionado la tinción de linfocinas intracelulares y ensayos de liberación de interferón gamma o ensayos ELISPOT. La tinción con tetrámeros, la tinción de linfocinas intracelulares y los ensayos ELISPOT parecen ser todos al menos 10 veces más sensibles que los ensayos más convencionales (Murali-Krishna, K. y cols., 1998, *Immunity* 8 : 177; Lalvani, A. y cols., 1997, *J. Exp. Med.* 186 : 859; Dunbar, P. R. y cols., 1998, *Curr. Biol.* 8 : 413;). También se pueden usar pentámeros (p. ej., documento US 2004-209295A), dextrámeros (p. ej., documento WO 02/072631) y estreptámeros (p. ej., *Nature medicine* 6. 631-637 (2002)).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para diagnosticar o evaluar una respuesta inmunológica de un sujeto al que se administra al menos uno de los péptidos de TOMM34 de la presente invención, incluyendo el método las etapas de:

- (a) poner en contacto un inmunógeno con células inmunocompetentes bajo la condición adecuada de inducción de CTL específico para el inmunógeno;
- (b) detectar o determinar el nivel de inducción del CTL inducido en la etapa (a); y
- (c) correlacionar la respuesta inmunológica del sujeto con el nivel de inducción de CTL.

En la presente invención, el inmunógeno incluye preferiblemente al menos uno de (a) un péptido o péptidos de TOMM34 de la presente invención, por ejemplo, péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32, y péptidos modificados de los mismos (péptidos que tienen estas secuencias de aminoácidos, y péptidos que tienen en los que estas secuencias de aminoácidos se han modificado con 1, 2 o más sustituciones de aminoácidos). Mientras tanto, las condiciones adecuadas de inducción de CTL específicos de un inmunógeno son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, células inmunocompetentes se pueden cultivar in vitro bajo la presencia de un inmunógeno o inmunógenos para inducir un CTL específico del inmunógeno. A fin de inducir CTLs específicos de inmunógeno, se pueden añadir al cultivo celular cualesquiera factores estimulantes. Por ejemplo, IL-2 es un factor estimulante preferible para la inducción de CTLs. En algunas realizaciones, la etapa de comprobar o evaluar la respuesta inmunológica de un sujeto que se va a tratar con terapia peptídica contra el cáncer se puede realizar antes, durante y/o después del tratamiento. En general, durante un protocolo de terapia del cáncer, se administran repetidamente péptidos inmunogénicos a un sujeto que se va a tratar. Por ejemplo, los péptidos

5 inmunogénicos se pueden administrar todas las semanas durante 3-10 semanas. Según esto, la respuesta
 inmunológica el sujeto se puede evaluar o comprobar durante el protocolo de terapia del cáncer. Alternativamente, la
 etapa de evaluación o comprobación de la respuesta inmunológica a la terapia contra el cáncer puede al finalizar el
 protocolo terapéutico. Según la presente invención, la inducción potenciada de CTLs específicos de inmunógeno en
 10 comparación con el control indica que el sujeto que se va a evaluar o diagnosticar respondía inmunológicamente al
 inmunógeno o los inmunógenos que se han administrado. Controles adecuados para evaluar la respuesta
 inmunológica pueden incluir, por ejemplo, un nivel de inducción de CTL cuando las células inmunocompetentes no
 se ponen en contacto con péptido, o se ponen en contacto con un péptido o péptidos de control que tienen
 15 secuencias de aminoácidos distintas a los péptidos de TOMM34 (p. ej., una secuencia de aminoácidos aleatoria). En
 una realización preferida, la respuesta inmunológica del sujeto se evalúa de un modo específico para la secuencia,
 en comparación con una respuesta inmunológica entre cada inmunógeno administrado al sujeto. En particular,
 incluso cuando se administra al sujeto una mezcla de algunos tipos de péptidos de TOMM34, la respuesta
 inmunológica podría variar dependiendo de los péptidos. En ese caso, en comparación con la respuesta
 20 inmunológica entre cada péptido, se podrían identificar péptidos para los que el sujeto muestra una respuesta
 superior.

XI. Anticuerpos

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen al péptido de la presente invención. Los anticuerpos
 preferidos se unen específicamente al péptido de la presente invención y no se unirán (o lo harán débilmente) al no
 péptido de la presente invención. Alternativamente, los anticuerpos se unen al péptido de la invención así como a los
 20 homólogos de los mismos.

Los anticuerpos contra el péptido de la invención pueden encontrar uso en ensayos de diagnóstico y pronóstico del
 cáncer y metodologías de diagnóstico por imagen. De forma similar, estos anticuerpos pueden encontrar uso en el
 tratamiento, el diagnóstico y/o el pronóstico de otros cánceres, en la medida en que TOMM34 también se exprese o
 25 sobreexpresen en el paciente con cáncer. Por otra parte, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos monocatenarios)
 expresados intracelularmente son terapéuticamente útiles para tratar cánceres en los que está implicada la
 expresión de TOMM34, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria,
 cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma,
 30 cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos.

La presente invención también proporciona diversos ensayo inmunológico para la detección y/o la cuantificación de
 la proteína de TOMM34 (SEQ ID N^o: 42) o fragmentos de la misma incluyendo los péptidos de la presente invención.
 Estos ensayos pueden comprender uno o más anticuerpos anti-TOMM34 capaces de reconocer y unirse a proteína
 35 de TOMM34 o fragmentos de la misma, según sea apropiado. En el contexto de la presente invención, los
 anticuerpos anti-TOMM34 que se unen a polipéptido de TOMM34 reconocen preferiblemente un péptido de la
 presente invención. Una especificidad de unión de un anticuerpo se puede confirmar con una prueba de inhibición.
 Esto es, cuando la unión entre un anticuerpo que se va a analizar y la longitud completa del polipéptido de TOMM34
 polipéptido se inhibía bajo la presencia de un péptido de la presente invención, se muestra que este anticuerpo se
 40 une específicamente al fragmento. En el contexto de la presente invención, estos ensayos inmunológicos se realizan
 dentro de diversos formatos de ensayo inmunológico muy conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a,
 diversos tipos de radioinmunoensayos, una técnica inmunocromatográfica, ensayos de inmunoabsorción con
 enzimas ligadas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes con enzimas ligadas (ELIFA), y similares.

Ensayos inmunológicos relacionados pero sin anticuerpos de la invención también comprenden ensayos de
 45 inmunogenicidad de células T (inhibidores o estimulantes) así como ensayos de unión al complejo principal de
 histocompatibilidad (MHC). Además, también se proporcionan mediante la invención métodos de diagnóstico por
 imagen inmunológicos capaces de detectar cánceres que expresan TOMM34, incluyendo, pero no limitados a,
 métodos de diagnóstico por imagen radioescintigráficos que usan anticuerpos de la presente invención etiquetados.
 Estos ensayos son clínicamente útiles en la detección, la comprobación y el pronóstico de cánceres que expresan
 50 TOMM34, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de
 mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de
 próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumor de tejidos blandos.

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen al péptido de la invención. Un anticuerpo de la invención
 55 se puede usar en cualquier forma, tal como anticuerpos monoclonales o policlonales, e incluye antisuero obtenido al
 inmunizar a un animal tal como un conejo con el péptido de la invención, todas las clases de anticuerpos policlonales
 y monoclonales, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados producidos mediante recombinación genética.

Un péptido de la invención usado como un antígeno para obtener un anticuerpo se puede derivar de cualquier
 60 especie de animal, pero preferiblemente se deriva de un mamífero tal como un ser humano, un ratón o una rata, más
 preferiblemente de un ser humano. Un péptido derivado de ser humano se puede obtener de las secuencias
 nucleotídicas o de aminoácidos divulgadas en la presente.

Según la presente invención, el péptido que se va a usar como un antígeno de inmunización puede ser una proteína completa o un péptido parcial de la proteína. Un péptido parcial puede comprender, por ejemplo, el fragmento amino (N)-terminal o carboxi (C)-terminal de un péptido de la presente invención.

5 En la presente, un anticuerpo de la presente invención se define como una proteína que reacciona bien con la longitud total o bien con un fragmento de un péptido de TOMM34. En una realización preferida, un anticuerpo de la presente invención reconoce péptidos fragmentarios de TOMM34 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID N^o: 1, 5, 31 y 32. Métodos para sintetizar un oligopéptido son muy conocidos en la técnica. Después de la síntesis, los péptidos se pueden purificar opcionalmente antes del uso como un inmunógeno.

10 En la presente invención, el oligopéptido (p. ej. 9 o 10-mero) se puede conjugar o conectar con portadores para potencial la inmunogenicidad. La hemocianina de lapa californiana (KLH) es muy conocida como el portador. Un método para conjugar KLH y un péptido también son muy conocidos en las técnicas.

15 Alternativamente, un gen que codifica un péptido de la invención o su fragmento se puede insertar en un vector de expresión conocido, que a continuación se usa para transformar una célula hospedadora según se describe en la presente. El péptido deseado o su fragmento se puede recuperar del exterior o el interior de células hospedadoras mediante cualquier método estándar, y posteriormente se puede usar como un antígeno. Alternativamente, se pueden usar como el antígeno células enteras que expresan el péptido o sus lisados o un péptido sintetizado químicamente.

20 Cualquier animal mamífero se puede inmunizar con el antígeno, pero preferiblemente se tiene en cuenta la compatibilidad con células parentales usadas para la fusión celular. En general, se usan animales de Rodentia, Lagomorpha o Primates. Animales de Rodentia incluyen, por ejemplo, ratón, rata y hámster. Animales de Lagomorpha incluyen, por ejemplo, conejo. Animales de Primates incluyen, por ejemplo, un mono de Catarrhini (mono del Viejo Mundo) tal como *Macaca fascicularis*, mono rhesus, babuino sagrado y chimpancé.

Métodos para inmunizar animales con antígenos son conocidos en la técnica. La inyección intraperitoneal o la inyección subcutánea de antígenos es un método estándar para la inmunización de mamíferos. Más específicamente, los antígenos se pueden diluir y suspender en una cantidad apropiada de solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, etc. Si se desea, la suspensión de antígeno se puede mezclar con una cantidad apropiada de un adyuvante estándar, tal como adyuvante completo de Freund, transformado en emulsión y a continuación administrado a animales mamíferos. Preferiblemente, está seguido por varias administraciones de antígeno mezclado con una cantidad apropiada de adyuvante incompleto de Freund cada de 4 a 21 días. También se puede usar para la inmunización un portador apropiado. Después de la inmunización

30 como anteriormente, el suero se examina mediante un método estándar con respecto a un incremento en la cantidad de anticuerpos deseados.

40 Los anticuerpos policlonales contra los péptidos de la presente invención se pueden preparar al recoger sangre del mamífero inmunizado examinado con respecto al incremento de anticuerpos deseados en el suero, y separar el suero de la sangre mediante cualquier método convencional. Los anticuerpos policlonales pueden incluir suero que contiene los anticuerpos policlonales, así como la fracción que contiene los anticuerpos policlonales se puede aislar del suero. Se puede preparar inmunoglobulina G o M a partir de una fracción que reconoce solamente el péptido de la presente invención usando, por ejemplo, una columna de afinidad acoplada con el péptido de la presente invención, y purificando adicionalmente esta fracción usando una columna de proteína A o proteína G.

45 Para preparar anticuerpos monoclonales, se recogen células inmunitarias del mamífero inmunizado con el antígeno y se verifican con respecto al incremento del nivel de anticuerpos deseados en el suero según se describe anteriormente, y se someten a fusión celular. Las células inmunitarias usadas para la fusión celular se obtienen preferiblemente del bazo. Otras células parentales preferidas que se van a fusionar con el inmunocito anterior incluyen, por ejemplo, células de mieloma de mamíferos, y más preferiblemente células de mieloma que tienen una propiedad adquirida para la selección mediante fármacos de células fusionadas.

50 El inmunocito y las células de mieloma anteriores se pueden fusionar según métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein y cols. (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).

55 Los hibridomas resultantes obtenidos mediante la fusión celular se pueden seleccionar al cultivarlos en un medio de selección estándar, tal como medio HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo celular se continúa típicamente en el medio HAT durante de varios días a varias semanas, siendo el tiempo suficiente para permitir que todas las otras células, con la excepción del hibridoma deseado (células no fusionadas), mueran. A continuación, se realiza una dilución limitativa estándar para cribar y clonar una célula de hibridoma que produce en anticuerpo deseado.

60 Además del método anterior, en el que un animal no humano se inmuniza con un antígeno para preparar un hibridoma, linfocitos humanos tales como los infectados por virus EB se pueden inmunizar con un péptido, células que expresan péptido o sus lisados in vitro. A continuación, se pueden obtener los linfocitos inmunizados se fusionan con células de mieloma derivadas de ser humano que son capaces de dividirse indefinidamente, tales como U266,

para dar un hibridoma que produce un anticuerpo humano deseado que es capaz de unirse al péptido (Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada N° (JP-A) Sho 63-17688).

5 Los hibridomas obtenidos se trasplantan posteriormente a la cavidad abdominal de un ratón y se extrae la ascitis. Los anticuerpos monoclonales obtenidos se pueden purificar, por ejemplo, mediante precipitación de sulfato amónico, una columna de proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico en DEAE o una columna de afinidad a la que se acopla el péptido de la presente invención. El anticuerpo de la presente invención se puede usar no solo para la purificación y la detección del péptido de la presente invención, sino también como un candidato para agonistas y antagonistas del péptido de la presente invención.

10 Alternativamente, una célula inmunitaria, tal como un linfocito inmunizado, que produce anticuerpos puede immortalizarse mediante un oncogén y usarse para preparar anticuerpos monoclonales.

15 Los anticuerpos monoclonales así obtenidos también se pueden preparar recombinantemente usando técnicas de manipulación genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck y Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1990)). Por ejemplo, un ADN que codifica un anticuerpo puede clonarse a partir de una célula inmunitaria, tal como un hibridoma o un linfocito inmunizado que produce el anticuerpo, insertarse en un vector apropiado e introducirse en células hospedadoras para preparar un anticuerpo recombinante. La presente invención también proporciona anticuerpos recombinantes preparados como se describe anteriormente.

20 Por otra parte, un anticuerpo de la presente invención puede ser un fragmento de un anticuerpo o anticuerpo modificado, con la condición de que se una a uno o más de los péptidos de la invención. Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo puede ser Fab, F(ab')₂, Fv o Fv monocatenario (scFv), en los que los fragmentos Fv de las cadenas H y L se ligan mediante un conector apropiado (Huston y cols., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988)). Más específicamente, se puede generar un fragmento de anticuerpo al tratar un anticuerpo con una enzima, tal como papaína o pepsina. Alternativamente, un gen que codifica el fragmento de anticuerpo se puede construir, insertar en un vector de expresión y expresar en una célula hospedadora apropiada (véanse, por ejemplo, Co y cols., J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better y Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun y Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseaux y cols., Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird y Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991)).

25 Un anticuerpo se puede modificar mediante la conjugación con una variedad de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). La presente invención proporciona estos anticuerpos modificados. El anticuerpo modificado se puede obtener al modificar químicamente un anticuerpo. Estos métodos de modificación son convencionales en la especialidad.

30 Alternativamente, un anticuerpo de la presente invención se puede obtener como un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de anticuerpo no humano y la región constante derivada de anticuerpo humano, o como un anticuerpo humanizado, que comprende la región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de anticuerpo no humano, la región de marco (FR) y la región constante derivada de anticuerpo humano. Estos anticuerpos se pueden preparar según una tecnología conocida. La humanización se puede realizar al sustituir CDRs de roedor o secuencias de CDR para las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano (véase, p. ej., Verhoeyen y cols., Science 239:1534-1536 (1988)). Según esto, estos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia procedente de una especie no humana.

35 También se pueden usar anticuerpos totalmente humanos que comprenden regiones variables humanas además de regiones de marco y constantes humanas. Estos anticuerpos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la especialidad. Por ejemplo, los métodos in vitro implican el uso de bibliotecas recombinantes de fragmentos de anticuerpo humano exhibidos sobre un bacteriófago (p. ej., Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)). De forma similar, los anticuerpos humanos se pueden elaborar al introducir locus de inmunoglobulina humana en animales, p. ej., ratones, transgénicos en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcialmente o completamente. Este enfoque se describe, p. ej., en las Patentes de EE. UU. N° 6.150.584, 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016.

40 Los anticuerpos obtenidos como anteriormente se pueden purificar hasta homogeneidad. Por ejemplo, la separación y la purificación del anticuerpo se pueden realizar según los métodos de separación y purificación usados para proteínas generales. Por ejemplo, el anticuerpo se puede separar y aislar mediante el uso apropiadamente seleccionado y combinado de cromatografías en columna, tales como cromatografía de afinidad, filtro, ultrafiltración, desalado, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y enfoque isoeléctrico (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero no se limitan a los mismos. Una columna de proteína A y una columna de proteína G se pueden usar como la columna de afinidad. Columna de proteína A ejemplares que se van a usar incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharose F.F. (Pharmacia).

Ejemplos de métodos cromatográficos adecuados, con la excepción de afinidad, incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía en fase inversa, cromatografía de adsorción y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak y cols., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Los procedimientos cromatográficos se pueden llevar a cabo mediante cromatografía en fase líquida, tal como HPLC y FPLC.

Por ejemplo, se pueden usar la medida de la absorbancia, un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), un inmunoensayo enzimático (EIA), un radioinmunoensayo (RIA) y/o inmunofluorescencia para medir la actividad de unión a antígeno del anticuerpo de la invención. En el ELISA, el anticuerpo de la presente invención se inmoviliza sobre una placa, un péptido de la invención se aplica a la placa y a continuación se aplica una muestra que contiene un anticuerpo deseado, tal como un sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpo o anticuerpos purificados. A continuación, se aplica un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario y está etiquetado con una enzima, tal como fosfatasa alcalina, y la placa se incuba. Posteriormente, después del lavado, se añade a la placa un sustrato enzimático, tal como fosfato de p-nitrofenilo, y se mide la absorbancia para evaluar la actividad de unión a antígeno de la muestra. Un fragmento del péptido, tal como un fragmento C-terminal o N-terminal, se puede usar como el antígeno para evaluar la actividad de unión del anticuerpo. Se puede usar BIAcore (Pharmacia) para evaluar la actividad del anticuerpo según la presente invención.

Los métodos anteriores permiten la detección o la medida de un péptido de la invención, al exponer un anticuerpo de la invención a una muestra que se supone que contiene un péptido de la invención, y detectar o medir el complejo inmunitario formado por el anticuerpo y el péptido.

Debido a que el método de detección o medida del péptido según la invención puede detectar o medir específicamente un péptido, el método puede ser útil en una variedad de experimentos en los que se usa el péptido.

XII. Vectores y células hospedadoras

La presente invención también proporciona un vector y una célula hospedadora en los que se introduce un nucleótido que codifica el péptido de la presente invención. Un vector de la presente invención es útil para mantener un nucleótido, especialmente un ADN, de la presente invención en la célula hospedadora, para expresar el péptido de la presente invención para administrar el nucleótido de la presente invención para terapia génica.

Cuando *E. coli* es una célula hospedadora y el vector se amplifica y se produce en gran cantidad en *E. coli* (p. ej., JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1Blue), el vector debe tener "ori" para ser amplificado en *E. coli* y un gen marcador para seleccionar *E. coli* transformada (p. ej., un gen de resistencia a fármaco seleccionado por un fármaco tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol o similares). Por ejemplo, se pueden usar vectores de la serie M13, vectores de la serie pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, etc. Además, también se pueden usar pGEM-T, pDIRECT y pT7 para subclonar y extraer ADNc así como los vectores descritos anteriormente. Cuando se usa un vector para producir la proteína de la presente invención, es especialmente útil un vector de expresión. Por ejemplo, un vector de expresión que se va a expresar en *E. coli* debe tener las características anteriores para ser amplificado en *E. coli*. Cuando se usan *E. coli*, tales como JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1 Blue, como una célula hospedadora, el vector debe tener un promotor, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward y cols., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), el promotor araB (Better y cols., Science 240: 1041-3 (1988)), el promotor T7 o similares, que pueda expresar eficazmente el gen deseado en *E. coli*. A ese respecto, se pueden usar pGEX-5X-1 (Pharmacia), el "QIAexpress system" (Qiagen), pEGFP y pET (en este caso, el hospedador es preferiblemente BL21 que expresa ARN polimerasa de T7), por ejemplo, en lugar de los vectores anteriores. Adicionalmente, el vector también puede contener una secuencia de señal para la secreción de péptido. Una secuencia de señal ejemplar que dirige el péptido que se va a secretar al periplasma de la *E. coli* es la secuencia de señal pelB (Lei y cols., J Bacteriol 169: 4379 (1987)). Medios para introducir los vectores en la célula hospedadora diana incluyen, por ejemplo, el método del cloruro cálcico y el método de electroporación.

Además de *E. coli*, por ejemplo, se pueden usar vectores de expresión derivados de mamíferos (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen) y pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8), vectores de expresión derivados de células de insecto (por ejemplo, "sistema de expresión de baculovirus Bac-to-BAC" (GIBCO BRL), pBacPAK8), vectores de expresión derivados de plantas (p. ej., pMH1, pMH2), vectores de expresión derivados de virus de animales (p. ej., pHSV, pMV, pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (p. ej., pZlpneo), un vector de expresión derivado de levadura (p. ej., "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01) y vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (p. ej., pPL608, pKTH50) para producir el polipéptido de la presente invención.

A fin de expresar el vector en células animales, tales como células CHO, COS o NIH3T3, el vector debe tener un promotor necesario para la expresión en estas células, por ejemplo, el promotor SV40 (Mulligan y cols., Nature 277: 108 (1979)), el promotor MMLV-LTR, el promotor EF1 alfa (Mizushima y cols., Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990)), el promotor CMV y similares, y preferiblemente un gen marcador para seleccionar transformantes (por ejemplo, un gen

de resistencia a fármaco seleccionado por un fármaco (p. ej., neomicina, G418)). Ejemplos de vectores conocidos con estas características incluyen, por ejemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

5 Aunque se pueden usar en la práctica o las pruebas de la presente invención métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, se describen métodos y materiales adecuados.

Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

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

Ejemplos

Materiales y Métodos

Líneas celulares

15 T2, línea celular linfoblastoide B HLA-A*0201-positiva, y COS7, línea de células renales de mono verde africano, se adquirieron de ATCC.

Selección de candidatos de péptidos derivados de TOMM34

20 Péptidos 9-meros y 10-meros derivados de TOMM34 que se unen a una molécula de HLA-A*0201 se predijeron usando el software de predicción de la unión "BIMAS" (http://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)). 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 espectrométrico de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en dimetilsulfóxido en 20 mg/ml y se almacenaron a -80 grados C.

Inducción de CTL in vitro

30 Células dendríticas (DCs) derivadas de monocitos se usaron como células que presentan antígeno para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra péptidos presentados sobre antígeno leucocitario humano (HLA). Las DCs 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 aisladas de un voluntario normal (HLA-A*0201 positivas) mediante solución Ficoll-Paque plus (Pharmacia) se separaron mediante adherencia a un disco de cultivo tisular de plástico (Becton Dickinson) a fin de enriquecerlas como la fracción de monocitos. La población enriquecida en monocitos se cultivó en presencia de 1000 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (R&D System) y 1000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D System) en AIM-V Medium (Invitrogen) que contiene 2% de suero autólogo (AS) termoinactivado. Después de 7 días de cultivo, las DCs inducidas por citocina se impulsaron con 20 microg/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en presencia de 3 microg/ml de microglobulina beta 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 (datos no mostrados). Estas DCs impulsadas con péptido se inactivaron a continuación mediante irradiado con rayos 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 $1,5 \times 10^4$ DCs 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/AS al 2%. Tres días más tarde, estos cultivos se complementaron con IL-2 (CHIRON) hasta una concentración final de 20 UI/ml. El día 7 y el 14, las células T se estimularon adicionalmente con DCs impulsadas con péptido autólogas. Las DCs se prepararon cada vez mediante el mismo modo descrito anteriormente. El CTL se probó contra células T2 impulsadas con péptido después de la 3ª ronda de estimulación con péptido el día 21 (Tanaka H y cols., Br J Cancer 5 de enero de 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y cols., Br J Cancer 20 de abril de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y cols., Clin Cancer Res 15 de diciembre de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci mayo de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Procedimiento de expansión de CTL

55 Los CTLs se expandieron en el cultivo usando el método similar al descrito por Riddell y cols. (Walter EA y cols., N Engl J Med 19 de octubre de 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR y cols., Nat Med febrero de 1996, 2(2): 216-23). Un total de 5×10^4 CTLs se suspendió en 25 ml de medio AIM-V/AS al 5% con 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas, inactivadas mediante mitomicina C, en presencia de 40 ng/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD3

(Pharmingén). Un día después de iniciar los cultivos, se añadieron a los cultivos 120 UI/ml de IL-2. Los cultivos se alimentaron con medio AIM-V/AS al 5% reciente que contenía 30 UI/ml de IL-2 los días 5, 8 y 11 (Tanaka H y cols., Br J Cancer 5 de enero de 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y cols., Br J Cancer 20 de abril de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y cols., Clin Cancer Res 15 de diciembre de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci mayo de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Establecimiento de clones de CTL

Las diluciones se elaboraron para tener 0,3, 1 y 3 CTLs/pocillo en una placa de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos (Nalge Nunc International). Los CTLs 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 microlitros/pocillo de AIM-V Medium que contiene 5% de AS. Se añadieron al medio 50 microlitros/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 14^º, y los clones de CTL se expandieron usando el mismo método que se describe anteriormente (Uchida N y cols., Clin Cancer Res 15 de diciembre de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci mayo de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci agosto de 2005, 96(8): 498-506).

15 Actividad específica de CTL

Para examinar la actividad específica de CTL, se realizaron un ensayo ELISPOT de IFN-gamma y ELISA de IFN-gamma. Se prepararon T2 impulsadas con péptido (1×10^4 /pocillo) como células estimulantes. Las células cultivadas en 48 pocillos se usaron como células sensibles. Se realizaron un ensayo ELISPOT de IFN-gamma y ELISA de IFN-gamma se realizaron bajo un procedimiento de fabricación.

20 El establecimiento de las células que expresan forzosamente cualquiera o ambos del gen diana y HLA-A02

El ADNc que codifica un marco de lectura abierto de genes diana o HLA-A*0201 se amplificó mediante PCR. El producto amplificado por PCR se clonó en el vector de expresión. Los plásmidos se transfectaron en COS7, que es los genes diana y la línea celular HLA-A*0201-nula, 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 estimulantes (5×10^4 células/pocillo) para el ensayo de actividad de CTL.

Resultados 1

Expresión de TOMM34 potenciada en cánceres

Los extensos datos del perfil de expresión génica obtenidos de diversos cánceres usando una micromatriz de ADNc revelaban que la expresión de TOMM34 (N^º de Registro del GenBank N_006809; por ejemplo, SEQ ID N^º: 42) se elevaba. La expresión de TOMM34 se elevaba válidamente en 4 de 28 AMLs, 4 de 14 CMLs, 8 de 11 cánceres de vejiga urinaria, 1 de 4 cánceres de mama, 1 de 5 cánceres de cuello uterino, 12 de 12 cánceres colorrectales, 5 de 17 cánceres de esófago, 6 de 6 cánceres de hígado, 1 de 10 osteosarcomas, 1 de 26 cánceres de próstata, 1 de 19 carcinomas renales, 2 de 14 SCLCs, 5 de 20 NSCLCs y 10 de 51 tumores de tejidos blandos en comparación con los correspondientes tejidos normales (Tabla 1).

[Tabla 1]

Relación de casos observados regulación al alza de TOMM34 en tejido canceroso según el tejido normal correspondiente

5

Cáncer	Relación
AML	4/28
CML	4/14
Cáncer de vejiga urinaria	8/11
Cáncer de mama	1/4
Cáncer de cuello uterino	1/5
Cáncer colorrectal	12/12
Cáncer de esófago	5/17
Cáncer de hígado	6/6
Osteosarcoma	1/10
Cáncer de próstata	1/26
Carcinoma renal	1/19
SCLC	2/14
NSCLC	5/20
Tumor de tejidos blandos	10/51

Resultados 2

Predicción de a péptidos derivados de TOMM34 que se unen a HLA-A02

10 La Tabla 2a y 2b muestran los péptidos 9-meros y 10-meros de TOMM34 que se unen a HLA-A02 en el orden de alta afinidad. Se seleccionó un total de 40 péptidos con afinidad de unión a HLA-A02 potencial y se examinaron para determinar los péptidos epitópicos.

ES 2 677 118 T3

[Tabla 2a]

Péptidos 9-meros derivados de TOMM34 que se unen a HLA-A02

Posición inicial	secuencia de aminoácidos	puntuación	SEQ ID N°
30	ALYGRALRV	222,566	1
77	ALALVPFSI	60,51	2
52	VLYSNRAAC	27,026	3
110	TVLQIDDNV	11,034	4
220	LLCSNLESA	9,518	5
230	YSNRALCYL	8,115	6
103	MAYVDYKTV	7,883	7
80	LVPFSIKPL	7,309	8
255	KLDGKNVKA	6,955	9
23	GQYAEASAL	6,931	10
195	VLKEEGNEL	5,211	11
111	VLQIDDNVT	5,194	12
238	LVLKQYTEA	4,101	13
1	MAPKFPDSV	3,058	14
113	QIDDNVTSA	2,577	15
253	ALKLDGKNV	2,434	16
239	VLKQYTEAV	2,028	17
144	LPS1PLVPV	1,775	18
142	LKLPSIPLV	1,398	19
279	SSFADISNL	1,187	20

[Tabla 2b]

Péptidos 10-meros derivados de TOMM34 que se unen a HLA-A02

Posición inicial	secuencia de aminoácidos	puntuación	SEQ ID Nº
143	KLPSiPLVPV	559,894	21
97	ALEKyPMAYV	56,309	22
79	ALVPfSIKPL	49,134	23
237	YLVLkQYTEA	34,279	24
135	SLGPeWRLKL	21,362	25
219	SLLCsNLESA	20,716	26
238	LVLKqYTEAV	18,757	27
127	RMTRaLMDSL	17,388	28
113	QIDDnVTSaV	15,684	29
241	KQYTeAVKDC	12,975	30
30	ALYGrALRVL	12,893	31
220	LLCSnLESAT	12,668	32
195	VLKEeGNELV	8,314	33
112	LQIDdNVTSa	8,075	34
194	RVLKeEGNEL	6,916	35
299	KLRQeVKQNL	5,682	36
141	RLKLpSIPLV	5,599	37
160	SLPSeNHKEM	4,968	38
175	KETTaTKNRV	4,733	39
186	SAGDvEKARV	3,961	40

5

La posición inicial indica el número de residuo de aminoácido desde el extremo N de TOMM34.

La puntuación de unión se deriva de "BIMAS".

Inducción de CTL con los péptidos predichos a partir de TOMM34 restringido con HLA-A*0201

10 Se generaron CTLs para los péptidos derivados de TOMM34 según los protocolos que se describen en "Materiales y métodos". La actividad de CTL específicos de péptidos se detectó mediante un ensayo ELISPOT de IFN-gamma (Figura 1a-d). Los siguientes números de pocillo demostraban una potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control: número de pocillo Nº 4 con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID Nº: 1) (a), Nº 2 con TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID Nº: 5) (b), Nº 4 con TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID Nº: 31) (c) y Nº 2 con TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID Nº: 32) (d). Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específicos mediante la estimulación con otros péptidos mostrados en la Tabla 2a y 2b, a pesar de que esos péptidos tenían una posible actividad de unión

15 con HLA-A*0201. Como un caso típico de datos negativos, no se observó producción de IFN-gamma específica a partir de los CTL estimulados con TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID Nº: 21) (e). Como resultado, indicaba que se seleccionaban 4 péptidos derivados de TOMM34 como los péptidos que podrían inducir CTLs potentes.

Establecimiento de una línea y un clon de CTL contra péptido derivado de TOMM34

20 Las células que mostraban actividad de CTL específicos de péptidos detectada mediante el ensayo ELISPOT de IFN-gamma en el número de pocillo Nº 4 con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID Nº: 1) se expandió y la línea de CTL se estableció mediante el procedimiento de expansión que se describe en la sección de "Materiales y métodos" anteriormente. La actividad de CTL de esta línea de CTL se midió mediante un ensayo ELISA de IFN-gamma (Figura 2). La línea de CTL demostraba una potente producción de IFN-gamma contra las células diana impulsadas

25 con el péptido correspondiente en comparación con células diana sin impulso con péptido. Por otra parte, el clon de CTL se estableció al limitar la dilución a partir de la línea de CTL según se describe en "Materiales y métodos", y la

producción de IFN-gamma a partir del clon de CTL contra células diana impulsadas péptido se midió mediante el ensayo ELISA de IFN-gamma. Se observó una potente producción de IFN-gamma a partir del clon de CTL estimulado con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1) (Figura 3).

Actividad específica de CTL contra células diana que expresan TOMM34 y HLA-A*0201

- 5 La línea de CTL establecida producida contra péptido de TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1) se examinó con respecto a la capacidad para reconocer células diana que expresan TOMM34 y molécula de HLA-A*0201. Se prepararon células COS7 transfectadas tanto con la longitud completa de TOMM34 como el gen de HLA-A*0201 (un modelo específico para las células diana que expresan TOMM34 y gen de HLA-A*0201) como células estimulantes, y se usaron como los controles células COS7 transfectadas bien con la longitud total de TOMM34 o bien con HLA-A*0201. En la Figura 4, la línea de CTL estimulada con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1) mostraba una potente actividad de CTL contra células COS7 que expresan tanto TOMM34 como HLA-A* 0201. Por otra parte, no se detectó una actividad de CTL específica contra los controles. Así, estos datos demuestran claramente que el péptido TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1) era procesado endógenamente y presentado sobre las células diana con molécula de HLA-A*0201 y era reconocido por los CTLs. Estos resultados indican que este péptido derivado de TOMM34 puede ser adecuado como una vacuna contra el cáncer para pacientes con tumores que expresan TOMM34.

Análisis de homología de péptidos antigénicos

- 20 Los CTLs estimulados con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID N°: 5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID N°: 31) y TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID N°: 32) mostraban una actividad de CTL significativa y específica. Este resultado se puede deber al hecho de que la secuencia de TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID N°: 5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID N°: 31) y TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID N°: 32) son homólogas a péptido derivado 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 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) que no revelaba secuencia con homología significativa. Los resultados de análisis de homología indican que la secuencia de TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID N°: 1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID N°: 5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID N°: 31) y TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID N°: 32) son únicas y, así, hay poca posibilidad, a nuestro mejor conocimiento, de que esta moléculas provoquen respuestas inmunológicas no pretendidas en alguna molécula no relacionada. En conclusión, se identificaron nuevos péptidos epitópicos de HLA-A*0201 derivados de TOMM34. Por otra parte, los presentes resultados demuestran que el péptido epitópico de TOMM34 puede ser adecuado para el uso en la inmunoterapia del cáncer.

Aplicabilidad industrial

- 35 La presente invención proporciona nuevos TAAs, particularmente los derivados de TOMM34 que inducen respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas y tienen aplicabilidad en una amplia serie de tipos de cáncer. Estos TAAs son útiles como vacunas peptídicas contra enfermedades asociada con TOMM34, p. ej., cáncer, más particularmente, AML, CML, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC y tumores de tejidos blandos.
- 40 Aunque la presente invención se describe en la presente con detalle y con referencia a realizaciones específicas de la misma, se ha de entender que la descripción precedente es de naturaleza ejemplar y explicativa y pretende ilustrar la presente invención y sus realizaciones preferidas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDOS DE TOMM34 Y VACUNAS QUE INCLUYEN LOS MISMOS

<130> ONC-A1035P

5 <150> US 61/419,181

< 151> 2010-12-02

<160> 46

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15 <400> 1

Ala Leu Tyr Gly Arg Ala Leu Arg Val
1 5

<210> 2

< 211> 9

< 212> PRT

20 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 2

Ala Leu Ala Leu Val Pro Phe Ser Ile
1 5

25 <210> 3

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 3

5 Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ala Ala Cys
1 5

<210> 4

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

10 <220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 4

Thr Val Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val
1 5

<210> 5

15 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

20 <400> 5

Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala
1 5

<210> 6

< 211> 9

< 212> PRT

25 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 6

Tyr Ser Asn Arg Ala Leu Cys Tyr Leu
1 5

<210> 7

< 211> 9

5 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 7

10 **Met Ala Tyr Val Asp Tyr Lys Thr Val**
1 5

<210> 8

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

15 <220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 8

Leu Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu
1 5

<210> 9

20 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

25 <400> 9

Lys Leu Asp Gly Lys Asn Val Lys Ala
1 5

<210> 10

< 211> 9
< 212> PRT
< 213> Secuencia Artificial
<220>
5 < 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 10
Gly Gln Tyr Ala Glu Ala Ser Ala Leu
1 5
<210> 11
< 211> 9
10 < 212> PRT
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 11
Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu
1 5
<210> 12
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> Secuencia Artificial
20 <220>
< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 12
Val Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr
1 5
<210> 13
25 < 211> 9
< 212> PRT
< 213> Secuencia Artificial

Ala Leu Lys Leu Asp Gly Lys Asn Val
 1 5

<210> 17

< 211> 9

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 17

Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val
 1 5

10 <210> 18

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 18

Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val Pro Val
 1 5

<210> 19

< 211> 9

20 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 19

Leu Lys Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val
 1 5

25 <210> 20

< 211> 9

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 30

5 Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val Lys Asp Cys
 1 5 10

<210> 31

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

10 <220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 31

 Ala Leu Tyr Gly Arg Ala Leu Arg Val Leu
 1 5 10

<210> 32

15 < 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

20 <400> 32

 Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala Thr
 1 5 10

<210> 33

< 211> 10

< 212> PRT

25 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 33

Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu Val
1 5 10

<210> 34

< 211> 10

5 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 34

10 Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala
1 5 10

<210> 35

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

15 <220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 35

Arg Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu
1 5 10

<210> 36

20 < 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

25 <400> 36

Lys Leu Arg Gln Glu Val Lys Gln Asn Leu
1 5 10

<210> 37

ES 2 677 118 T3

cccaactcac tgcaattcat ctgaacaacc tgagctcctg ggccggggtg gaaggagggg 1500
 gataaaccta aggcctgat ccaaagcagc ctggtgagct ggttctccag ggctgcagtc 1560
 tctccagggtg tacagctgct gtcctgccc tgcctgtcc ttgcacagtc tcctatgtct 1620
 gagccccagt gccttctggt cgggccctcc tttggtgga aggcagagcc ctgacccttg 1680
 aatggttgct cttgactctg tgctgctgcc ttctgcagag aggcacctaa gctgtttaa 1740
 gagcccagtg attgtggctg ctctcctag aggtgggagg gggcaagagg cctccttgg 1800
 cagtgtccat gctttctggg cagggacttg gtttttggt ccaacagtgg ccttctccgg 1860
 gcttcatagt tctttgtaat atggtgaagt taattgtaat tgactgattt tgttgaactg 1920
 tgtgtttaag ctgttgcat aaaaagctt cttctacatc aatatctgct gtgctttcat 1980
 ttatgccttt tcagctttgc acctggaact ctgtagtaat aataaaagt attgcttatt 2040
 gggcattcaa aaaaaaaaa aaaaaa 2066

<210> 42

< 211> 309

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 42

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

ES 2 677 118 T3

130

135

140

Pro Ser Ile Pro Leu Val Pro Val Ser Ala Gln Lys Arg Trp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Pro Ser Glu Asn His Lys Glu Met Ala Lys Ser Lys Ser Lys Glu
165 170 175

Thr Thr Ala Thr Lys Asn Arg Val Pro Ser Ala Gly Asp Val Glu Lys
180 185 190

Ala Arg Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu Val Lys Lys Gly Asn
195 200 205

His Lys Lys Ala Ile Glu Lys Tyr Ser Glu Ser Leu Leu Cys Ser Asn
210 215 220

Leu Glu Ser Ala Thr Tyr Ser Asn Arg Ala Leu Cys Tyr Leu Val Leu
225 230 235 240

Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val Lys Asp Cys Thr Glu Ala Leu Lys Leu
245 250 255

Asp Gly Lys Asn Val Lys Ala Phe Tyr Arg Arg Ala Gln Ala His Lys
260 265 270

Ala Leu Lys Asp Tyr Lys Ser Ser Phe Ala Asp Ile Ser Asn Leu Leu
275 280 285

Gln Ile Glu Pro Arg Asn Gly Pro Ala Gln Lys Leu Arg Gln Glu Val
290 295 300

Lys Gln Asn Leu His
305

<210> 43

< 211> 22

< 212> DNA

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia Artificial

<400> 43

gtctaccagg cattcgcttc at 22

10 <210> 44

< 211> 24

< 212> DNA
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> Secuencia Artificial
5 <400> 44
tcagctggac cacagccgca gcgt 24
<210> 45
< 211> 21
< 212> DNA
10 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> Secuencia Artificial
<400> 45
tcagaaatcc ttctcttga c 21
15 <210> 46
< 211> 24
< 212> DNA
< 213> Secuencia Artificial
<220>
20 < 223> Secuencia Artificial
<400> 46
ctagcctctg gaatccttc tctt 24

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32 que retiene la capacidad para unirse a un antígeno HLA, en donde el antígeno HLA es HLA-A2.
- 5 2. Un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 1, 5, 31 y 32 para dar un péptido modificado que retiene la capacidad para unirse a un antígeno HLA y para inducir un linfocito T citotóxico (CTL), en donde el antígeno HLA es HLA-A2, en donde la sustitución o las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en:
- 10 (a) el segundo aminoácido desde el extremo N está sustituido por metionina, y
- (b) el aminoácido C-terminal está sustituido por valina o leucina.
3. Un polinucleótido aislado que codifica el péptido según la reivindicación 1 o 2.
4. Una composición farmacéutica que comprende:
- 15 (a) uno o más péptidos según la reivindicación 1 o 2;
- (b) uno o más polinucleótidos según la reivindicación 3;
- (c) una o más APCs que presentan un complejo del péptido según la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA sobre su superficie;
- 20 (d) uno o más exosomas que presentan un complejo del péptido de una cualquiera de la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA sobre su superficie; o
- (e) uno o más CTLs que reconocen una célula que presenta un complejo del péptido según la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA sobre su superficie,
- en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable,
- para el uso en
- 25 (i) el tratamiento de un cáncer existente,
- (ii) la profilaxis de un cáncer,
- (iii) la prevención de una recaída posoperatoria de un cáncer o
- (vi) combinaciones de los mismos,
- en donde el antígeno HLA del sujeto que se va a tratar es HLA-A2.
- 30 5. Un método *in vitro* para inducir una célula que presenta antígeno (APC) con capacidad para inducir CTL, que comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) poner en contacto una APC con el péptido según la reivindicación 1 o 2 *in vitro* o *ex vivo*, y
- (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido según la reivindicación 1 o 2 en una APC.
- 35 6. Un método *in vitro* para inducir un CTL, que comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) cocultivar una célula T CD8-positiva con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido según la reivindicación 1 o 2,

(b) cocultivar una célula T CD8-positiva con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido según la reivindicación 1 o 2, y

5 (c) introducir en una célula T un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos subunitarios del receptor de células (TCR), en donde el TCR formado por dichos polipéptidos subunitarios del TCR es capaz de unirse a un complejo de un antígeno de HLA y el péptido según la reivindicación 1 o 2 sobre una superficie celular,

en donde el antígeno HLA es HLA-A2

10 7. Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido según la reivindicación 1 o 2.

8. La APC según la reivindicación 7, que se induce mediante un método para inducir una célula que presenta antígeno (APC) con capacidad para inducir CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

(a) poner en contacto una APC con el péptido según la reivindicación 1 o 2 in vitro o ex vivo, y

15 (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido según la reivindicación 1 o 2 en una APC.

9. Un CTL aislado que elige como diana cualquiera de los péptidos según la reivindicación 1 o 2.

10. El CTL según la reivindicación 9, que se induce mediante un método para inducir un CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

20 (a) cocultivar una célula T CD8-positiva con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido según la reivindicación 1 o 2,

(b) cocultivar una célula T CD8-positiva con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno de HLA y el péptido según la reivindicación 1 o 2, y

25 (c) introducir en una célula (T un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos subunitarios del receptor de células (TCR), en donde el TCR formado por dichos polipéptidos subunitarios del TCR es capaz de unirse a un complejo de un antígeno de HLA y el péptido según la reivindicación 1 o 2 sobre una superficie celular,

en donde el antígeno HLA es HLA-A2.

30 11. Un vector que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el péptido según la reivindicación 1 o 2.

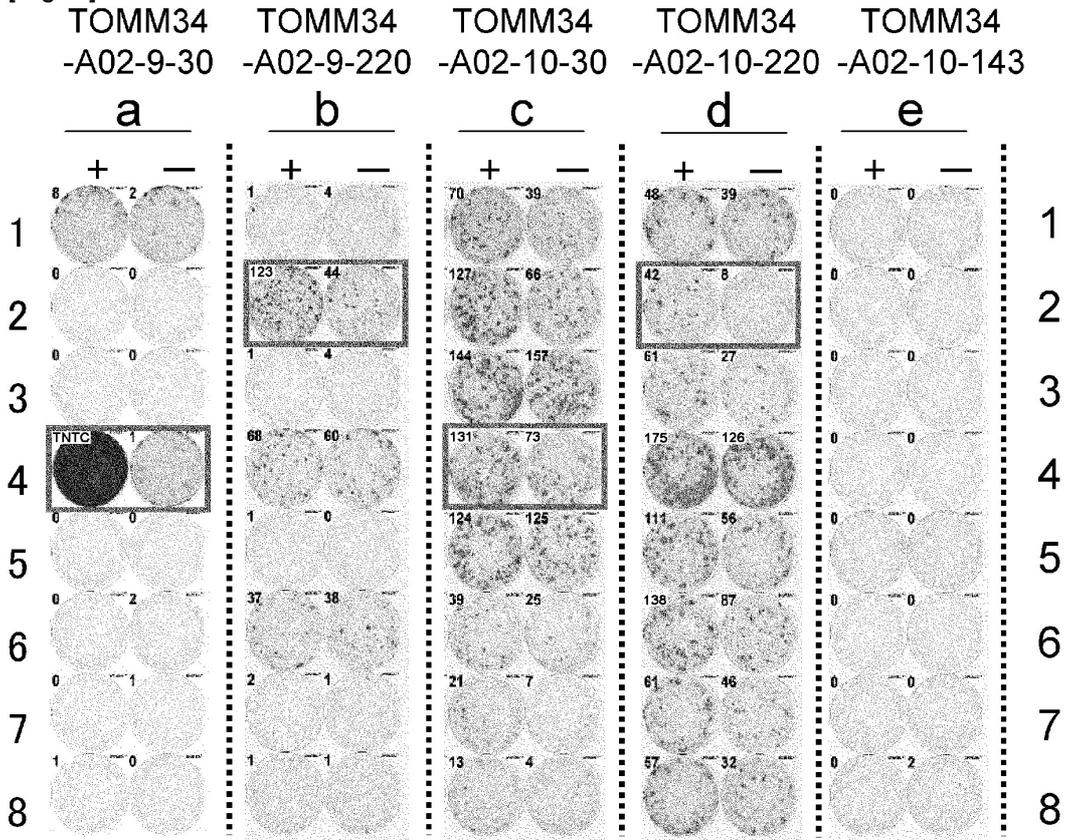
12. Una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión según la reivindicación 11.

35 13. Un exosoma que presenta un complejo que comprende el péptido según la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA, en donde el antígeno HLA es HLA-A2

14 Un anticuerpo contra el péptido según la reivindicación 1 o 2.

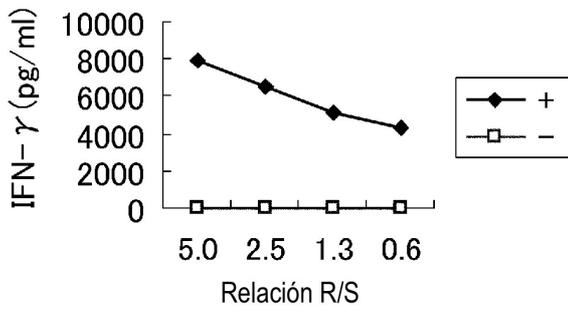
40 15. Un estuche de diagnóstico que comprende el péptido según la reivindicación 1 o 2, el polinucleótido según la reivindicación 3 o el anticuerpo según la reivindicación 14.

[Fig. 1]



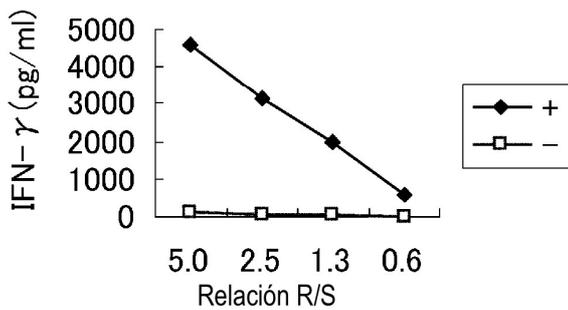
[Fig. 2]

TOMM34-A02-9-30 #4



[Fig. 3]

TOMM34-A02-9-30 #4-105



[Fig. 4]

