(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 728 998**

(51) Int. CI.:

A61K 38/04 (2006.01)
A61K 38/08 (2009.01)
C07K 14/82 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2010 E 16188901 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3124035**

(54) Título: **Nuevo antígeno de cáncer EEF2**

(30) Prioridad:

08.01.2009 JP 2009002608

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2019

(73) Titular/es:

INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC. (100.0%)
13-9, Enoki-cho
Suita-shi, Osaka 564-0053, JP

(72) Inventor/es:

SUGIYAMA, HARUO y
OJI, YUSUKE

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Nuevo antígeno de cáncer EEF2

Campo técnico

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de cánceres en un sujeto positivo para HLA-A*2402. Además, la presente invención proporciona el uso de un péptido que contiene aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2 para la producción de dicha composición farmacéutica para el tratamiento y prevención de cánceres, que contiene dicho péptido.

Técnica anterior

Hasta ahora se han dado a conocer diversos marcadores de cáncer. Sin embargo, hay pocos marcadores de cáncer que puedan diagnosticar diversos cánceres usando un marcador, y estos marcadores de cáncer se buscan con atención. Por otra parte, se están desarrollando continuamente fármacos dirigidos contra cánceres a nivel molecular, tales como trastuzumab que se dirige a HER2, imatinib que se dirige a una de las tirosina quinasas, gefitinib que se dirige a EGFR y rituximab que se dirige a un antígeno CD20, sin embargo, todavía no existe ninguna composición farmacéutica para el tratamiento y prevención de cánceres, que se dirija a eEF2, conocido como factor de elongación de la traducción (factor de elongación de la traducción eucariota 2) (Documento no patente 1). Además, se está realizando la búsqueda de proteínas antigénicas con respecto a diversos cánceres, pero únicamente unas pocas proteínas han resultado ser antígenos de cáncer.
El document de patente 1 desvela el uso de péptidos derivados del gen supresor del cancer de Wilms (WT1) que son capaces de inducir los CTL de una manera restringida a HLA-A*2402 para el tratamiento de cáncer. Documento no patente 1: Nygard O, Nilsson L., "Kinetic determination of the effects of ADP-ribosylation on the interaction of eukaryotic elongation factor 2 with ribosomes", J Biol Chem. 1990; 265:6030-4
Documento de patente 1: EP 1 536 009

Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

Por tanto, un objeto a conseguir por la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*2402, en el que dicha composición farmacéutica comprende un péptido derivado de proteína expresada en diversos cánceres. Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un péptido antigénico que consiste en una secuencia de aminoácidos compuesta de aminoácidos contiguos derivada de dicha proteína para la producción de dicha composición farmacéutica.

Medios para solucionar los problemas

Los presentes inventores han dedicado mucha investigación a la consecución de los objetivos anteriores. Como resultado, los presentes inventores han descubierto una proteína marcadora eEF2 que está altamente expresada en diversos tejidos cancerosos y han obtenido un método para detectar cánceres usando, como indicador, la expresión de la proteína marcadora y una composición farmacéutica para el tratamiento y prevención de dicho cáncer, que se dirige a la proteína eEF2. Además, los presentes inventores han descubierto que una parte de una secuencia de aminoácidos contiguos que codifica la proteína eEF2 funciona como péptido antigénico de cáncer y demostraron que dicha parte puede usarse en una composición farmacéutica para el tratamiento y prevención de dicho cáncer.

Por tanto, la presente invención proporciona:

(1) Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de cánceres en un sujeto positivo para un sujeto positivo para HLA-A*2402, en el que la composición farmacéutica comprende un polinucleótido que codifica un péptido eEF2 que consiste en una secuencia de aminoácidos compuesta por aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2, en donde la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en:

(a) Ala Tyr Leu Pro Val Asn Glu Ser Phe (SEQ ID NO:7); y

(b) una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución del aminoácido Tyr en la posición 2 con Phe y/o una sustitución del aminoácido Phe en la posición 9 con Leu en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en (a);

(2) Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de cánceres en un sujeto positivo para HLA-A*2402, en el que dicha composición farmacéutica comprende un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con (1);

(3) la composición farmacéutica de acuerdo con (1) o (2), en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer ductal pancreático, glioblastoma maligno, linfoma maligno y cáncer de células escamosas de cabeza y cuello;
y
(4) el uso del péptido de acuerdo con (1) para la producción de un producto farmacéutico para el tratamiento o la prevención del cáncer.

Efectos de la invención

De acuerdo con la presente divulgación, es posible detectar, en un sujeto que tiene cáncer, o una posibilidad de padecer cáncer, o un pronóstico de cáncer, diversos cánceres, por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer ductal pancreático, glioblastoma, y linfoma maligno Con una alta sensibilidad. Además, es posible inhibir la proliferación de células cancerosas detectadas mediante el método anterior. Además, en el presente documento se desvela un péptido restringido a HLA-A*202 para su uso en una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de cánceres. Por consiguiente, es posible inducir CTL específicos para eEF2 in vivo e in vitro en un sujeto que tiene HLA-A*2402. En particular, como aproximadamente el 55% de los japoneses tienen al menos una molécula de HLA-A*2402, es posible inducir los CTL específicos de eEF2 en una gama muy amplia de sujetos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra que se detectó un anticuerpo IgG de eEF2 en sueros de pacientes con cáncer de pulmón.
La Fig. 2 muestra los resultados de inmunotinción con un anticuerpo anti-eEF2 en secciones de tejido de pulmón obtenidas de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (izquierda) y cáncer de pulmón microcítico (derecha).
La Fig. 3 muestra los resultados de inmunotinción con un anticuerpo anti-eEF2 en secciones de tejido de epitelio escamoso de cabeza y cuello y de epitelio escamoso esofágico, obtenidas de pacientes con cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (izquierda) y cáncer de células escamosas esofágicas (derecha).
La Fig. 4 muestra los resultados de inmunotinción con un anticuerpo anti-eEF2 en secciones tisulares extensas de colon y de estómago obtenidas de pacientes con cáncer de estómago (izquierda) y cáncer de colon (derecha).
La Fig. 5 muestra la detección de un anticuerpo de eEF2 en sueros obtenidos de pacientes con diversos tipos de cánceres y sujetos sanos.
La Fig. 6 muestra que, en pacientes que tienen cáncer de pulmón no microcítico, los sujetos que indican un alto título de anticuerpo de eEF2 en suero tienen un buen pronóstico.
La Fig. 7 muestra que el ARNip bicatenario que se dirige a un ARNm de un gen de eEF2 inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de estómago.
La Fig. 8 muestra que el ARNip bicatenario que se dirige a un ARNm de un gen de eEF2 inhibe la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer.
La Fig. 9 muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{786-794}$.
La Fig. 10 muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{786-794}$ contra células que expresan el gen eEF2 endógeno.
La Fig. 11 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos analizando el interferón-γ inducido usando un péptido $eEF2_{739-747}$ mediante FACS.
La Fig. 12 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos analizando el interferón-γ inducido usando un péptido $eEF2_{661-669}$ mediante FACS.
La Fig. 13 es un gráfico que muestra que la expresión forzada de una proteína eEF2 acelera la progresión de la fase G2/M en el ciclo celular.
La Fig. 14 es un gráfico que muestra que la expresión forzada de una proteína eEF2 acelera la tumorigénesis in vivo.
La Fig. 15 es un gráfico que muestra que la expresión forzada de una proteína eEF2 acelera la tumorigénesis in vivo.
La Fig. 16 muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{739-747}$.
La Fig. 17 muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{519-527}$.
La Fig. 18 muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{671-679}$.
La Fig. 19 muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{661-669}$.
La Fig. 20 muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{394-402}$.
La Fig. 21 muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{284-292}$.
La Fig. 22 muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{292-300}$.
La Fig. 23 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{292-300}$ 2L.
La Fig. 24 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{292-300}$ 2M.
La Fig. 25 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de CTL inducidos usando un péptido $eEF2_{292-300}$ 2L9L.
La Fig. 26 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos midiendo la actividad del interferón-γ cuando se somete a pulsos de un péptido $eEF2_{292-300}$ o de péptidos $eEF2_{292-300}$ de tipo modificado (péptido $eEF2_{292-300}$ 2L,

$eEF2_{292-300}$ 2M y $eEF2_{292-300}$ 2L9L).

La Fig. 27 es un gráfico que muestra la inhibición de la proliferación de células cancerosas por nuevos ARNhc de eEF2 in vitro. El recuento de células se muestra usando el porcentaje (%) del recuento de células en las que se introducen vectores que expresan ARNhc de eEF2, con respecto al recuento de células en las que se introduce el vector de control shLuc.

La Fig. 28 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos midiendo la actividad del interferón-γ cuando se somete a pulsos con un péptido $eEF2_{292-300}$ de tipo modificado (péptido $eEF2_{292-300}$ 2M9L).

La Fig. 29 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la actividad del interferón-γ que indica que siete péptidos eEF2 (péptido $eEF2_{292-300}$, péptido $eEF2_{739-747}$, péptido $eEF2_{519-527}$, péptido $eEF2_{671-679}$, péptido $eEF2_{661-669}$, péptido $eEF2_{394-402}$ y péptido $eEF2_{284-292}$) también actúan como un péptido restringido para HLA-A*0206.

La Fig. 30 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos midiendo la actividad del interferón-γ cuando se somete a pulsos con tres péptidos eEF2 (péptido $eEF2_{409-417}$, péptido $eEF2_{412-420}$ y péptido $eEF2_{701-709}$).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

En el presente documento se desvela un método para detectar cáncer. Los sujetos en los que puede detectarse cáncer usando el presente método pueden ser animales tales como, por ejemplo, seres humanos, monos, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos, perros, gatos y conejos y, más preferentemente, seres humanos. Aunque los presentes métodos pueden usarse aunque los sujetos animales estén sanos, preferentemente se usan en sujetos que tienen cáncer o posibilidad de padecer cáncer. Además, el presente método puede usarse en el pronóstico del tratamiento de cánceres en sujetos. Las características del presente método residen en el hecho de que puede detectar cáncer en los primeros estadios en comparación con el CEA usado como marcador convencional de cáncer. Por ejemplo, el presente método puede detectar cáncer de pulmón no microcítico en los primeros estadios, particularmente en estadio I, con una alta sensibilidad. A este respecto, el estadio I se refiere a un estadio que representa un estado del tumor clasificado en T1 o T2, N0 y M0 en la clasificación TNM definida por la Unión Internacional para el Control del Cáncer, que es una clasificación de los estadios de enfermedad de los tumores malignos.

El presente método puede ponerse en práctica usando muestras obtenidas de los sujetos anteriores. Las muestras usadas en el presente método pueden ser cualquier muestra, y es posible usar tejidos que contienen células, por ejemplo. Las muestras usadas en el presente método preferentemente son diversos tipos de secciones tisulares o sueros. Las muestras pueden adquirirse de los sujetos usando técnicas convencionales para los expertos en la materia. En caso de que se usen secciones tisulares como muestras usadas en el presente método, por ejemplo, los tejidos obtenidos por cirugía o biopsia pueden fijarse durante una noche en formalina al 10% y después incluirse en parafina para preparar secciones delgadas. Por otra parte, en caso de que se usen sueros como muestras usadas en el presente método, puede coagularse sangre periférica de sujetos en un tubo de ensayo que contenga un agente de separación y, después, puede adquirirse el suero por centrifugación.

Los cánceres que pueden detectarse por el presente método incluyen cualquier cáncer que exprese una proteína eEF2, y son preferentemente el adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer ductal pancreático, glioblastoma y linfoma maligno. En particular, se detectan preferentemente adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de colon y linfoma maligno. Los cánceres detectados con el presente método pueden estar en cualquier estadio. Por ejemplo, pueden detectarse cánceres en cualquier estadio, estadio I, estadio II y estadio III en la clasificación TNM definida por la Unión Internacional contra el Cáncer mencionada anteriormente. Un cáncer que puede detectarse por el presente método, particularmente en los primeros estadios, es el cáncer de pulmón no microcítico.

Cuando el presente método de detección se pone en práctica, en las muestras anteriores puede determinarse la presencia o cantidad de polipéptido eEF2. La expresión "polipéptido eEF2" puede significar un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una proteína eEF2 o una secuencia parcial de la misma, e incluye las siguientes variantes. Por tanto, el polipéptido eEF2 puede tener la secuencia de aminoácidos de una proteína eEF2 humana mostrada en la SEQ ID NO:1; o puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene una deleción, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:1, o una secuencia de aminoácidos que tiene una deleción, sustitución, adición y/o inserción de uno o múltiples aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:1, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que tiene una deleción, sustitución o adición de 1 a 9, preferentemente de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, más preferentemente de 1 a 2 aminoácidos y, aún más preferentemente, de un aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una deleción, sustitución, adición y/o inserción de 1 a 9, preferentemente de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, más preferentemente de 1 a 2 aminoácidos y, aún más preferentemente, de un aminoácido; o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 70% o mayor, preferentemente una homología del 80% o mayor, más preferentemente una homología del 90% o mayor y, aún más preferentemente, una homología del 93%, 95% o 99% o mayor, en comparación con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:1; o una secuencia de aminoácidos de un fragmento de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores. La homología de una

secuencia de aminoácidos puede determinarse usando una herramienta de análisis de secuencias convencional tal como FASTA y BLAST. El "fragmento" se refiere a una parte de los polipéptidos eEF2 anteriores. Además, el polipéptido eEF2 puede incluir polipéptidos que tienen propiedades comparables a las de la proteína eEF2 y que tienen una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:1 en condiciones rigurosas. Las propiedades comparables en la presente memoria descriptiva se refieren a propiedades biológica, química y físicamente comparables a las de la proteína eEF2. La proteína eEF2 puede proceder de un ser humano. Sin embargo, aunque la proteína eEF2 proceda de otro animal tal como, por ejemplo, ratón, mono, rata, vaca y gato, en la presente memoria descriptiva, la proteína eEF2 en estos animales se incluye en la proteína eEF2.

Las condiciones de la hibridación anterior pueden seleccionarse convenientemente por los expertos en la materia de acuerdo con la descripción de J. Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition", 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Aunque las condiciones de la hibridación pueden ser condiciones poco rigurosas, se prefieren condiciones muy rigurosas. Unas condiciones poco rigurosas son, por ejemplo, unas condiciones de 42°C, SSC 0,1x y SDS al 0,1%, preferentemente unas condiciones de 50°C, SSC 0,1x y SDS al 0,1%, en una etapa de lavado después de la hibridación de acuerdo con la referencia anterior. Las condiciones muy rigurosas incluyen, por ejemplo, unas condiciones de 65°C, SSC 5x y SDS al 0,1%.

El método de detección desvelado anteriormente puede realizarse por cualquier método. Por ejemplo, el método de detección puede realizarse usando un anticuerpo contra el polipéptido eEF2 anterior. En el método de detección desvelado en el presente documento puede utilizarse un anticuerpo contra un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en una región arbitraria del polipéptido eEF2 anterior. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo contra un polipéptido que tiene una región de posiciones 1-417 o posiciones 411-858 en la secuencia de aminoácidos de la proteína eEF2 humana. El anticuerpo usado en el método puede ser cualquier isotipo de IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Además, el anticuerpo usado en el método puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El anticuerpo usado en el método puede prepararse usando una técnica convencional o puede ser un producto comercializado.

Además, el método de detección desvelado en el presente documento puede realizarse usando un anticuerpo contra un anticuerpo de eEF2. El anticuerpo de eEF2 que puede usarse en el método es uno producido in vivo, es decir, en el cuerpo de un sujeto. Para el método de detección, un anticuerpo contra el anticuerpo de eEF2 anterior puede prepararse por una técnica conocida o puede ser un producto comercializado. Preferentemente, puede usarse un anticuerpo anti-eEF2 (H-118, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Para determinar la presencia o cantidad de un polipéptido eEF2 o un anticuerpo de eEF2 en una muestra, pueden usarse medios y métodos conocidos. Puede usarse cualquier medio y método siempre que pueda detectar cualitativa o cuantitativamente un polipéptido eEF2 o un anticuerpo de eEF2. Por ejemplo, estos incluyen métodos de detección inmunológica para una proteína tales como inmunotinción, transferencia puntual, técnica de anticuerpos fluorescentes, reacción de unión al complemento, medición de anticuerpos neutralizantes, inmunoprecipitación, transferencia de western, radioinmunoensayo (RIA), ELISA y sistema de doble híbrido. Preferentemente, puede usarse inmunotinción o transferencia puntual.

Puede determinarse una evaluación "positiva" en el método de detección comparando la presencia o cantidad de un polipéptido eEF2 o un anticuerpo de eEF2 en una muestra obtenida de un sujeto con la presencia o cantidad del polipéptido eEF2 o anticuerpo de eEF2 en una muestra obtenida de un sujeto sano o de un sujeto en una fase normal. En caso de que se use suero como muestra en el método de detección, puede usarse como indicador el título de anticuerpo (unidades densitométricas) de un anticuerpo de eEF2 en el suero. En este caso, el título de anticuerpo de un anticuerpo de eEF2 en el suero de un sujeto se mide por transferencia puntual, y un valor numérico por encima del valor en suero de un sujeto sano, preferentemente de 1.000 o mayor, más preferentemente de 2.000 o mayor del título de anticuerpo (unidades densitométricas) puede considerarse "positivo". Sin embargo, el valor numérico puede variar dependiendo de diversos factores tales como los tipos de cáncer y los tejidos, y puede establecerse de manera adecuada por los expertos en la materia. Por otra parte, en caso de que se use una sección tisular como muestra, puede usarse como criterio el grado de tinción por inmunotinción en la sección tisular. En este caso, por ejemplo, puede considerarse "positiva" la presencia de células cancerosas que muestran una tinción intensa en comparación con las células normales correspondientes en una cantidad del 25% o mayor de las células cancerosas totales. Sin embargo, la determinación puede realizarse de manera adecuada por los expertos en la materia.

Cuando el método de detección se pone en práctica en un sujeto, puede determinarse en una muestra la presencia o cantidad de un transcrito de un gen de eEF2. El transcrito de un gen de eEF2 significa un producto transcrito a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del polipéptido eEF2 anterior o un fragmento del mismo, y puede ser, por ejemplo, ARNm o cualquier otro tipo de ARN, así como sus fragmentos. Además, en el método de detección puede determinarse la presencia o cantidad de un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, secuencia de ADN) que codifica una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de eEF2 o un fragmento del mismo.

Para determinar la presencia o cantidad del transcrito o polinucleótido anterior en una muestra, pueden usarse medios y métodos convencionales para los expertos en la materia como método de detección de un polinucleótido. Por ejemplo, estos incluyen métodos para detectar un polinucleótido tales como hibridación in situ, transferencia northern, transferencia southern, transferencia puntual, ensayo de protección de RNasa, PCR, RT-PCR y PCR en tiempo real. Además, es posible realizar un método de análisis de genes usando una micromatriz (por ejemplo, micromatriz de ADN, micromatriz de microARN y micromatriz de proteínas). Además, pueden usarse otros métodos siempre que puedan detectar el transcrito o polinucleótido anterior cualitativa o cuantitativamente.

Además, el método puede usarse para el diagnóstico de pronóstico de un sujeto que tiene cáncer. Los cánceres a los que puede aplicarse el método pueden ser cualquier cáncer que exprese una proteína eEF2 como se ha descrito anteriormente y, preferentemente, son adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer ductal pancreático, glioblastoma, linfoma maligno y, más preferentemente, cáncer no microcítico. En el diagnóstico de pronóstico, cuanto mayor es el valor de un título de anticuerpo de un anticuerpo de eEF2 en una muestra obtenida de un sujeto, mejor es el pronóstico. Por ejemplo, el título de anticuerpo (unidades densitométricas) del anticuerpo de eEF2 es un valor de 1.000 o mayor, preferentemente de 2.000 o mayor y, más preferentemente, de 4.000 o mayor, y los expertos en la materia pueden determinar el valor convenientemente teniendo en cuenta diversos factores.

En otro aspecto, se desvela en el presente documento un kit de diagnóstico para detectar cáncer, que comprende, como constituyente esencial, un anticuerpo contra el polipéptido eEF2 o anticuerpo de eEF2 anterior, o una sonda polinucleotídica complementaria al transcrito anterior de un gen de eEF2 o una parte del mismo. El anticuerpo o sonda anterior preferentemente está marcado. El marcaje anterior puede realizarse por un método convencional. El kit contiene, por ejemplo, un reactivo esencial para un método para detectar una proteína o un polinucleótido, un medio de extracción de muestras y un recipiente de reacción, además del anticuerpo contra el polipéptido eEF o anticuerpo de eEF2 anterior, o la sonda polinucleotídica complementaria al transcrito anterior de un gen de eEF2 o una parte del mismo. En general, el kit va acompañado de un manual de instrucciones. El kit puede usarse para detectar de manera eficaz un cáncer que expresa una proteína eEF2 en un suero o un tejido.

En otro aspecto, se desvela en el presente documento un ARNip bicatenario que inhibe la proliferación de células cancerosas. Las células cancerosas cuya proliferación puede inhibirse pueden ser de cualquier cáncer que exprese una proteína eEF2 y, preferentemente, son de adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer ductal pancreático, glioblastoma y linfoma maligno. En particular, se inhiben preferentemente el adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de colon y linfoma maligno.

El ARNip desvelado en el presente documento es un ARNip bicatenario que contiene una cadena codificante y una cadena antisentido que se dirige a una secuencia de nucleótidos de un ARNm transcrito a partir de un gen de eEF2 humano. La secuencia de nucleótidos diana del ARNip puede ser una secuencia parcial de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:1. El ARNip preferentemente es un ARNip bicatenario que consiste en la cadena codificante (SEQ ID NO:2) y la cadena antisentido (SEQ ID NO:3) que tiene las secuencias de ARN mostradas a continuación:

Cadena codificante de ARNip (SEQ ID NO:2); 5'-CAUGGGCAACAUCAUGAUCGAUCCUGUCCU-3'
Cadena antisentido de ARNip (SEQ ID NO:3); 5'-AGGACAGGAUCGAUCAUGAUGUUGCCCAUG-3'.

Aunque las secuencias de ARN preferidas de los ARNip son las secuencias anteriores mostradas en las SEQ ID NO:2 y 3, estas secuencias pueden tener una adición, deleción o sustitución de una, dos o tres bases. Además, estas secuencias pueden tener una sustitución, deleción, adición y/o inserción de 1 a 3, preferentemente de 1 o 2 bases y, más preferentemente, de una base. Las condiciones de hibridación, en este caso, son las condiciones existentes en un cuerpo vivo en caso de que se use el ARNip mediante su administración en un cuerpo vivo, y condiciones moderadamente rigurosas o muy rigurosas en caso de que se use el ARNip in vitro como reactivo. Estas condiciones incluyen, por ejemplo, unas condiciones de hibridación de NaCl 400 mM, PIPES pH 6,4 40 mM, EDTA 1 mM, a una temperatura de 50°C a 70°C durante un periodo de 12 a 16 horas. Además, la secuencia de la cadena codificante del ARNip tiene una homología de secuencia del 90% o mayor, preferentemente del 95% o mayor y, más preferentemente, del 95, 96, 97, 98 o 99% o mayor con una secuencia diana.

Además, el ARNip puede tener la adición de una secuencia saliente en el extremo 5' o 3'. A este respecto, la secuencia saliente se refiere a una secuencia que sobresale añadida al extremo 5' o 3' de una secuencia bicatenaria que consiste en cadenas codificantes y antisentido emparejadas para aumentar la estabilidad del ARNip bicatenario. La secuencia saliente incluye, por ejemplo, una secuencia tal como AG, UA, AUG, UUG y AAGCUU desde el lado 5', y puede usarse cualquier secuencia. En el ARNip bicatenario, preferentemente se añade UU al extremo 3' de cadenas codificantes y antisentido. Además, el ARNip bicatenario anterior puede formar un ARNhc mediante la unión de dos ARNip a través de una secuencia de bucle.

El ARNip bicatenario puede prepararse por un método convencional para los expertos en la materia. Por ejemplo, puede sintetizarse in vitro química o enzimáticamente, o sintetizarse in vivo. Preferentemente se usa un método de síntesis química. Después de sintetizar cada cadena por dicho método de síntesis, las cadenas pueden emparejarse en condiciones de emparejamiento convencionales. Cuando se usan, las cadenas pueden purificarse convenientemente cuando sea necesario. Además, el ARNip bicatenario puede prepararse en forma de un vector de expresión de ARNip que expresa las secuencias de ARN anteriores del ARNip (SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3). En este caso, por ejemplo, para la preparación, puede usarse el vector de expresión de ARNt-ARNhc, piGENE tRNA Pur (Clontech, Palo Alto, CA). No hay una limitación particular sobre la longitud del ARNip usado y, como ejemplo de un ARNip preferido, puede proporcionarse un ARNip de 15 a 50 unidades, como ejemplo más preferido, un ARNip de 20 a 40 unidades y, como ejemplo aún más preferido, un ARNip de 25 a 35 unidades (por ejemplo, 30 unidades). Por tanto, como ejemplo de un ARNip preferido, puede proporcionarse un ARNip bicatenario que puede hibridar con la secuencia: 5'-CAUGGGCAACAUCAUGAUCGAUCCUGUCCU-3' del ARNm de eEF2 y que tiene de 15 a 50 unidades, preferentemente de 20 a 40 unidades, más preferentemente de 25 a 35 unidades (por ejemplo, 30 unidades) de longitud de cada ARNip.

En general, se sabe que un ARNip se une a un ARNm de un gen diana en células en las que se introduce el ARNip e inhibe la expresión del ARNm. Por consiguiente, el ARNip bicatenario desvelado en el presente documento tiene la función de inhibir la expresión de un gen de eEF2, siendo capaz de esta manera de inhibir la proliferación celular en el sujeto en el que se introduce el ARNip. Los métodos para introducir o administrar el ARNip pueden ser los conocidos por los expertos en la materia tales como un método de fosfato cálcico usando un reactivo de transfección, un método de liposomas, un método sin liposomas, electroporación y un método de partículas magnéticas. Como alternativa, puede adoptarse un método en el que el ARNip se integra en un vector de expresión de ARNip convencional y el vector se introduce por un método conocido como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, se introduce un vector de expresión de ARNip que expresa las secuencias de ARN anteriores del ARNip (SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3) por un método conocido. Además, el ARNip puede administrarse en forma de una composición farmacéutica como se describe más adelante.

En el presente documento se desvela una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende el ARNip bicatenario anterior como un principio activo. La composición farmacéutica puede contener un fármaco anticanceroso conocido como un principio activo, además del ARNip bicatenario anterior.

La composición farmacéutica puede contener un ARNip como principio activo en forma de un vector en el que está integrado el ARNip. Por ejemplo, el ARNip puede estar contenido en forma de un ARNip clonado en un vector de expresión de ARNip conocido tal como un vector de expresión de ARNip disponible en el mercado o un vector de expresión de ARNip conocido recombinado de manera adecuada de acuerdo con un aspecto usado. Por consiguiente, en el presente documento se desvela un ácido nucleico que codifica el ARNip desvelado en el presente documento y un vector que contiene el ácido nucleico.

La composición farmacéutica desvelada en el presente documento puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable que se puede usar puede ser uno o más componentes seleccionados entre una solución salina fisiológica, agua destilada, solución de Ringer, una solución salina fisiológica tamponada, una solución de dextrosa, una solución de maltodextrosa, glicerol, etanol y un liposoma. Además, a la composición farmacéutica se le pueden añadir otros aditivos convencionales tales como un antioxidante, una solución acuosa tamponada y un agente bacteriostático. Además, a la composición se le pueden añadir diluyentes, aerosoles, tensioactivos, aglutinantes y lubricantes para producir una solución de inyección, píldoras, cápsulas, granulados o comprimidos.

La forma de dosificación de la composición farmacéutica puede ser la administración oral o la administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intranasal o administración oral), y también pueden usarse otras formas de dosificación siempre que puedan liberar un principio activo eficazmente en una parte afectada o en sus proximidades. La cantidad eficaz del ARNip administrada a través de la composición farmacéutica desvelada en el presente documento puede determinarse dependiendo de condiciones de los sujetos tales como, por ejemplo, peso, edad, sexo y estado de salud de los sujetos, así como cantidad de alimento, frecuencia de administración, método de administración, cantidad de excreción y gravedad de la enfermedad. La cantidad eficaz del ARNip administrado a través de la composición farmacéutica desvelada en el presente documento normalmente es de 0,01 a 100 mg/kg al día y, preferentemente, de 0,1 a 10 mg/kg al día.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un método para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anterior a un sujeto. Los cánceres a tratar o prevenir pueden ser cualquier cáncer siempre que exprese una proteína eEF2 e incluyen, por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer ductal pancreático, glioblastoma y linfoma maligno. Preferentemente, la composición desvelada en el presente documento puede administrarse a un sujeto que se considera "positivo" por el método anterior para detectar cánceres.

En otro aspecto adicional, en el presente documento se desvela el uso del ARNip bicatenario anterior para la producción de un producto farmacéutico para el tratamiento o prevención de cánceres.

En otro aspecto adicional, en el presente documento se desvela un ARNhc o ARNip que inhibe la proliferación de células cancerosas. En general, el ARNhc (ARN de horquilla corta o ARN de horquilla pequeña) es un ARN en el que una cadena codificante y una cadena antisentido están unidas a través de una secuencia de bucle, y pueden producir un ARNip bicatenario mediante la escisión intracelular de la estructura de bucle. El ARNip es preferentemente un ARNip bicatenario. No hay una limitación particular sobre las regiones de eEF2 a las que se dirige el ARNhc o el ARNip de la presente invención, y un ARNhc o ARNip puede proporcionarse como un ejemplo preferido que se dirige a un ARNm transcrito a partir de la siguiente secuencia de ADN:
5'-gcc tggccgagga catcgataaa ggcgagg-3' (SEQ ID NO: 18); o 5'-actcaac cataacactt gatgccgttt ctt-3' (SEQ ID NO: 19). El ARNhc puede ser uno transcrito a partir de un vector que contiene una secuencia de ADN que consiste en una secuencia codificante-secuencia de bucle-secuencia antisentido de la secuencia de ADN anterior. Cuando se transcribe a partir de un vector que contiene dicha secuencia de ADN en un ARN, los ARN derivados de la secuencia codificante y la secuencia antisentido se unen entre sí formando un ARN de horquilla corta y se estabilizan. A este respecto, la secuencia de bucle utilizada puede ser cualquier secuencia, que puede seleccionarse de manera adecuada por los expertos en la materia. Como ejemplo preferido del ARNip desvelado en el presente documento, puede proporcionarse un ARNip que puede hibridar con un ARNm transcrito a partir de 5'-gcc tggccgagga catcgataaa ggcgagg-3' (SEQ ID NO:18) o 5'-actcaac cataacactt gatgccgttt ctt-3' (SEQ ID NO:19). Como ejemplo más específico del ARNip desvelado en el presente documento, puede proporcionarse un ARNip que tiene una secuencia complementaria a un ARNm transcrito a partir de 5'-gcc tggccgagga catcgataaa ggcgagg-3' (SEQ ID NO:18) o 5'-actcaac cataacactt gatgccgttt ctt-3' (SEQ ID NO:19).

Como alternativa, el ARNip puede ser un ARNip bicatenario compuesto por una cadena codificante y una cadena antisentido de un ARNm correspondiente a la secuencia de ADN mostrada en la SEQ ID NO:18 o 19. Como ejemplo preferido del ARNhc desvelado en el presente documento, puede proporcionarse un ARNhc que contiene un ARN que puede hibridar con un ARNm transcrito a partir de 5'-gcc tggccgagga catcgataaa ggcgagg-3' (SEQ ID NO:18) y un ARN que puede hibridar con el ARN.

Además, como ejemplo preferido del ARNhc desvelado en el presente documento, puede proporcionarse un ARNhc que contiene un ARN que puede hibridar con un ARNm transcrito a partir de 5'-actcaac cataacactt gatgccgttt ctt-3' (SEQ ID NO:19) y un ARN que puede hibridar con el ARN.

Como ejemplo más específico del ARNhc, puede mencionarse un ARNhc, que se transcribe a partir de un ácido nucleico que tiene la siguiente secuencia de ADN:

5'-gcc tggccgagga catcgatgaa agcgtgg cttcctgtca cctcgcc tttatcgatg tcctcggcca ggc-3' (SEQ ID NO:20);
5'-actcaac cataacactt gataccattt gtt cttcctgtca aag aaacggcatc aagtgttatg gttgagt-3' (SEQ ID NO:22);
3'-cgg accggctcct gtagctactt tcgcacc gaaggacagt ggagcgg aaatagctac aggagccggt ccg-5' (SEQ ID NO:21); o
3'-tgagttg gtattgtgaa ctatggtaaa caa gaaggacagt ttc tttgccgtag ttcacaatac caactca-5' (SEQ ID NO:23).

La secuencia de ADN o la secuencia de ARN anteriores pueden tener una adición, deleción o sustitución de 1, 2 o 3 bases. Como alternativa, la secuencia puede tener una homología del 90% o mayor, preferentemente del 95% o mayor y, más preferentemente, del 95, 96, 97, 98 o 99% o mayor con la secuencia de ADN o secuencia de ARN anteriores. A este respecto, la homología, las condiciones de hibridación y la longitud del ARNip son como se han descrito anteriormente. Además, la secuencia de ADN o la secuencia de ARN anteriores pueden tener una adición, deleción, sustitución y/o inserción de 1, 2 o 3 bases.

El ARNhc o el ARNip pueden prepararse por un método convencional para los expertos en la materia. Por ejemplo, puede sintetizarse in vitro química o enzimáticamente, o sintetizarse in vivo. Además, el ARNhc o ARNip pueden prepararse en forma de un vector de expresión de ARNhc o un vector de expresión de ARNip que contiene una secuencia de ADN como se ha mostrado en las SEQ ID NO:20 o 22 anteriores. En este caso, por ejemplo, para la preparación, puede usarse el vector de expresión de ARNt-ARNhc, piGENE tRNA Pur (Clontech, Palo Alto, CA).

Los métodos para introducir o administrar el ARNhc o ARNip desvelados en el presente documento pueden ser los conocidos por los expertos en la materia, tales como un método de fosfato cálcico usando un reactivo de transfección, un método de liposomas, un método sin liposomas, electroporación y un método de partículas magnéticas. Como alternativa, puede adoptarse un método en el que el ARN se integra en un vector de expresión de ARNip convencional y el vector se introduce por un método conocido como se ha descrito anteriormente. El ARNhc o ARNip puede administrarse en forma de una composición farmacéutica como se describe más adelante.

En el presente documento se desvela una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende el ARNhc o ARNip anterior como un principio activo. La composición farmacéutica también puede contener un fármaco anticanceroso conocido.

La composición farmacéutica puede contener un ácido nucleico que codifica el ARNhc o ARNip desvelado en el

presente documento (por ejemplo, un ácido nucleico que contiene una secuencia de ADN mostrada en la SEQ ID NO:20 o 22) como principio activo. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser uno en el que el ácido nucleico que contiene dicha secuencia de ADN está integrado en un vector de expresión de ARNhc o vector de expresión de ARNip disponibles en el mercado. Por tanto, en el presente documento se desvela un ácido nucleico que codifica el ARNhc desvelado en el presente documento y un vector que contiene el ácido nucleico.

La composición farmacéutica puede contener vehículos y aditivos convencionales farmacéuticamente aceptables. La forma de dosificación de la composición farmacéutica puede ser la administración oral o la administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intranasal o administración oral). Además, la cantidad eficaz del ARNhc o ARNip administrada a través de la composición farmacéutica puede determinarse dependiendo de condiciones de los sujetos tales como, por ejemplo, peso, edad, sexo y estado de salud de los sujetos, así como cantidad de alimento, frecuencia de administración, método de administración, cantidad de excreción y gravedad de la enfermedad.

En otro aspecto, se desvela en el presente documento un método para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anterior a un sujeto. Los cánceres a tratar o prevenir pueden ser cualquier cáncer siempre que exprese una proteína eEF2 e incluyen, por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer ductal pancreático, glioblastoma y linfoma maligno.

En otro aspecto adicional, se desvela el uso del ARNhc o ARNip anteriores para la producción de un producto farmacéutico para el tratamiento o prevención de cánceres.

En un aspecto adicional, se describe en el presente documento un péptido que contiene aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2. Son ejemplos del péptido, péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos descrita más adelante. Estos péptidos tienen capacidad de unión a una molécula de HLA. Además, estos péptidos inducen una actividad citotóxica. Además, estos péptidos son péptidos eEF2 restringidos para HLA-A*2402. Además, estos péptidos preferentemente tienen una longitud de 9 a 30 aminoácidos. Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de cánceres, en donde dicha composición farmacéutica comprende estos péptidos, y el uso de estos péptidos para la producción de un producto farmacéutico para el tratamiento o prevención de cánceres.

Por tanto, en un aspecto, se describe un péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402. También la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene el péptido eEF2 restringido. Un péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 usado en la presente invención es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta por aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2 compuesta por aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2, en donde la secuencia de aminoácidos anterior se selecciona entre:
Ala Tyr Leu Pro Val Asn Glu Ser Phe (SEQ ID NO:7); y
una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución Del aminoácido tyr en la posición 2 con Phe y/o una sustitución del aminoácido Phe en la posición 9 con Ile o Leu en la SEQ ID NO:7. En caso de que se sustituya un aminoácido en los péptidos anteriores, los sitios de sustitución preferidos son un aminoácido en posición 2 y/o posición 9. Un ejemplo preferido de un aminoácido en posición 2 en los péptidos anteriores es Phe o Tyr. Además, un ejemplo preferido de un aminoácido en posición 9 en el péptido anterior es Ile o Leu. Son ejemplos específicos de dicho péptido de tipo modificado, los péptidos mostrados en la Tabla 12. Un péptido eEF2 preferido en la presente invención es Ala Tyr Leu Pro Val Asn Glu Ser Phe (SEQ ID NO:7). A este respecto, sin embargo, es esencial que todos los péptidos anteriores conserven la capacidad de unión a la molécula de HLA-A*2402. En la presente memoria descriptiva, un péptido que conserva la capacidad de unión a HLA-A*2402 se denomina péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402. Por consiguiente, se desvela una composición farmacéutica que contiene el péptido.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un péptido eEF2 restringido a HLA-A*0201. También se desvela en el presente documento una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de cánceres en un sujeto positivo para HLA-A*0201, que comprende el péptido eEF2 restringido a HLA-A*0201. El péptido eEF2 restringido a HLA-A*0201 es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta por aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2 o un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos compuesta de aminoácidos contiguos derivada de una proteína eEF2. Los candidatos del péptido eEF2 rstringido a HLA-A*0201 usado se ejemplifican en las siguientes Tablas 1 a 7. Entre ellos, un ejemplo de un péptido preferido es un péptido en el que la secuencia de aminoácidos anterior se selecciona entre el grupo que consiste en:

Arg Leu Met Glu Pro Ile Tyr Leu Val (SEQ ID NO:8);
Lys Leu Val Glu Gly Leu Lys Arg Leu (SEQ ID NO:9);
Tyr Leu Asn Glu Ile Lys Asp Ser Val (SEQ ID NO:10);
Ile Leu Thr Asp Ile Thr Lys Gly Val (SEQ ID NO:11);
Leu Met Met Tyr Ile Ser Lys Met Val (SEQ ID NO:12);
Lys Leu Pro Arg Thr Phe Cys Gln Leu (SEQ ID NO:13);
Leu Ile Leu Asp Pro Ile Phe Lys Val (SEQ ID NO:14); y

una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución o deleción o adición de varios aminoácidos, por ejemplo, 1 a 9, preferentemente 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, más preferentemente 1 a 2 aminoácidos y aún más preferentemente un aminoácido en una de las secuencias de aminoácidos anteriores. También puede contener un péptido en el que la secuencia de aminoácidos anterior se selecciona de las secuencias de aminoácidos que tienen sustitución, deleción, adición y/o inserción de varios aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 9, preferentemente, de 1 a 5, de 1 a , de 1 a 3, más preferentemente de 1 a 2 aminoácidos, y aún más preferentemente un aminoácido en una de las secuencias de aminoácidos anteriores. Entre ellas, un péptido eEF2 restringido a HLA-A*0201 particularmente preferido es Arg Leu Met Glu Pro Ile Tyr Leu Val (SEQ ID NO:8) o Ile Leu Thr Asp Ile Thr Lys Gly Val (SEQ ID NO:11). También, el péptido eEF2 restringido a HLA-A*0201 puede tener una sustitución de un aminoácidos, en particular, en la posición 2 y/o en la posición 9 con otro aminoácido. Un ejemplo preferido del aminoácido en la posición 2 en los péptidos anteriores es Leu o Met. También, un ejemplo preferido del aminoácido en la posición 9 en los péptidos anteriores es Leu o Val. Los ejemplos de tales péptidos de tipo modificado se muestran en las tablas 15 a 21. Los ejemplos preferidos son péptidos que tienen, en Leu Ile Leu Asp Pro Ile Phe Lys Val (SEQ ID NO:14), una sustitución en el aminoácido Ile en la posición 2 con Leu o Met, y/o una sustitución del aminoácido Val en la posición 9 con Leu. Los ejemplos particularmente preferidos son Leu Leu Leu Asp Pro Ile Phe Lys Val (SEQ ID NO:15), Leu Met Leu Asp Pro Ile Phe Lys Val (SEQ ID NO:16), Leu Leu Leu Asp Pro Ile Phe Lys Leu (SEQ ID NO:17), o Leu Met Leu Asp Pro Ile Phe Lys Leu (SEQ ID NO:24). En este sentido, sin embargo, es esencial para todos los péptidos anteriores conservar una capacidad de unión a la molécula de HLA-A*0201. En la presente memoria descriptiva, un péptido que conserva una capacidad de unión a la HLA-A*0201 se cita como un péptido eEF2 restringido a HLA-A*0201. También, el péptido eEF2 restringido a HLA-A*0201 puede tener una acción de aumentar una actividad de interferón- y. Además, se pueden usar los péptidos anteriores para un sujeto que no sea positivo para HLA-A*0201. Por consiguiente, un péptido que contiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores y una composición que contiene el péptido se contempla en el presente documento.

En otro aspecto adicional, en el presente documento se desvela un péptido eEF2 restringido para HLA-A*0206. Además, en el presente documento se desvela una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de cánceres en un sujeto positivo para HLA-A*0206, que comprende un péptido eEF2 restringido para HLA-A*0206. El péptido eEF2 restringido para HLA-A*2406 es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos compuesta por aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2 o un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos compuesta por aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2. Un ejemplo preferido del péptido eEF2 restringido para HLA-A*0206 es un péptido en el que la secuencia de aminoácidos anterior se selecciona entre:

Arg Leu Met Glu Pro Ile Tyr Leu Val (SEQ ID NO:8);
Lys Leu Val Glu Gly Leu Lys Arg Leu (SEQ ID NO:9);
Tyr Leu Asn Glu Ile Lys Asp Ser Val (SEQ ID NO:10);
Ile Leu Thr Asp Ile Thr Lys Gly Val (SEQ ID NO:11);
Leu Met Met Tyr Ile Ser Lys Met Val (SEQ ID NO:12);
Lys Leu Pro Arg Thr Phe Cys Gln Leu (SEQ ID NO:13);
Leu Ile Leu Asp Pro Ile Phe Lys Val (SEQ ID NO:14); y

una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, deleción o adición de varios aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 9, preferentemente de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, más preferentemente de 1 a 2 aminoácidos y, aún más preferentemente, de un aminoácido, en una de las secuencias de aminoácidos anteriores. Además, el péptido puede estar contenido, en donde la secuencia de aminoácidos anterior se selecciona de secuencias de aminoácidos que tienen una sustitución, deleción, adición y/o inserción de varios aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 9, preferentemente de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, más preferentemente de 1 a 2 aminoácidos y, aún más preferentemente, de un aminoácido, en una de las secuencias de aminoácidos anteriores. A este respecto, sin embargo, es esencial que todos los péptidos anteriores conserven la capacidad de unión a la molécula de HLA-A*0206. En la presente memoria descriptiva, un péptido que conserva la capacidad de unión a HLA-A*0206 se denomina péptido eEF2 restringido para HLA-A*0206. Además, el péptido eEF2 restringido para HLA-A*0206 puede tener una acción que aumenta la actividad del interferón-γ. Además, los péptidos anteriores pueden usarse para un sujeto distinto del sujeto positivo para HLA-A*0206. Por consiguiente, el péptido que contiene una cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores y una composición farmacéutica que contiene el péptido se contempla en el presente documento.

Tabla 1

Número de péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	Número de resto de iniciación (número de resto de aminoácido en la SEQ ID NO:1)
1	LILDPIFKV (SEQ ID NO:14)	292
2	RLMEPIYLV (SEQ ID NO:8)	739
3	KLVEGLKRL (SEQ ID NO:9)	519
4	YLNEIKDSV (SEQ ID NO:10)	671
5	ILTDITKGV (SEQ ID NO:11)	661
6	LMMYISKMV (SEQ ID NO:12)	394

(continuación)

Número de péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	Número de resto de iniciación (número de resto de aminoácido en la SEQ ID NO:1)
7	KLPRTFCQL (SEQ ID NO:13)	284
8	GLHGWAFTL (SEQ ID NO:50)	217
9	GLVGVDQFL (SEQ ID NO:51)	471
10	WLPAGDALL (SEQ ID NO:52)	343
11	VVVDCVSGV (SEQ ID NO:53)	127
12	AIAERIKPV (SEQ ID NO:54)	146
13	IMIDPVLGT (SEQ ID NO:55)	203
14	RLAKSDPMV (SEQ ID NO:56)	526
15	GLVSTGLKV (SEQ ID NO:57)	419

Tabla 2

Número de péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	Número de resto de iniciación (número de resto de aminoácido en la SEQ ID NO:1)
16	LVGVDQFLA (SEQ ID NO: 58)	472
17	KMDRALLEL (SEQ ID NO: 59)	159
18	FVVKAYLPV (SEQ ID NO: 60)	782
19	TILMMGRYV (SEQ ID NO: 61)	450
20	NLIDSPGHV (SEQ ID NO: 62)	101
21	ALDNFLDKL (SEQ ID NO: 63)	850
22	CLYASVLTA (SEQ ID NO: 64)	728
23	LLQMITIHL (SEQ ID NO: 65)	350
24	QVAGTPMFV (SEQ ID NO: 66)	775
25	VVAGFQWAT (SEQ ID NO: 67)	679
26	LMMNKMDRA (SEQ ID NO: 68)	155
27	NMRVMKFSV (SEQ ID NO: 69)	696
28	NMRVMKFSV (SEQ ID NO: 70)	493
29	AIMDKKANI (SEQ ID NO: 71)	11
30	CVFDWQIL (SEQ ID NO: 72)	812

Tabla 3

Número de péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	Número de resto de iniciación (número de resto de aminoácido en la SEQ ID NO:1)
31	GIPALDNFL (SEQ ID NO: 73)	847
32	VLNRKRGHV (SEQ ID NO: 74)	762
33	MMGRYVEPI (SEQ ID NO: 75)	453
34	FLVKTGTIT (SEQ ID NO: 76)	478
35	QVVGGIYGV (SEQ ID NO: 77)	754
36	RVTDGALVV (SEQ ID NO: 78)	120
37	FQWATKEGA (SEQ ID NO: 79)	683
38	VAGTPMFVV (SEQ ID NO: 80)	776
39	GLKEGIPAL (SEQ ID NO: 81)	843
40	SVLTAQPRL (SEQ ID NO: 82)	732
41	PMFVVKAYL (SEQ ID NO: 83)	780
42	VMKFSVSPV (SEQ ID NO: 84)	496
43	WAFTLKQFA (SEQ ID NO: 85)	221

(continuación)

Número de péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	Número de resto de iniciación (número de resto de aminoácido en la SEQ ID NO:1)
44	FEHAHNMRV (SEQ ID NO: 86)	488
45	KQFAEMYVA (SEQ ID NO: 87)	226

Tabla 4

Número de péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	Número de resto de iniciación (número de resto de aminoácido en la SEQ ID NO:1)
46	RVFSGLVST (SEQ ID NO: 88)	415
47	RIVENVNVI (SEQ ID NO: 89)	180
48	MMNKMDRAL (SEQ ID NO: 90)	156
49	EMYVAKFAA (SEQ ID NO: 91)	230
50	FSVSPVVRV (SEQ ID NO: 92)	499
51	ELYQTFQRI (SEQ ID NO: 93)	173
52	SVVAGFQWA (SEQ ID NO: 94)	678
53	IMNFKKEET (SEQ ID NO: 95)	304
54	GALVVVDCV (SEQ ID NO: 96)	124
55	KVEDMMKKL (SEQ ID NO: 97)	252
56	RNMSVIAHV (SEQ ID NO: 98)	20
57	KANIRNMSV (SEQ ID NO: 99)	16
58	TVSEESNVL (SEQ ID NO: 100)	582
59	GVCVQTETV (SEQ ID NO: 101)	134
60	DITKGVQYL (SEQ ID NO: 102)	664

Tabla 5

Número de péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	Número de resto de iniciación (número de resto de aminoácido en la SEQ ID NO:1)
61	AVMRRWLPA (SEQ ID NO: 103)	338
62	FSSEVTAAL (SEQ ID NO: 104)	111
63	KLWGDRYFD (SEQ ID NO: 105)	259
64	LEPEELYQT (SEQ ID NO: 106)	169
65	GVDQFLVKT (SEQ ID NO: 107)	474
66	FTLKQFAEM (SEQ ID NO: 108)	223
67	AEMYVAKFA (SEQ ID NO: 109)	229
68	FTADLRSNT (SEQ ID NO: 110)	796
69	MIDPVLGTV (SEQ ID NO: 111)	204
70	YLPVNESFG (SEQ ID NO: 112)	787
71	NPADLPKLV (SEQ ID NO: 113)	513
72	GPAERAKKV (SEQ ID NO: 114)	245
73	DLPKLVEGL (SEQ ID NO: 115)	516
74	MVNFTVDQI (SEQ ID NO: 116)	1
75	GGQAFPQCV (SEQ ID NO: 117)	805

Tabla 6

Número de péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	Número de resto de iniciación (número de resto de aminoácido en la SEQ ID NO:1)
76	VLTAQPRLM (SEQ ID NO: 118)	733
77	SGLHGWAFT (SEQ ID NO: 119)	216
78	ITIHLPSPV (SEQ ID NO: 120)	354

(continuación)

Número de péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	Número de resto de iniciación (número de resto de aminoácido en la SEQ ID NO:1)
79	KSTLTDSLV (SEQ ID NO: 121)	32
80	GELHLEICL (SEQ ID NO: 122)	550
81	CITIKSTAI (SEQ ID NO: 123)	67
82	SEVTAALRV(SEQ ID NO: 124)	113
83	FTVDQIRAI (SEQ ID NO: 125)	4
84	AQPRLMEPI (SEQ ID NO: 126)	736
85	YLAEKYEWD (SEQ ID NO: 127)	634
86	KIWCFGPDG (SEQ ID NO: 128)	648
87	GTVGFGSGL (SEQ ID NO: 129)	210
88	VEIQCPEQV (SEQ ID NO: 130)	747
89	KNPADLPKL (SEQ ID NO: 131)	512
90	GVRFDVHDV (SEQ ID NO: 132)	699

Tabla 7

Número de péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	Número de resto de iniciación (número de resto de aminoácido en la SEQ ID NO:1)
91	TTFEHAHNM (SEQ ID NO: 133)	486
92	GNIVGLVGV (SEQ ID NO: 134)	467
93	IIPTARRCL (SEQ ID NO: 135)	721
94	PLMMYISKM (SEQ ID NO: 136)	393
95	GQLGPAERA (SEQ ID NO: 137)	242
96	LKQFAEMYV (SEQ ID NO: 138)	225
97	MGNIMIDPV (SEQ ID NO: 139)	200
98	KVFDAIMNF (SEQ ID NO: 140)	299
99	MEPIYLVEI (SEQ ID NO: 141)	741

Los péptidos de interés derivan de una proteína eEF2 y puede consistir en la secuencia de aminoácidos contiguos anterior o en una secuencia modificada de la misma, o contener dicha secuencia. Son ejemplos preferidos del péptido que contiene la secuencia de aminoácidos contiguos anterior, péptidos que tienen de 9 a 30 aminoácidos, preferentemente, péptidos que tienen de 9 a 15 aminoácidos y, más preferentemente, péptidos que tienen de 9 a 12 aminoácidos. Por tanto, el péptido puede ser, por ejemplo, el propio péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos anterior o una proteína eEF2 que contiene la secuencia de aminoácidos anterior o una parte de la misma. En un péptido también pueden estar unidas una diversidad de sustancias a un extremo N y/o un extremo C del péptido que contiene la secuencia de aminoácidos anterior. Por ejemplo, pueden estar unidos al péptido aminoácidos, péptidos y análogos de los mismos. En caso de que estas sustancias estén unidas al péptido, se tratan, por ejemplo, por una enzima presente en el cuerpo o mediante un proceso tal como un procesamiento intracelular, y finalmente se produce un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos anterior. El péptido se presenta en la superficie celular como un complejo con una molécula HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201, siendo capaz de producir, de esta manera, un efecto de inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL). Estas sustancias pueden ser sustancias que regulan la solubilidad del péptido, o que mejoran la estabilidad del péptido (por ejemplo, efecto de resistencia a proteasas) o, por ejemplo, que liberan específicamente un péptido en un tejido u órgano determinado, o que tienen una acción potenciadora de la eficacia de captación de células presentadoras de antígeno. Además, estas sustancias pueden ser una sustancia que aumenta la capacidad de inducir los CTL, por ejemplo, un péptido auxiliar.

El péptido puede sintetizarse usando un método usado habitualmente en esta técnica o un método modificado del mismo. Dicho método sintético se describe, por ejemplo, en Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., Nueva York, 1976; Peptide Synthesis, Maruzen Company Ltd., 1975; Basis and Experiment of Peptide Synthesis, Maruzen Company Ltd., 1985; Development of Medicine, Sequel, Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten Co., 1991 y otros.

Además, el péptido puede prepararse usando una técnica de ingeniería genética basándose en la información sobre una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido. Dicha técnica de ingeniería genética es bien conocida por los expertos en la materia.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende el péptido eEF2 que consiste en una secuencia de aminoácidos compuesta de aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2, en la que la secuencia de aminoácidos se selecciona de la SEQ ID NO:7 o sus variantes descritas anteriormente. Como el gen de eEF2 tiene una alta expresión, por ejemplo, en adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer ductal pancreático, glioblastoma maligno, linfoma maligno y cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para el tratamiento o prevención de cánceres que expresan el gen de eEF2. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra a un sujeto positivo para HLA-A*2402, se inducen CTL específicos para eEF2 por un péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 contenido en la composición farmacéutica, y dichos CTL reducen las células cancerosas en el sujeto.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener, por ejemplo, vehículos y excipientes, además del péptido eEF2 anterior como principio activo. Como el péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 contenido en la composición farmacéutica de la presente invención induce CTL específicos para eEF2, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener un coadyuvante adecuado o puede administrarse junto con un coadyuvante adecuado para mejorar su eficacia de inducción. Son coadyuvantes preferidos, por ejemplo, un coadyuvante completo o incompleto de Freund e hidróxido de aluminio. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener un péptido conocido, por ejemplo, péptido WT1, como principio activo, además del péptido eEF2 anterior.

El método de administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede seleccionarse convenientemente dependiendo de condiciones tales como los tipos de enfermedades, el estado de los sujetos y los sitios diana. El método puede ser, por ejemplo, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración intranasal o administración oral. Además, el método puede ser una terapia de linfocitos o una terapia de DC (células dendríticas). La cantidad de péptido contenido en la composición farmacéutica de la presente invención, la forma de dosificación de la composición farmacéutica y el número de dosis pueden seleccionarse convenientemente dependiendo de condiciones tales como los tipos de enfermedades, el estado de los sujetos y los sitios diana. La cantidad de péptido administrado por dosis habitualmente es de 0,0001 mg a 1000 mg y, preferentemente, de 0,001 mg a 10.000 mg.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un método para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anterior a un sujeto positivo para HLA-A*2402 o un sujeto positivo para HLA-A*0201. Los cánceres a tratar o prevenir pueden ser cualquier cáncer e incluyen, por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer ductal pancreático, glioblastoma y linfoma maligno.

En otro aspecto adicional, la presente invention se refiere al uso de un péptido eEF2 para la producción de la composición farmacéutica anterior para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*2402.

En otro aspecto adicional, se describe un polinucleótido que codifica el péptido eEF2 anterior (denominado también en lo sucesivo polinucleótido de eEF2). El polinucleótido puede ser un ADN o un ARN. La secuencia de bases del polinucleótido puede determinarse basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido eEF2 anterior. El polinucleótido anterior puede prepararse, por ejemplo, por un método de síntesis de ADN o ARN o un método de PCR.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un vector de expresión que contiene el polinucleótido anterior (también denominado en lo sucesivo vector de expresión de eEF2). Los tipos de vectores de expresión y secuencias contenidas además de la secuencia de polinucleótido anterior, pueden seleccionarse convenientemente dependiendo de los tipos de hospedadores en los que se introduce el vector de expresión y el objetivo de la introducción del vector de expresión. El vector de expresión se administra a un sujeto para producir un péptido eEF2 en un cuerpo vivo y para inducir CTL específicos para eEF2. Los CTL afectan a células tumorales de órganos hematopoyéticos y a células de tumores sólidos en un sujeto, permitiendo de esta manera el tratamiento o prevención de tumores de órganos hematopoyéticos y de cánceres sólidos.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de cánceres, en donde dicha composición farmacéutica comprende el polinucleótido de eEF2 anterior que codifica un péptido eEF2 que consiste en una secuencia de aminoácidos compuesta de aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2, en la que la secuencia de aminoácidos se selecciona de la SEQ ID NO:7 o sus variantes descritas anteriormente. La composición y el método de administración de la composición farmacéutica de la presente invención en este aspecto son como se han descrito anteriormente.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un método para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende administrar una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz del polinucleótido de eEF2 anterior o vector de expresión de eEF2 a un sujeto. Los cánceres a tratar o prevenir incluyen, por ejemplo,

adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer ductal pancreático, glioblastoma y linfoma maligno.

En otro aspecto adicional, en el presente documento se desvela el uso de un polinucleótido de eEF2 o un vector de expresión de eEF2 para la producción de una composición farmacéutica que contiene el polinucleótido de eEF2 anterior o el vector de expresión de eEF2.

En otro aspecto, en el presente documento se desvelan células que contienen el vector de expresión de eEF2 anterior. Las células pueden prepararse, por ejemplo, transformando células hospedadoras tales como E. coli, levadura, células de insecto y células animales, usando el vector de expresión anterior. El método para introducir el vector de expresión en las células hospedadoras puede seleccionarse convenientemente entre diversos métodos. También es posible preparar el péptido cultivando células transformadas y recuperando y purificando el péptido eEF2 producido.

En un aspecto adicional, en el presente documento se desvela un CTL específico para eEF2 que se induce por el péptido eEF2 anterior. El CTL reconoce un complejo de un péptido eEF2 con una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201. Por consiguiente, se pueden reducir específicamente células tumorales con alta expresión de eEF2 positivas para HLA-A*2402 o positivas para HLA-A*0201 usando el CTL.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un método para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende administrar un CTL específico para eEF2 a un sujeto positivo para HLA-A*2402 o positivo para HLA-A*0201. El método de administración del CTL específico para eEF2 puede seleccionarse convenientemente dependiendo de condiciones tales como los tipos de enfermedades, el estado de los sujetos y los sitios diana. El método puede ser, por ejemplo, administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intranasal o administración oral.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un método para inducir un CTL específico para eEF2, que comprende cultivar células mononucleares de sangre periférica en presencia del péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 o el péptido eEF2 restringido para HLA-A*0201 anterior, y se induce el CTL específico para eEF2 a partir de las células mononucleares de sangre periférica. Los sujetos de los que proceden las células mononucleares de sangre periférica pueden ser cualquier sujeto siempre que tenga una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201. Mediante el cultivo de las células mononucleares de sangre periférica en presencia del péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 o el péptido eEF2 restringido para HLA-A*0201, se induce el CTL específico para eEF2 a partir de células precursoras de CTL en las células mononucleares de sangre periférica. Mediante la administración del CTL específico para eEF2 obtenido para un sujeto positivo para HLA-A*2402 o un sujeto positivo para HLA-A*0201, es posible tratar o prevenir un tumor de órgano hematopoyético y un cáncer sólido en el sujeto. A este respecto, las células mononucleares de sangre periférica en la presente memoria descriptiva incluyen células presentadoras de antígeno inmaduras (por ejemplo, precursores de células dendríticas, linfocitos B y macrófagos) que son precursoras de células presentadoras de antígenos. Como las células presentadoras de antígenos inmaduras están contenidas, por ejemplo, en células mononucleares de sangre periférica, estas células pueden cultivarse en presencia del péptido eEF2 anterior.

En otro aspecto adicional, en el presente documento se desvela un kit para inducir un CTL específico para eEF2, que comprende un péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 o un péptido eEF2 restringido para HLA-A*0201 como constituyente esencial. Preferentemente, el kit se usa en un método para inducir el CTL específico para eEF2 anterior. El kit puede contener, por ejemplo, un medio de muestreo de células mononucleares de sangre periférica, un coadyuvante y un recipiente de reacción, además del péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 o el péptido eEF2 restringido para HLA-A*0201 anterior. En general, el kit va acompañado de un manual de instrucciones. El kit puede usarse para inducir eficazmente el CTL específico para eEF2.

En un aspecto adicional, en el presente documento se desvelan células presentadoras de antígenos (por ejemplo, células dendríticas, linfocitos B y macrófagos) que presentan el péptido eEF2 anterior a través de una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201. Las células presentadoras de antígenos se inducen por el péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 o el péptido eEF2 restringido para HLA-A*0201 anterior. El CTL específico para eEF2 anterior se induce eficazmente usando las células presentadoras de antígeno.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un método para el tratamiento o prevención de cánceres, que comprende administrar células presentadoras de antígenos, que presentan el péptido eEF2 anterior a través de una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201, a un sujeto positivo para HLA-A*2402 o un sujeto positivo para HLA-A*0201. El método de administración de las células presentadoras de antígenos puede seleccionarse convenientemente dependiendo de condiciones tales como los tipos de enfermedades, el estado de los sujetos y los sitios diana. El método puede ser, por ejemplo, administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intranasal o administración oral.

En un aspecto adicional, en el presente documento se desvela un método para prevenir o tratar cánceres, que

comprende inducir células presentadoras de antígenos que presentan el péptido eEF2 anterior a través de una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201, comprendiendo el método las etapas de:

(a) hacer reaccionar una muestra con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:1) de una proteína eEF2 o una secuencia parcial de la misma, o el péptido eEF2 anterior,
(b) obtener células presentadoras de antígenos que presentan el péptido eEF2 contenido en la muestra a través de la molécula HLA-A*2402 o la molécula HLA-A*0201 y
(c) administrar las células presentadoras de antígenos a un sujeto positivo para HLA-A*2402 o un sujeto positivo para HLA-A*0201. La muestra en el método anterior puede ser cualquier muestra siempre que tenga la posibilidad de inclusión de linfocitos o células dendríticas, e incluye, por ejemplo, muestras de un sujeto, tales como sangre y medio de cultivo celular. La reacción en el método anterior puede realizarse usando una técnica convencional, preferentemente usando una técnica de electroporación. La obtención de las células presentadoras de antígenos puede realizarse usando un método conocido por los expertos en la materia. Los expertos en la materia pueden determinar convenientemente las condiciones de cultivo de las células en una muestra en cada etapa. El método de administración de las células presentadoras de antígenos puede ser como se ha descrito anteriormente.

Además, En el presente documento se desvela un kit para prevenir o tratar cánceres, que comprende, como constituyente esencial, un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:1) de una proteína eEF2 o una secuencia parcial de la misma, o un péptido eEF2. El kit comprende células presentadoras de antígenos que presentan el péptido eEF2 anterior a través de una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201. Además, el kit puede contener, por ejemplo, un medio de extracción de muestras y un recipiente de reacción, además del constituyente esencial anterior. En general, el kit va acompañado de un manual de instrucciones. Las células presentadoras de antígenos que presentan un péptido eEF2 a través de una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201 pueden obtenerse eficazmente usando el kit, y el cáncer puede tratarse o prevenirse mediante la administración de las células presentadoras de antígenos.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un anticuerpo contra un péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 o un péptido eEF2 restringido para HLA-A*0201, o un anticuerpo contra un polinucleótido que codifica el péptido. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

En un aspecto adicional, en el presente documento se desvela un método para diagnosticar cáncer, caracterizado por el uso del CTL específico de eEF2 anterior, células presentadoras de antígeno que presentan el péptido eEF2 anterior a través de una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201, o un anticuerpo contra un péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 o un péptido eEF2 restringido para HLA-A*0201 o un anticuerpo contra un polinucleótido que codifica el péptido. El CTL específico para eEF2 preferentemente se usa en el método de diagnóstico. Por ejemplo, puede diagnosticarse un cáncer incubando el CTL anterior, células presentadoras de antígenos o anticuerpo con una muestra de un sujeto positivo para HLA-A*2402 o un sujeto positivo para HLA-A*0201, o administrando el CTL anterior, células presentadoras de antígenos o anticuerpo a un sujeto positivo para HLA-A*2402 o un sujeto positivo para HLA-A*0201 y después determinando, por ejemplo, la posición, el sitio o la cantidad del CTL, células presentadoras de antígenos o anticuerpo. El CTL, las células presentadoras de antígenos o el anticuerpo, mencionados anteriormente, pueden marcarse. Mediante dicho marcaje, puede realizarse eficazmente el método de diagnóstico.

En otro aspecto, en el presente documento se desvela un kit para diagnosticar cánceres, que comprende, como constituyente esencial, el CTL específico de eEF2 anterior, células presentadoras de antígeno que presentan un péptido eEF2 a través de una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201, o un anticuerpo contra un péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 o un péptido eEF2 restringido para HLA-A*0201 o un anticuerpo contra un polinucleótido que codifica el péptido.

En un aspecto adicional, en el presente documento se desvela un método para determinar la presencia o cantidad de un CTL específico para eEF2 en un sujeto positivo para HLA-A*2402 o un sujeto positivo para HLA-A*0201, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar un complejo de un péptido eEF2 y una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201 con una muestra del sujeto, y después
(b) determinar la presencia o cantidad del CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra.

La muestra del sujeto puede ser cualquier muestra siempre que tenga la posibilidad de inclusión de linfocitos, e incluye, por ejemplo, fluidos corporales tales como sangre y linfa y tejidos.

El complejo de un péptido eEF2 y una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201 puede estar, por ejemplo, en forma de un tetrámero o pentámero, por ejemplo, usando un método conocido por los expertos en la materia tal como un método de biotina-estreptavidina. La presencia o cantidad del CTL que reconoce dicho complejo puede determinarse por un método conocido por los expertos en la materia. En este aspecto, el complejo anterior

puede marcarse. Puede usarse un marcador conocido tal como un marcador de fluorescencia y un marcador radiactivo. Mediante dicho marcaje, puede determinarse la presencia o cantidad del CTL fácilmente y con rapidez. Este aspecto del método permite el diagnóstico de cánceres y el diagnóstico del pronóstico.

Por tanto, en el presente documento también se desvela una composición que comprende un complejo de un péptido eEF2 y una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201 para determinar la presencia o cantidad de un CTL específico para eEF2 en un sujeto positivo para HLA-A*2402 o un sujeto positivo para HLA-A*0201.

Además, en el presente documento se desvela un kit para determinar la presencia o cantidad de un CTL específico para eEF2 en un sujeto positivo para HLA-A*2402 o un sujeto positivo para HLA-A*0201, que comprende un complejo de un péptido eEF2 y una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201.

En un aspecto adicional, en el presente documento también se desvela un método para obtener un CTL específico para eEF2 usando un complejo de un péptido eEF2 y una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar una muestra con el complejo, y
(b) obtener el CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra.

El complejo de un péptido eEF2 y una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201 es como se ha descrito anteriormente. La muestra puede ser cualquier muestra siempre que tenga la posibilidad de inclusión de linfocitos, e incluye, por ejemplo, muestras de un sujeto, tales como sangre y medio de cultivo celular. La obtención del CTL que reconoce el complejo puede realizarse usando un método conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, usando FACS y MACS. El CTL específico para eEF2 obtenido puede cultivarse para uso en el tratamiento o prevención de una diversidad de cánceres.

Por tanto, en el presente documento también se desvela un CTL específico para eEF2, que puede obtenerse por un método para obtener el CTL específico para eEF2 usando un complejo de un péptido eEF2 y una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201.

Además, en el presente documento se desvela un kit para obtener un CTL específico para eEF2, que comprende un complejo de un péptido eEF2 y una molécula de HLA-A*2402 o una molécula de HLA-A*0201.

En un aspecto, un kit para tumorigénesis se caracteriza por que se expresa un polipéptido eEF2. Por tanto, el kit comprende, como constituyente esencial, la etapa de expresar el polipéptido eEF2 en células o animales no humanos. Por consiguiente, es un constituyente esencial un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos del polipéptido o un vector en el que se integra el polinucleótido. En la presente memoria descriptiva, los animales no humanos se refieren a animales distintos de los seres humanos. El kit se basa en el descubrimiento de que la expresión forzada de una proteína eEF2 acelera la fase G2/M en el ciclo celular. El kit también puede contener, por ejemplo, un medio para introducir el polinucleótido o vector anterior en células o tejidos de animales no humanos, un reactivo para la introducción y un recipiente de reacción, además del polinucleótido o vector anterior. En general, el kit va acompañado de un manual de instrucciones. El kit puede usarse para formar un tumor in vivo o in vitro y, después, para ensayar efectos de moléculas candidatas contra la tumorigénesis o la proliferación celular, por ejemplo.

A este respecto, el método puede realizarse in vivo o in vitro.

Ejemplos

La presente invención se ilustra de forma particular y específica haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Los ejemplos no abarcados por el alcance de las reivindicaciones solo se proporcionan con fines ilustrativos.

Ejemplo 1

Detección de anticuerpo IgG de EEF2 en sueros de pacientes con cáncer

Se lisaron células de las líneas celulares de cáncer de pulmón PC14 y LU-99B, y de la línea celular de leucemia K562, en un tampón de muestra-SDS. Las proteínas contenidas en el tampón se separaron por SDS-PAGE y después se transfirieron a una membrana de PVDF. Como anticuerpo primario se usaron soluciones preparadas diluyendo sueros obtenidos de 10 pacientes que tenían cáncer de pulmón y 10 sujetos sanos a 1500:1, y se visualizaron los anticuerpos IgG unidos a la membrana usando un anticuerpo anti-IgG humana. Como resultado, se descubrió una proteína de aproximadamente 100 kDa que se reconocía específicamente por los sueros de los pacientes que tenían cáncer de pulmón (Fig. 1). La Fig. 1 es un ejemplo típico de una transferencia western. Posteriormente, la proteína se separó y se identificó como eEF2 por una técnica de espectrometría de masas.

Expresión excesiva de EEF2 en diversos cánceres

Se prepararon secciones delgadas a partir de bloques de parafina. Después del tratamiento para retirar la parafina, las secciones se sometieron a un tratamiento de activación de antígenos en tampón citrato (pH 6,0), se hicieron reaccionar con un anticuerpo anti-eEF2 (H-118, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, dilución 1:100) a 4°C durante una noche, y después se dejaron reaccionar con el kit Envision/HRP (Dako Cytomation) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de reaccionar con un 0,7% de una solución de H_2O_2, se reveló el color de las secciones usando DAB como sustrato y después se realizó tinción nuclear usando hematoxilina. Como resultado, se observaron células positivas para el anticuerpo en todos los tejidos afectados de los pacientes que tenían adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de estómago y cáncer de colon (Figs. 2 a 4).

Detección de anticuerpo de EEF2 en diversos tipos de cánceres

Se obtuvo sangre periférica de 72 pacientes que tenían cáncer de pulmón no microcítico, 42 pacientes que tenían cáncer de colon, 20 pacientes que tenían cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, 18 pacientes que tenían glioblastoma y 17 sujetos sanos en conformidad. Se coaguló la sangre y después se obtuvieron sueros por centrifugación. Se preparó un vector pGEX-5X-3 (GE) para la expresión de una proteína recombinante insertando una secuencia génica que codificaba una secuencia de aminoácidos en las posiciones 411-858 de eEF2. La proteína GST-eEF2$_{411-858}$ recombinante purificada se ajustó a 150 ng/calle y se realizó una SDS-PAGE. La proteína en la SDS-PAGE se transfirió eléctricamente a una membrana de PVDF. La proteína se hizo reaccionar con suero diluido a 1500:1 a temperatura ambiente durante una noche, y los anticuerpos IgG unidos a la membrana se visualizaron usando un anticuerpo anti-IgG humana. Se midió la densidad de las bandas y esta medida se usó como título de anticuerpo anti-eEF2. Como la mediana de los valores de título de anticuerpo en 17 sujetos sanos fue de 500 unidades densitométricas y la desviación típica fue 500, el nivel de corte se estableció a 2.000 unidades densitométricas, que era la mediana + 3 DT. Como resultado, se descubrió que, con una especificidad del 94,7%, el anticuerpo IgG de eEF2 era positivo en el 66,7% de los cánceres de pulmón no microcíticos, el 71,8% de los cánceres de colon, el 60,0% de los cánceres de células escamosas de cabeza y cuello y el 88,9% de los glioblastomas (Fig. 5). La expresión de la proteína eEF2 en diversos cánceres se analizó por inmunotinción. Cuando el porcentaje de células cancerosas que muestran tinción intensa en comparación con las células normales correspondientes era un 25% o más de las células cancerosas totales, la expresión se consideró positiva (Tabla 8).

Tabla 8

Expresión excesiva de EEF2 en diversos cánceres	
Cáncer	Tasa positiva de expresión excesiva de eEF2
Adenocarcinoma de pulmón	100% (15/15)
Cáncer microcítico de pulmón	95,0% (19/20)
Cáncer de esófago	58,3% (7/12)
Cáncer de estómago	92,9% (13/14)
Cáncer de colon	91,7% (22/24)
Cáncer ductal pancreático	55,6% (5/9)
Glioblastoma maligno	50,6% (6/12)
Linfoma maligno	94,0% (47/50)
Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello	45,5% (5/11)

Detección de primeros estadios de cáncer por el anticuerpo de EEF2

Se comparó la tasa positiva de título de anticuerpo de eEF2 con la tasa positiva de CEA en 70 pacientes (44 en estadio I, 13 en estadio II y 13 en estadio III) que tenían cáncer de pulmón no microcítico y que tenían un claro valor de CEA en suero. A este respecto, la clasificación del estadio I, estadio II y estadio III se realizó de acuerdo con la clasificación TNM definida por la Unión Internacional Contra el Cáncer. El título de anticuerpo de eEF2 se determinó por transferencia puntual. Como resultado, se descubrió que la tasa positiva del anticuerpo IgG de eEF2 en todos los estadios de enfermedad del cáncer de pulmón no microcítico era elevada incluso en el estadio I (Tabla 9).

Tabla 9

		Estadio		
		I	II	III
Anticuerpo IgG anti-eEF2	Tasa positiva	81,8%	61,5%	61,5%
CEA	Tasa positiva	13,6%	23,1%	46,2%

Relación entre título de anticuerpo de EEF2 y tasa de supervivencia sin la enfermedad

Se analizó la relación entre el título de anticuerpo de eEF2 en el cáncer de pulmón no microcítico y la tasa de supervivencia sin la enfermedad. Entre 44 pacientes, el grupo (11 pacientes) que tenía un título de anticuerpo de eEF2 de 4.000 o más unidades densitométricas tiene una tasa de supervivencia sin la enfermedad significativamente elevada en comparación con el grupo (26 pacientes) que tenía un título de anticuerpo de eEF2 de 2.000 a 4.000 unidades densitométricas y el grupo (7 pacientes) que tenía un título de anticuerpo de eEF2 de menos de 2.000 unidades densitométricas (prueba log rank, Fig. 6).

Ejemplo 2

Inhibición de la proliferación celular en diversas líneas celulares

Se preparó un vector que expresaba un ARNip que se dirige a la secuencia: 5'-caugggcaacaucaugaucgauccuguccu-3' de un ARNm de eEF2 (denominado en lo sucesivo shEF2) usando un vector de expresión de ARNt-ARNhc, piGENE tRNA Pur (Clontech, Palo Alto, CA). Posteriormente, se introdujeron 10 µg de shEF2 o un vector de ARNhc vacío (shMock) por electroporación en las líneas celulares de cáncer de estómago AZ-521 y MKN28, en la línea celular de cáncer de colon SW620, en las líneas celulares de cáncer de pulmón LU99B y PC-14, en las líneas celulares de cáncer pancreático MiaPaCa2 y PCI6, en las líneas celulares de glioblastoma A172 y U87MG, así como en las líneas celulares de linfoma maligno IB4 e YT (en cada caso 5 x 10^5 células) que expresaban eEF2 usando el sistema Gene Pulser Xcell (marca comercial) (Bio Rad, Hercules, CA) en condiciones de 165 V y 1000 µF. Una vez transcurridas 24, 48, 72 y 96 horas desde la introducción, las células se trataron con tripsina y se contó el número de células supervivientes. Los experimentos se realizaron por separado 3 veces por duplicado. En todos los casos, el shEF2 inhibía significativamente la proliferación celular (Figs. 7 y 8).

Ejemplo 3

Selección de péptido EEF2

Primeramente, se seleccionaron 4 péptidos mediante la predicción de las secuencias que podían unirse a una molécula de HLA-A*2402 en una secuencia de aminoácidos de una proteína eEF2 usando la página web de ProPred-I (http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/). Los resultados se muestran en la Tabla 10 presentada a continuación.

(Tabla 10: Péptidos eEF2 candidatos que tienen una alta afinidad de unión a la molécula de HLA-A*2402, seleccionados usando diversos programas (NetMHC3.0, Rankpep y SYFPEITHI))

Tabla 10

NetMHC3.0				Rankpep		SYFPEITHI	
Número de resto de iniciación	Afinidad (nM)	Nivel de unión	Puntuación logarítmica	Número de resto de iniciación	Puntuación	Número de resto de iniciación	Puntuación
786	20	SB	0,721	633	18,484	786	25
633	188	WB	0,516	342	17,792	78	20
220	380	WB	0,451	477	15,220	265	19
342	416	WB	0,442	786	14,930	477	19
477	671		0,398	174	13,101	412	18
409	964		0,365	817	11,358	701	17
174	1130		0,350	684	11,215	409	16
684	1250		0,341	220	10,709	308	15
177	1611		0,317	409	10,641	311	15
265	1930		0,301	701	9,634	470	15
78	1958		0,299	714	9,556	512	15
412	2551		0,275	78	9,315	516	15
231	2665		0,271	412	8,827	594	15
729	2691		0,270	443	8,652	73	14
744	2829		0,265	364	8,246	252	14
73	3045		0,259	456	8,229	284	14

(continuación)

NetMHC3.0				Rankpep		SYFPEITHI	
Número de resto de iniciación	Afinidad (nM)	Nivel de unión	Puntuación logarítmica	Número de resto de iniciación	Puntuación	Número de resto de iniciación	Puntuación
70	4080		0,232	213	8,072	328	14
644	4396		0,225	605	7,603	343	14
701	5322		0,207	265	7,401	434	14
759	6139		0,194	363	7,190	442	14
638	6593			491	7,188	456	14
602	6673			177	6,847	491	14
396	7134			442	6,419	509	14
284	7142			73	6,112	537	14
774	7954			850	6,015	657	14
736	8076			293	5,071	62	13
442	8141			166	4,961	70	13
290	8704			763	4,815	92	13
394	8917			670	4,451	95	13
300	8973			290	4,265	111	13
456	9299			285	4,229	180	13
227	9749			90	4,062	191	13
180	9862			335	4,016	201	13
578	9900			396	3,935	228	13
264	10704			453	3,878	258	13
491	11038			289	3,877	277	13
529	11225			1	3,85	293	13
293	12329			744	3,694	296	13
811	12728			649	3,487	299	13
299	12938			38	3,281	307	13

El número de resto de iniciación es el número mostrado en la SEQ ID NO:1. Todos los péptidos eEF2 candidatos están compuestos por 9 restos de aminoácidos. Por ejemplo, un péptido que tiene el número de resto de iniciación de 786 es un péptido compuesto por 9 restos de aminoácido desde el resto A de la posición 786ª hasta el resto F de la posición 794ª en la SEQ ID NO:1.

A continuación, se analizó exactamente la capacidad de unión a una molécula de HLA-A2402 por un ensayo de estabilización de MHC. En resumen, Se incubaron células T2-2402 (1 x 10^6 células), que recibieron la expresión forzada de una molécula de HLA-A*2402 humana, que no tenían capacidad de presentación de antígenos a una molécula de HLA, en un medio RPMI1640 que contenía una concentración 10 μM de un péptido sintetizado y que no contenía suero a 27°C durante 16 horas y después se dejaron en reposo a 37°C durante 3 horas. Como la expresión de una molécula de HLA-A24 en la superficie celular se estabiliza por la unión de un péptido, se analizó la expresión de la molécula de HLA-A24 en una superficie celular después del tratamiento con cada péptido por citometría de flujo y se evaluó la capacidad de unión de cada péptido a la molécula de HLA-A2402. Como resultado, se descubrió que los péptidos $eEF2_{409-417}$ (SEQ ID NO:4), $eEF2_{412-420}$ (SEQ ID NO:5), $eEF2_{701-709}$ (SEQ ID NO:6) y $eEF2_{786-794}$ (SEQ ID NO:7) muestran capacidad de unión a la molécula de HLA-A2402 (Tabla 11).

Tabla 11

Identificación de péptido eEF2 restringido para HLA-A2402	
Péptido eEF2	Capacidad de unión a molécula de HLA-A2402
$eEF2_{409-417}$	+
$eEF2_{412-420}$	+
$eEF2_{701-709}$	+
$eEF2_{786-794}$	+

Determinación de Actividad de Interferón

Se incubaron células T junto con células T2 que expresaban moléculas de HLA-A*2402 sometidas a pulsos de péptidos eEF2 (péptidos $eEF2_{409-417}$, $eEF2_{412-420}$ y $eEF2_{701-709}$) en presencia de brefeldin A (Sigma) a 37°C durante 5 horas. Tras el lavado con PBS, se tiñeron las moléculas de CD3 y CD8, que son antígenos de la superficie celular, por anticuerpos anti-CD3 conjugados con PerCP (BD Biosciences) anti-CD8 conjugados con PE (Caltag, Burlingame, CA) en hielo durante 15 minutos. Posteriormente, las células se fijaron usando Cytofix (BD Biosciences) en hielo durante 20 minutos y el IFN-γ intracelular se hizo reaccionar con un anticuerpo anti-IFN-γ conjugado con FITC (BD Biosciences) en hielo durante 30 minutos. La frecuencia de células positivas para IFN-γ presentes en células T positivas para CD8 se analizó usando un citómetro de flujo. Como resultado, se descubrió que los péptidos $eEF2_{409-417}$, $eEF2_{412-420}$ y $eEF2_{701-709}$ aumentan la actividad del interferón-γ y, por lo tanto, representan un péptido restringido para HLA-A*2402 (Fig. 30).

Afinidad de unión de péptidos EEF2 de tipo modificado a la molécula de HLA-A*2402

Además, se predijo como se ha descrito anteriormente la afinidad de unión de péptidos eEF2 de tipo modificado, en los que un aminoácido en la posición 2 (denominado también en lo sucesivo P2) y/o en la posición 9 (denominado también en lo sucesivo P9) en las secuencias de aminoácidos de los péptidos $eEF2_{786-794}$ (SEQ ID NO:7) y $eEF2_{409-417}$ (SEQ ID NO:4) entre los péptidos anteriores se había cambiado por otro aminoácido.

(Tabla 12: Predicción de afinidad de unión de péptidos $eEF2_{786-794}$ de tipo modificado (SEQ ID NO:25 y 26) a la molécula de HLA-A*2402)

Tabla 12

Péptido candidato		Secuencia de aminoácidos	Unión	Nivel de unión	Puntuación logarítmica	Puntuación
786		AYLPVNESF	20	SB	0,721	14,930
786	I	AYLPVNESI (SEQ ID NO: 25)	43	SB	0,652	15,164
786	L	AYLPVNESL (SEQ ID NO: 25)	143	WB	0,541	14,547

(Tabla 13: Predicción de afinidad de unión de péptidos $eEF2_{409-417}$ de tipo modificado (SEQ ID NO:27 y 31) a la molécula de HLA-A*2402)

Tabla 13

Péptido candidato			Secuencia de aminoácidos	Unión	Nivel de unión	Puntuación logarítmica	Puntuación
	409		RFYAFGRVF			0,365	10,641
Y	409		RFYAFGRVF(SEQ ID NO: 27)	SB		0,641	15,653
	409	I	RFYAFGRVI(SEQ ID NO: 28)			0,252	10,875
Y	409	I	RFYAFGRVI(SEQ ID NO: 29)	WB		0,556	15,887
	409	L	RFYAFGRVL(SEQ ID NO: 30)			0,164	10,258
Y	409	L	RFYAFGRVL(SEQ ID NO: 31)	WB		0,434	15,270

Como el péptido $eEF2_{786-794}$ (SEQ ID NO:7) tiene Y en P2 y F en P9 e Y y F son restos de anclaje, no se reconocía mejora de la afinidad de unión aunque el resto original se cambiara por otro resto (Tabla 12). Por otra parte, se reconoció una mejora notable de la afinidad de unión en el péptido $eEF2_{409-417}$ (SEQ ID NO:4) cuando el resto en P2 se cambia por el resto de anclaje Y (Tabla 13).

Inducción de linfocitos T citolíticos específicos de EEF2

A partir de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de un donante que tenía moléculas de HLA-

A*2402, se retiraron células Treg $CD4^+$ $CD25^+$ usando MicroBeads CD25 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Posteriormente, se aislaron monocitos del donante usando el kit de aislamiento BD IMag CD14 (BD Bioscience) y se cultivaron en X-VIVO15 (Bio Whittaker, Walkersville, MD) que contenía IL-4 y GM-CSF y se complementaron con suero humano AB al 1%. Al día siguiente, se añadieron IL-1β, IL-6, TNF-α y PGE-2 para la maduración de las células dendríticas y se continuó el cultivo durante 3 días más. Las células dendríticas se irradiaron (30 g) y después se cultivaron en un medio que contenía 10 μg/ml de un péptido durante 2 horas para someter a las células dendríticas a pulsos con el péptido. Las células mononucleares (2×10^6 células) de las que se habían retirado las células Treg después se cocultivaron con las células dendríticas sometidas a pulsos de péptido en una relación de 10:1 para realizar la estimulación por el péptido, y se añadió IL-2 al medio al día siguiente. Posteriormente, se realizó una re-estimulación cada 10 días por las células mononucleares del donante irradiadas y sometidas a pulsos con un péptido. Después de realizar varias veces la estimulación, las células se cultivaron en un medio que contenía IL-7 e IL-15 y se establecieron clones de células T.

Determinación de actividad citotóxica

A partir de los clones de células T establecidos como se ha descrito anteriormente, se purificaron células T positivas para CD8 usando Microbeads CD8 para preparar células efectoras. Posteriormente, se incubaron células diana con cromato sódico marcado con ^{51}Cr (Amersham Biosciences Corp., NJ) durante 1 hora para marcar las células. Después se mezclaron con las células efectoras de forma que las relaciones de recuento celular fueron de 1:1, 3:1 y 9:1 de CTL/célula diana (E/T) y la mezcla se dejó en reposo durante 4 horas. El porcentaje de células lisadas se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

% de lisis específica = [(cpm de liberación experimental - cpm de liberación espontánea)/(cpm de liberación máxima - cpm de liberación espontánea)] x 100.

Como células diana se usaron células T2-2402 sometidas a pulsos con un péptido $eEF2_{786-794}$ y como control negativo se usaron células T2-2402 no sometidas a pulsos con el péptido $eEF2_{786-794}$ (SEQ ID NO:7). Como resultado, se demostró que el % de lisis específica de células T2-2402 sometidas a pulsos con el péptido $eEF2_{786-794}$ aumenta extraordinariamente al aumentar la relación E/T (Fig. 9). Además, como células diana se usaron células SW480 de cáncer de colon que muestran expresión endógena de eEF2 y muestran la expresión de HLA-A*2402 en la superficie celular y como control negativo se usaron células AZ-521 de cáncer de estómago y células MiaPaCa2 de cáncer pancreático que muestran la expresión endógena de eEF2 pero no muestran la expresión de HLA-A*2402 en la superficie celular. Como resultado, se demostró que las células T citotóxicas activadas por el péptido $eEF2_{786-794}$ afectan específicamente a las células que expresan el eEF2 y tienen la molécula de HLA-A*2402 (Fig. 10).

Ejemplo 4

Selección de péptido EEF2

Se seleccionaron péptidos mediante la predicción de las secuencias que podían unirse a una molécula de HLA-A*0201 en una secuencia de aminoácidos de una proteína eEF2 usando la página web de ProPred-I (http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/) (Tablas 1 a 7). A continuación, se analizó exactamente la capacidad de unión a una molécula de HLA-A0201 por un ensayo de estabilización de MHC. En resumen, se incubaron células T2-0201 (1×10^6 células), que tenían expresión forzada de una molécula de HLA-A*0201 humana, no tenían capacidad de presentación de antígenos a una molécula de HLA, en un medio RPMI1640 que contenía una concentración 10 μM de un péptido sintetizado y que no contenía suero, a 27°C durante 16 horas, y después se dejaron en reposo a 37°C durante 3 horas. Como la expresión de una molécula de HLA-A*0201 en la superficie celular se estabiliza por la unión de un péptido, se analizó la expresión de la molécula de HLA-A0201 en una superficie celular después del tratamiento con cada péptido por citometría de flujo y se evaluó la capacidad de unión de cada péptido a la molécula de HLA-A0201. Como resultado, se descubrió que los péptidos $eEF2_{284-292}$ (SEQ ID NO:13), $eEF2_{394-402}$ (SEQ ID NO:12), $eEF2_{519-527}$ (SEQ ID NO:9), $eEF2_{661-669}$ (SEQ ID NO:11), $eEF2_{671-679}$ (SEQ ID NO:10) and $eEF2_{739-747}$ (SEQ ID NO:8) muestran capacidad de unión a la molécula de HLA-A*0201 (Tabla 14).

Tabla 14

Capacidad de unión de péptido candidato a molécula de HLA-A0201 de clase I			
Péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	MFI	% de aumento de MFI
NS		5,8	
Sin péptido		275,7	
$eEF2_{292-300}$ (SEQ ID NO:14)	LILDPIFKV	781,03	183,3

(continuación)

Capacidad de unión de péptido candidato a molécula de HLA-A0201 de clase I			
Péptido candidato	Secuencia de aminoácidos	MFI	% de aumento de MFI
$eEF2_{739-747}$ (SEQ ID NO:8)	RLMEPIYLV	664,83	141,1
$eEF2_{519-527}$ (SEQ ID NO:9)	KLVEGLKRL	437,97	58,9
$eEF2_{671-679}$ (SEQ ID NO:10)	YLNEIKDSV	522,71	89,6
$eEF2_{661-669}$ (SEQ ID NO:11)	ILTDITKGV	828,16	200,4
$eEF2_{394-402}$ (SEQ ID NO:12)	LMMYISKMV	448,41	62,6
$eEF2_{284-292}$ (SEQ ID NO:13)	KLPRTFCQL	448,82	62,8

Determinación de Actividad de Interferón

Se incubaron células T junto con células T2 que expresaban moléculas de HLA-A*0201 sometidas a pulsos de péptidos eEF2 restringidos para HLA-A*0201 en presencia de brefeldin A (Sigma) a 37°C durante 5 horas. Tras el lavado con PBS, se tiñeron las moléculas de CD3 y CD8, que son antígenos de la superficie celular, por anticuerpos anti-CD3 conjugados con PerCP (BD Biosciences) anti-CD8 conjugados con PE (Caltag, Burlingame, CA) en hielo durante 15 minutos. Posteriormente, las células se fijaron usando Cytofix (BD Biosciences) en hielo durante 20 minutos y el IFN-γ intracelular se hizo reaccionar con un anticuerpo anti-IFN-γ conjugado con FITC (BD Biosciences) en hielo durante 30 minutos. La frecuencia de células positivas para IFN-γ presentes en células T positivas para CD8 se analizó usando un citómetro de flujo. Se usó un péptido $eEF2_{739-747}$ en la Fig. 11 y un péptido $eEF2_{661-669}$ en la Fig. 12. Como resultado, se descubrió que los péptidos $eEF2_{661-669}$ (SEQ ID NO:11) y $eEF2_{739-747}$ (SEQ ID NO:8) aumentan la actividad del interferón-γ (Figs. 11 y 12).

Determinación de actividad citotóxica

A continuación, se realizó la evaluación de si los seis péptidos candidatos [$eEF2_{739-747}$ (SEQ ID NO:8), $eEF2_{519-527}$ (SEQ ID NO:9), $eEF2_{671-679}$ (SEQ ID NO:10), $eEF2_{661-669}$ (SEQ ID NO:11), $eEF2_{394-402}$ (SEQ ID NO:12) y $eEF2_{284-292}$ (SEQ ID NO:13), exceptuando $eEF2_{292-300}$ (SEQ ID NO:14)] seleccionados como se ha descrito anteriormente tienen actividad citotóxica. Los experimentos se realizaron más o menos del mismo modo que en el Ejemplo 3 anterior. Por tanto, se extrajo sangre de donantes sanos que tenían una molécula de HLA-A*0201, se separaron células mononucleares de sangre periférica y la primera estimulación se realizó usando los seis péptidos candidatos (estimulador: auto-PBMC). Posteriormente, la estimulación de péptidos el segundo día y posteriormente se realizó a intervalos de 8 a 13 días (estimulador: alo B-LCL 3 mg/ml). Además, se añadió IL-2 cada dos días después de la segunda estimulación a una concentración final de 20 UI/ml. La citotoxicidad se midió 6 días después de la estimulación final de péptido. Como resultado, se observó un aumento de la actividad citotóxica en los 6 péptidos anteriores (Figs. 16 a 21). A partir del hecho anterior, se descubrió que los 6 péptidos anteriores [$eEF2_{739-747}$ (SEQ ID NO:8), $eEF2_{519-527}$ (SEQ ID NO:9), $eEF2_{671-679}$ (SEQ ID NO:10), $eEF2_{661-669}$ (SEQ ID NO:11), $eEF2_{394-402}$ (SEQ ID NO:12) y $eEF2_{284-292}$ (SEQ ID NO:13)] se unen a la molécula de HLA-A*0201 y tienen actividad citotóxica.

A continuación, se realizó un evaluación de si los 6 péptidos anteriores y el péptido $eEF2_{292-300}$ (SEQ ID NO:14) pueden unirse a una molécula de HLA-A*0206 y producir interferón-γ. Los experimentos se realizaron del mismo modo que en el método anterior, con la excepción de que se usaron donantes que tenían la molécula de HLA-A*0206. Como resultado, se descubrió que todos los péptidos ensayados aumentan la producción de interferón-γ (Fig. 29).

Afinidad de unión de péptidos EEF2 de tipo modificado a la molécula de HLA-A*0201

A continuación, se predijo la afinidad de unión de péptidos eEF2 de tipo modificado, en los que se había cambiado un aminoácido en posición 2 y/o posición 9 en los 6 péptidos anteriores ($eEF2_{739-747}$, $eEF2_{519-527}$, $eEF2_{671-679}$, $eEF2_{661-669}$, $eEF2_{394-402}$ y $eEF2_{284-292}$) así como en el péptido $eEF2_{292-300}$ (SEQ ID NO:14) por otro aminoácido, usando un programa como se ha descrito anteriormente (Tablas 15 a 21).

Tabla 15
Predicción de afinidad de unión de péptido $eEF2_{739-747}$ (SEQ ID NO:8) de tipo modificado (SEQ ID NO:32 a 34) a moléculas de HLA-A*0201 usando dos programas (NetMHC3.0 y ProPred)

Péptido	Secuencia de aminoácidos	NetMHC3.0			ProPred	
		Afinidad (nM)	Nivel de unión	Puntuación logarítmica	Puntuación real	Puntuación logarítmica
$eEF2_{739-747}$	RLMEPIYLV	3	SB	0,880	2426,739	7,7943
$eEF2_{739-747}$ 2M	RMMEPIYLV (SEQ ID NO:32)	3	SB	0,897	1752,645	7,4689
$eEF2_{739-747}$ 9L	RLMEPIYLL (SEQ ID NO:33)	4	SB	0,860	745,355	6,6139
$eEF2_{739-747}$ 2M9L	RMMEPIYLL (SEQ ID NO:34)	3	SB	0,877	538,312	6,2884

Tabla 16
Predicción de afinidad de unión de péptido $eEF2_{519-527}$ (SEQ ID NO:9) de tipo modificado (SEQ ID NO:35 a 37) a moléculas de HLA-A*0201 usando dos programas (NetMHC3.0 y ProPred)

Péptido	Secuencia de aminoácidos	NetMHC3.0			ProPred	
		Afinidad (nM)	Unión nivel	Puntuación logarítmica	Puntuación real	Puntuación logarítmica
$eEF2_{519-527}$	KLVEGLKRL	289	WB	0,476	705,066	6,5583
$eEF2_{519-527}$2M	KMVEGLKRL (SEQ ID NO: 35)	201	WB	0,510	509,214	6,2329
$eEF2_{519-527}$9V	KLVEGLKRV (SEQ ID NO: 36)	178	WB	0,521	2295,564	7,7387
$eEF2_{519-527}$2M9V	KMVEGLKRV (SEQ ID NO: 37)	112	WB	0,563	1657,907	7,4133

Tabla 17
Predicción de afinidad de unión de péptido $eEF2_{671-679}$ (SEQ ID NO:10) de tipo modificado (SEQ ID NO:38 a 40) a moléculas de HLA-A*0201 usando dos programas (NetMHC3.0 y ProPred)

Péptido	Secuencia de aminoácidos	NetMHC3.0			ProPred	
		Afinidad (nM)	Nivel de unión	Puntuación logarítmica	Puntuación real	Puntuación logarítmica
$eEF2_{671-679}$	YLNEIKDSV	11	SB	0,778	642,758	6,4658
$eEF2_{671-679}$2M	YMNEIKDSV (SEQ ID NO: 38)	10	SB	0,780	464,214	6,1403
$eEF2_{671-679}$9L	YLNEIKDSL (SEQ ID NO: 39)	20	SB	0,723	197,418	5,2853
$eEF2_{671-679}$2M9L	YMNEIKDSL (SEQ ID NO: 40)	21	SB	0,718	142,580	4,9599

Tabla 18
Predicción de afinidad de unión de péptido $eEF2_{661-669}$ (SEQ ID NO:11) de tipo modificado (SEQ ID NO:41 a 43) a moléculas de HLA-A*0201 usando dos programas (NetMHC3.0 y ProPred)

Péptido	Secuencia de aminoácidos	NetMHC3.0			ProPred	
		Afinidad (nM)	Nivel de unión	Puntuación logarítmica	Puntuación real	Puntuación logarítmica
$eEF2_{661-669}$	ILTDITKGV	46	SB	0,644	484,777	6,1837
$eEF2_{661-669}$2M	IMTDITKGV (SEQ ID NO: 41)	44	SB	0,649	350,117	5,8583
$eEF2_{661-669}$9L	ILTDITKGL (SEQ ID NO: 42)	82	WB	0,592	148,896	5,0032
$eEF2_{661-669}$2M9L	IMTDITKGL (SEQ ID NO: 43)	88	WB	0,585	107,536	4,6778

Tabla 19
Predicción de afinidad de unión de péptido $eEF2_{394-402}$ (SEQ ID NO:12) de tipo modificado (SEQ ID NO:44 a 46) a moléculas de HLA-A*0201 usando dos programas (NetMHC3.0 y ProPred)

Péptido	Secuencia de aminoácidos	NetMHC3.0			ProPred	
		Afinidad (nM)	Nivel de unión	Puntuación logarítmica	Puntuación real	Puntuación logarítmica
$eEF2_{394-402}$	LMMYISKMV	24	SB	0,704	315,959	5,7556
$eEF2_{394-402}$2L	LLMYISKMV (SEQ ID NO: 44)	44	SB	0,648	437,482	6,0810
$eEF2_{394-402}$9V	LMMYISKML (SEQ ID NO: 45)	83	WB	0,591	97,045	4,5752
$eEF2_{394-402}$2L9L	LLMYISKML (SEQ ID NO: 46)	139	WB	0,544	134,369	4,9006

Tabla 20
Predicción de afinidad de unión de péptido $eEF2_{284-292}$ (SEQ ID NO:13) de tipo modificado (SEQ ID NO:47 a 49) a moléculas de HLA-A*0201 usando dos programas (NetMHC3.0 y ProPred)

Péptido	Secuencia de aminoácidos	NetMHC3.0			ProPred	
		Afinidad (nM)	Nivel de unión	Puntuación logarítmica	Puntuación real	Puntuación logarítmica
$eEF2_{284-292}$	KLPRTFCQL	1145		0,705	142,060	4,9562
$eEF2_{284-292}$2M	KMPRTFCQL (SEQ ID NO: 47)	983		0,363	102,599	4,6308
$eEF2_{284-292}$9V	KLPRTFCQV (SEQ ID NO: 48)	331	WB	0,463	462,521	6,1367
$eEF2_{284-292}$2M9L	KMPRTFCQV (SEQ ID NO: 49)	228	WB	0,498	334,043	5,8113

Tabla 21
Predicción de afinidad de unión de péptido $eEF2_{292-300}$ (SEQ ID NO:14) de tipo modificado (SEQ ID NO:15 a 17 y 24) a moléculas de HLA-A*0201 usando dos programas (NetMHC3.0 y ProPred)

Péptido	Secuencia de aminoácidos	ProPred		NetMHC3.0		
		Puntuación real	Puntuación logarítmica	Afinidad (nM)	Nivel de unión	Puntuación logarítmica
$eEF2_{292-300}$	LILDPIFKV	3290,05	8,10	8	SB	0,802
$eEF2_{292-300}^{2L}$	LLLDPIFKV (SEQ ID NO: 15)	23927,65	10,08	3	SB	0,898
$eEF2_{292-300}^{2M}$	LMLDPIFKV (SEQ ID NO: 16)	17281,08	9,76	3	SB	0,898
$eEF2_{292-300}^{2L9L}$	LLLDPIFKL (SEQ ID NO: 17)	7349,21	8,90	3	SB	0,872
$eEF2_{292-300}$2M9L	LMLDPIFKL (SEQ ID NO: 18)	5307,76	8,58	3	SB	0,872

Además, en péptidos de tipo modificado (SEQ ID NO:15 a 17 y 24) de $eEF2_{292-300}$ (SEQ ID NO:14) entre los péptidos anteriores, se evaluó realmente la afinidad de unión a la molécula de HLA-A*0201 (Tabla 22), la citotoxicidad (Fig. 22 a 25) y la actividad del interferón-γ (Fig. 26) usando un método como el descrito anteriormente.

Tabla 22

Ensayo de unión (ensayo de estabilización) de péptidos $eEF2_{292-300}$ de tipo modificado			
Péptido	Secuencia de aminoácidos	MIF	% de aumento de MIF
Ns		4,96	
Sin péptido		84,50	
$eEF2_{292-300}$	LILDPIFKV	311,69	268,86

(continuación)

Ensayo de unión (ensayo de estabilización) de péptidos $eEF2_{292-300}$ de tipo modificado			
Péptido	Secuencia de aminoácidos	MIF	% de aumento de MIF
$^{eEF2}292\text{-}300^{2L}$	LLLDPIFKV	338,80	300,95
$^{eEF2}292\text{-}300^{2M}$	LMLDPIFKV	313,14	270,58
$^{eEF2}292\text{-}300^{2L9L}$	LLLDPIFKL	319,26	277,82
$^{eEF2}292\text{-}300^{2M9L}$	LMLDPIFKL	275,42	225,94

Como resultado, se descubrió que, entre los péptidos $eEF2_{292-300}$ de tipo modificado, $eEF2_{292-300}$ 2L (un péptido que tenía un cambio de I a L en el aminoácido en posición 2 en el péptido $eEF2_{292-300}$, SEQ ID NO:15), $eEF2_{292-300}$ 2M (un péptido que tenía un cambio de I a M en el aminoácido en posición 2 en el péptido $eEF2_{292-300}$, SEQ ID NO:16), $eEF2_{292-300}$ 2L9L (un péptido que tenía un cambio de I a L en el aminoácido en posición 2 y de V a L en el aminoácido en posición 9 en el péptido $eEF2_{292-300}$, SEQ ID NO:17) y $eEF2_{292-300}$ 2M9L (un péptido que tenía un cambio de I a M en un aminoácido en posición 2 y de V a L en un aminoácido en posición 9 en el péptido $eEF2_{292-300}$, SEQ ID NO:24) tienen una afinidad de unión a la molécula de HLA-A*0201 mayor que la del péptido $eEF2_{292-300}$ original (Tabla 22), y una mayor citotoxicidad y actividad del interferón-γ en seres humanos (Figs. 22 a 26, y 28).

Ejemplo 5

Expresión forzada de EEF2 en líneas celulares de cáncer

Se establecieron clones celulares en los que se expresó un vector de expresión de eEF2 o un vector de expresión vacío en la línea celular de cáncer de estómago AZ-521. El vector de expresión eEF2 es un vector en el que se ha insertado una secuencia de nucleótidos de un gen eEF2 en un sitio de escisión por la enzima de restricción: EcoRI de pcDNA3.1 (+) (Invitrogen). Estas células se cultivaron sin sincronización y se calculó el tiempo de duplicación de las células mediante recuentos celulares después de 48 y 72 desde el comienzo del cultivo. Además, se fijaron 1 x 10^5 células con etanol al 80% y después se dejaron en reposo en PBS que contenía yoduro de propidio (PI, 5 µg/ml) y RNasaA (200 µg/ml) durante 30 minutos, y la distribución de cada fase del ciclo celular se analizó por citometría de flujo (Fig. 13, gráfico superior izquierdo). Como el tiempo de duplicación de las células corresponde a la duración del ciclo celular, el tiempo después se multiplicó por la distribución proporcional de cada fase del ciclo celular para calcular de tiempo de progresión de cada fase (Fig. 13, gráfico superior derecho y tabla inferior). Como resultado, se observó que se reduce el recuento celular en una fase G2/M y el tiempo de progresión se acorta en células que tienen eEF2 expresado (Fig. 13). Esto sugiere que eEF2 acelera la progresión de la fase G2/M.

Se mezclaron 5 × 10^6 células de cada una de las líneas celulares de cáncer de estómago AZ-521 que tenía eEF2 de expresión forzada (2 clones) y AZ-521 que tenía un vector de expresión vacío de control (2 clones) establecidas como se ha descrito anteriormente, con Matrigel (Becton Dickinson), y la mezcla se inyectó por vía subcutánea en las regiones abdominales izquierda y derecha de ratones desnudos para formar un tumor. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana y se observó durante 34 días. El volumen (mm^3) del tumor se calculó por (eje menor)^2 × (eje mayor)^2/2. Se muestran los resultados de tres experimentos realizados por separado en cada clon (Fig. 14). Por los resultados, se demostró que el volumen del tumor aumenta de forma espectacular en los ratones inyectados con células que tienen eEF2 de expresión forzada en comparación con un control. La Fig. 15 muestra un ejemplo típico. El tumor de la izquierda se causa por células AZ-521 que tienen un vector vacío expresado y el tumor de la derecha por células AZ-521 que tienen eEF2 de expresión forzada.

Ejemplo 6

Identificación de Secuencia Diana de ARNhc que se dirige a EEF2

Para desarrollar un ARNhc (denominado en lo sucesivo shEF2) que pueda inhibir eficazmente la expresión de eEF2 mediante la dirección a eEF2 e inhibir el crecimiento de cánceres, se seleccionaron dos secuencias (denominadas en lo sucesivo shEF-1918 y shEF-2804) que pueden ser dianas en una secuencia de eEF2.

Una secuencia diana en las posiciones 1918-1947 (posiciones 1918-1947 desde el extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica una proteína eEF2) en un gen eEF2: 5'-gcc tggccgagga catcgataaa ggcgagg-3' (SEQ ID NO:18).

Una secuencia diana en las posiciones 2804-2833 (posiciones 2804-2833 desde el extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica una proteína eEF2) en un gen eEF2: 5'-actcaac cataacactt gatgccgttt ctt-3' (SEQ ID NO:19).

Construcción de ARNhc

Para construir un ARNhc para las secuencias anteriores (SEQ ID NO:18 y 19), se sintetizaron químicamente una

secuencia de ADN [shEF-1918 o shEF-2804 (cadena codificante)] que consiste en una secuencia codificante de una secuencia diana (30 bases) - una secuencia de bucle (10 bases) - una secuencia antisentido (30 bases), y su secuencia de ADN complementaria [shEF-1918 o shEF-2804 (cadena antisentido)] y después se hibridaron, y el producto se insertó en sitios de reconocimiento SacI y KpnI del vector de expresión ARNt-ARNhc, piGENE tRNA Pur (Clontech, Palo Alto, CA). Dichas secuencias de ADN insertadas se muestran a continuación. A este respecto, se añadieron variaciones a una parte de una secuencia codificante de una secuencia diana de manera que se introduce eficazmente una cadena antisentido en RISC cuando se escinde un ARN que tiene una secuencia transcrita (como se muestra por subrayados en las siguientes secuencias).

shEF-1918 (cadena codificante):
5'-(gcc tggccgagga catcgatgaa agcgtgg) cttcctgtca (cctcgcc tttatcgatg tcctcggcca ggc)-3' (SEQ ID NO:20)
shEF-1918 (cadena antisentido):
3'-(cgg accggctcct gtagctactt tcgcacc) gaaggacagt (ggagcgg aaatagctac aggagccggt ccg)-5' (SEQ ID NO:21)
shEF-2804 (cadena codificante):
5'-(actcaac cataacactt gataccattt gtt) cttcctgtca (aag aaacggcatc aagtgttatg gttgagt)-3' (SEQ ID NO:22)
shEF-2804 (cadena antisentido):
3'-(tgagttg gtattgtgaa ctatggtaaa caa) gaaggacagt (ttc tttgccgtag ttcacaatac caactca)-5' (SEQ ID NO:23)

Cultivo celular e introducción de ARNhc

Se cultivaron células de cáncer de pulmón PC-14, células de cáncer pancreático PCI6, células de fibrosarcoma HT-1080 células de glioma maligno A172 en DMEM que contenía FBS al 10%. Para introducir un ARNhc, las células (1×10^5) se lavaron dos veces con PBS y después se suspendieron en 250 µl de un medio RPMI1640 sin FBS, se añadieron a la suspensión 10 µg de shEF-1918, shEF-2804 o un vector de ARNhc para Luciferasa, y shLuc disuelto en 50 µl de un medio RPMI 1640 sin FBS y se realizó una electroporación usando Gene Pulsor II (BioRad) en condiciones de 950 µFD y 175 V. En estas condiciones, la tasa de supervivencia de las células fue de aproximadamente 90%. Después de la introducción del ARNhc, se contó el número de células vivas, las células se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/ml, se realizó un tratamiento con tripsina después de 72 horas y se contó el número de células. Como resultado, shEF-1918 y shEF-2804 inhibieron significativamente la proliferación celular en los cuatro tipos de células analizadas en comparación con shLuc (Fig. 27).

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un método para detectar cáncer usando eEF2 como marcador, una composición farmacéutica que se dirige a eEF2 para su tratamiento o prevención, un péptido eEF2 restringido para HLA-A*2402 o para HLA-A*0201, una composición farmacéutica que los contiene, entre otras cosas, y que, por lo tanto, es aplicable en el campo de la farmacia, por ejemplo, en el campo del desarrollo y producción de productos farmacéuticos preventivos o terapéuticos para diversos tumores de órganos hematopoyéticos o cánceres sólidos con alta expresión del gen de eEF2.

Texto sin Listado de Secuencias

SEQ ID NO:2: ARNip de eEF2
SEQ ID NO:3: ARNip de eEF2
SEQ ID NO:18: eEF2 1918-1947
SEQ ID NO:19: eEF2 2804-2833
SEQ ID NO:20: shEF-1918 codificante
SEQ ID NO:21: shEF-1918 antisentido
SEQ ID NO:22: shEF-2804 codificante
SEQ ID NO:23: shEF-2804 antisentido

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> International Institute of Cancer Immunology, Inc.

<120> Nuevo antígeno de cancer eEF2

<130> 161936ep

<150> EP 13188341.5
<151> 08-01-2010

<150> EP 10729253.4
<151> 08-01-2010

<150> JP 2009-002608

<151> 08-01-2009

<160> 141

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 858
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
Met Val Asn Phe Thr Val Asp Gln Ile Arg Ala Ile Met Asp Lys Lys
1               5                  10                  15

Ala Asn Ile Arg Asn Met Ser Val Ile Ala His Val Asp His Gly Lys
            20                  25                  30

Ser Thr Leu Thr Asp Ser Leu Val Cys Lys Ala Gly Ile Ile Ala Ser
        35                  40                  45

Ala Arg Ala Gly Glu Thr Arg Phe Thr Asp Thr Arg Lys Asp Glu Gln
    50                  55                  60

Glu Arg Cys Ile Thr Ile Lys Ser Thr Ala Ile Ser Leu Phe Tyr Glu
65                  70                  75                  80

Leu Ser Glu Asn Asp Leu Asn Phe Ile Lys Gln Ser Lys Asp Gly Ala
                85                  90                  95

Gly Phe Leu Ile Asn Leu Ile Asp Ser Pro Gly His Val Asp Phe Ser
            100                 105                 110

Ser Glu Val Thr Ala Ala Leu Arg Val Thr Asp Gly Ala Leu Val Val
        115                 120                 125

Val Asp Cys Val Ser Gly Val Cys Val Gln Thr Glu Thr Val Leu Arg
    130                 135                 140
```

```
Gln Ala Ile Ala Glu Arg Ile Lys Pro Val Leu Met Met Asn Lys Met
145                 150                 155                 160

Asp Arg Ala Leu Leu Glu Leu Gln Leu Glu Pro Glu Glu Leu Tyr Gln
                165                 170                 175

Thr Phe Gln Arg Ile Val Glu Asn Val Asn Val Ile Ile Ser Thr Tyr
            180                 185                 190

Gly Glu Gly Glu Ser Gly Pro Met Gly Asn Ile Met Ile Asp Pro Val
        195                 200                 205

Leu Gly Thr Val Gly Phe Gly Ser Gly Leu His Gly Trp Ala Phe Thr
    210                 215                 220

Leu Lys Gln Phe Ala Glu Met Tyr Val Ala Lys Phe Ala Ala Lys Gly
225                 230                 235                 240

Glu Gly Gln Leu Gly Pro Ala Glu Arg Ala Lys Lys Val Glu Asp Met
                245                 250                 255

Met Lys Lys Leu Trp Gly Asp Arg Tyr Phe Asp Pro Ala Asn Gly Lys
            260                 265                 270

Phe Ser Lys Ser Ala Thr Ser Pro Glu Gly Lys Lys Leu Pro Arg Thr
        275                 280                 285

Phe Cys Gln Leu Ile Leu Asp Pro Ile Phe Lys Val Phe Asp Ala Ile
    290                 295                 300

Met Asn Phe Lys Lys Glu Glu Thr Ala Lys Leu Ile Glu Lys Leu Asp
305                 310                 315                 320

Ile Lys Leu Asp Ser Glu Asp Lys Asp Lys Glu Gly Lys Pro Leu Leu
                325                 330                 335

Lys Ala Val Met Arg Arg Trp Leu Pro Ala Gly Asp Ala Leu Leu Gln
            340                 345                 350

Met Ile Thr Ile His Leu Pro Ser Pro Val Thr Ala Gln Lys Tyr Arg
        355                 360                 365

Cys Glu Leu Leu Tyr Glu Gly Pro Pro Asp Asp Glu Ala Ala Met Gly
    370                 375                 380

Ile Lys Ser Cys Asp Pro Lys Gly Pro Leu Met Met Tyr Ile Ser Lys
385                 390                 395                 400
```

```
Met Val Pro Thr Ser Asp Lys Gly Arg Phe Tyr Ala Phe Gly Arg Val
                405                 410                 415

Phe Ser Gly Leu Val Ser Thr Gly Leu Lys Val Arg Ile Met Gly Pro
            420                 425                 430

Asn Tyr Thr Pro Gly Lys Lys Glu Asp Leu Tyr Leu Lys Pro Ile Gln
        435                 440                 445

Arg Thr Ile Leu Met Met Gly Arg Tyr Val Glu Pro Ile Glu Asp Val
    450                 455                 460

Pro Cys Gly Asn Ile Val Gly Leu Val Gly Val Asp Gln Phe Leu Val
465                 470                 475                 480

Lys Thr Gly Thr Ile Thr Thr Phe Glu His Ala His Asn Met Arg Val
                485                 490                 495

Met Lys Phe Ser Val Ser Pro Val Val Arg Val Ala Val Glu Ala Lys
            500                 505                 510

Asn Pro Ala Asp Leu Pro Lys Leu Val Glu Gly Leu Lys Arg Leu Ala
        515                 520                 525

Lys Ser Asp Pro Met Val Gln Cys Ile Ile Glu Glu Ser Gly Glu His
    530                 535                 540

Ile Ile Ala Gly Ala Gly Glu Leu His Leu Glu Ile Cys Leu Lys Asp
545                 550                 555                 560

Leu Glu Glu Asp His Ala Cys Ile Pro Ile Lys Lys Ser Asp Pro Val
                565                 570                 575

Val Ser Tyr Arg Glu Thr Val Ser Glu Glu Ser Asn Val Leu Cys Leu
            580                 585                 590

Ser Lys Ser Pro Asn Lys His Asn Arg Leu Tyr Met Lys Ala Arg Pro
        595                 600                 605

Phe Pro Asp Gly Leu Ala Glu Asp Ile Asp Lys Gly Glu Val Ser Ala
    610                 615                 620

Arg Gln Glu Leu Lys Gln Arg Ala Arg Tyr Leu Ala Glu Lys Tyr Glu
625                 630                 635                 640

Trp Asp Val Ala Glu Ala Arg Lys Ile Trp Cys Phe Gly Pro Asp Gly
```

645 650 655

Thr Gly Pro Asn Ile Leu Thr Asp Ile Thr Lys Gly Val Gln Tyr Leu
660 665 670

Asn Glu Ile Lys Asp Ser Val Val Ala Gly Phe Gln Trp Ala Thr Lys
675 680 685

Glu Gly Ala Leu Cys Glu Glu Asn Met Arg Gly Val Arg Phe Asp Val
690 695 700

His Asp Val Thr Leu His Ala Asp Ala Ile His Arg Gly Gly Gly Gln
705 710 715 720

Ile Ile Pro Thr Ala Arg Arg Cys Leu Tyr Ala Ser Val Leu Thr Ala
725 730 735

Gln Pro Arg Leu Met Glu Pro Ile Tyr Leu Val Glu Ile Gln Cys Pro
740 745 750

Glu Gln Val Val Gly Gly Ile Tyr Gly Val Leu Asn Arg Lys Arg Gly
755 760 765

His Val Phe Glu Glu Ser Gln Val Ala Gly Thr Pro Met Phe Val Val
770 775 780

Lys Ala Tyr Leu Pro Val Asn Glu Ser Phe Gly Phe Thr Ala Asp Leu
785 790 795 800

Arg Ser Asn Thr Gly Gly Gln Ala Phe Pro Gln Cys Val Phe Asp His
805 810 815

Trp Gln Ile Leu Pro Gly Asp Pro Phe Asp Asn Ser Ser Arg Pro Ser
820 825 830

Gln Val Val Ala Glu Thr Arg Lys Arg Lys Gly Leu Lys Glu Gly Ile
835 840 845

Pro Ala Leu Asp Asn Phe Leu Asp Lys Leu
850 855

<210> 2
<211> 30
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ARNip de eEF2

<400> 2
caugggcaac aucaugaucg auccuguccu 30

<210> 3
<211> 30
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ARNip de eEF2

<400> 3
aggacaggau cgaucaugau guugcccaug 30

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Arg Phe Tyr Ala Phe Gly Arg Val Phe
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Ala Phe Gly Arg Val Phe Ser Gly Leu
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Arg Phe Asp Val His Asp Val Thr Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Ala Tyr Leu Pro Val Asn Glu Ser Phe
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Arg Leu Met Glu Pro Ile Tyr Leu Val
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Lys Leu Val Glu Gly Leu Lys Arg Leu
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Tyr Leu Asn Glu Ile Lys Asp Ser Val
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Ile Leu Thr Asp Ile Thr Lys Gly Val
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Leu Met Met Tyr Ile Ser Lys Met Val
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

Lys Leu Pro Arg Thr Phe Cys Gln Leu
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Leu Ile Leu Asp Pro Ile Phe Lys Val

1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Leu Leu Leu Asp Pro Ile Phe Lys Val
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Leu Met Leu Asp Pro Ile Phe Lys Val
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Leu Leu Leu Asp Pro Ile Phe Lys Leu
1 5

<210> 18
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> eEF2 1918-1947

<400> 18
gcctggccga ggacatcgat aaaggcgagg 30

<210> 19
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> eEF2 2804-2833

<400> 19
actcaaccat aacacttgat gccgtttctt 30

<210> 20
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> shEF-1918 codificante

<400> 20

gcctggccga ggacatcgat gaaagcgtgg cttcctgtca cctcgccttt atcgatgtcc 60

tcggccaggc 70

<210> 21
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> shEF-1918 antisentido

<400> 21

gcctggccga ggacatcgat aaaggcgagg tgacaggaag ccacgctttc atcgatgtcc 60

tcggccaggc 70

<210> 22
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> shEF-2804 codificante

<400> 22

actcaaccat aacacttgat accatttgtt cttcctgtca aagaaacggc atcaagtgtt 60

atggttgagt 70

<210> 23
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> shEF-2804 antisentido

<400> 23

actcaaccat aacacttgat gccgtttctt tgacaggaag aacaaatggt atcaagtgtt 60

atggttgagt 70

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Leu Met Leu Asp Pro Ile Phe Lys Leu
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

Ala Tyr Leu Pro Val Asn Glu Ser Ile
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Ala Tyr Leu Pro Val Asn Glu Ser Leu
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Arg Tyr Tyr Ala Phe Gly Arg Val Phe
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

Arg Phe Tyr Ala Phe Gly Arg Val Ile
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Arg Tyr Tyr Ala Phe Gly Arg Val Ile
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

Arg Phe Tyr Ala Phe Gly Arg Val Leu
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

Arg Tyr Tyr Ala Phe Gly Arg Val Leu
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 32

Arg Met Met Glu Pro Ile Tyr Leu Val
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Arg Leu Met Glu Pro Ile Tyr Leu Leu
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Arg Met Met Glu Pro Ile Tyr Leu Leu
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Lys Met Val Glu Gly Leu Lys Arg Leu
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

Lys Leu Val Glu Gly Leu Lys Arg Val
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 37

Lys Met Val Glu Gly Leu Lys Arg Val
1 5

<210> 38
<211> 9

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 38

Tyr Met Asn Glu Ile Lys Asp Ser Val
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 39

Tyr Leu Asn Glu Ile Lys Asp Ser Leu
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

Tyr Met Asn Glu Ile Lys Asp Ser Leu
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

Ile Met Thr Asp Ile Thr Lys Gly Val
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

Ile Leu Thr Asp Ile Thr Lys Gly Leu
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

Ile Met Thr Asp Ile Thr Lys Gly Leu
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Leu Leu Met Tyr Ile Ser Lys Met Val
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Leu Met Met Tyr Ile Ser Lys Met Leu
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 46

Leu Leu Met Tyr Ile Ser Lys Met Leu
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

Lys Met Pro Arg Thr Phe Cys Gln Leu
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Lys Leu Pro Arg Thr Phe Cys Gln Val
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

Lys Met Pro Arg Thr Phe Cys Gln Val
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

Gly Leu His Gly Trp Ala Phe Thr Leu
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

Gly Leu Val Gly Val Asp Gln Phe Leu
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 52

Trp Leu Pro Ala Gly Asp Ala Leu Leu
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

Val Val Val Asp Cys Val Ser Gly Val
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 54

Ala Ile Ala Glu Arg Ile Lys Pro Val
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 55

Ile Met Ile Asp Pro Val Leu Gly Thr
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 56

Arg Leu Ala Lys Ser Asp Pro Met Val
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 57

Gly Leu Val Ser Thr Gly Leu Lys Val
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 58

Leu Val Gly Val Asp Gln Phe Leu Val
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 59

Lys Met Asp Arg Ala Leu Leu Glu Leu
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 60

Phe Val Val Lys Ala Tyr Leu Pro Val
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 61

Thr Ile Leu Met Met Gly Arg Tyr Val
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 62

Asn Leu Ile Asp Ser Pro Gly His Val
1 5

<210> 63
<211> 9

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 63

Ala Leu Asp Asn Phe Leu Asp Lys Leu
1 5

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 64

Cys Leu Tyr Ala Ser Val Leu Thr Ala
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 65

Leu Leu Gln Met Ile Thr Ile His Leu
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 66

Gln Val Ala Gly Thr Pro Met Phe Val
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 67

Val Val Ala Gly Phe Gln Trp Ala Thr
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 68

Leu Met Met Asn Lys Met Asp Arg Ala
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 69

Asn Met Arg Gly Val Arg Phe Asp Val
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 70

Asn Met Arg Val Met Lys Phe Ser Val
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 71

Ala Ile Met Asp Lys Lys Ala Asn Ile
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

Cys Val Phe Asp His Trp Gln Ile Leu
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 73

Gly Ile Pro Ala Leu Asp Asn Phe Leu
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 74

Val Leu Asn Arg Lys Arg Gly His Val
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 75

Met Met Gly Arg Tyr Val Glu Pro Ile
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 76

Phe Leu Val Lys Thr Gly Thr Ile Thr
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 77

Gln Val Val Gly Gly Ile Tyr Gly Val
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 78

Arg Val Thr Asp Gly Ala Leu Val Val
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 79

Phe Gln Trp Ala Thr Lys Glu Gly Ala
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 80

Val Ala Gly Thr Pro Met Phe Val Val
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 81

Gly Leu Lys Glu Gly Ile Pro Ala Leu
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 82

Ser Val Leu Thr Ala Gln Pro Arg Leu
1 5

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 83

Pro Met Phe Val Val Lys Ala Tyr Leu
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 84

Val Met Lys Phe Ser Val Ser Pro Val
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 85

Trp Ala Phe Thr Leu Lys Gln Phe Ala
1 5

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 86

Phe Glu His Ala His Asn Met Arg Val
1 5

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 87

Lys Gln Phe Ala Glu Met Tyr Val Ala
1 5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 88

Arg Val Phe Ser Gly Leu Val Ser Thr
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 89

Arg Ile Val Glu Asn Val Asn Val Ile
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 90

Met Met Asn Lys Met Asp Arg Ala Leu
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 91

Glu Met Tyr Val Ala Lys Phe Ala Ala
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 92

Phe Ser Val Ser Pro Val Val Arg Val
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 93

Glu Leu Tyr Gln Thr Phe Gln Arg Ile
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 94

Ser Val Val Ala Gly Phe Gln Trp Ala
1 5

<210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 95

Ile Met Asn Phe Lys Lys Glu Glu Thr
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 96

Gly Ala Leu Val Val Val Asp Cys Val
1 5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 97

Lys Val Glu Asp Met Met Lys Lys Leu
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 98

Arg Asn Met Ser Val Ile Ala His Val
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 99

Lys Ala Asn Ile Arg Asn Met Ser Val
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 100

Thr Val Ser Glu Glu Ser Asn Val Leu
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 101

Gly Val Cys Val Gln Thr Glu Thr Val
1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 102

Asp Ile Thr Lys Gly Val Gln Tyr Leu
1 5

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 103

Ala Val Met Arg Arg Trp Leu Pro Ala
1 5

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 104

Phe Ser Ser Glu Val Thr Ala Ala Leu
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 105

Lys Leu Trp Gly Asp Arg Tyr Phe Asp
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 106

Leu Glu Pro Glu Glu Leu Tyr Gln Thr
1 5

<210> 107
<211> 9
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 107

Gly Val Asp Gln Phe Leu Val Lys Thr
1 5

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 108

Phe Thr Leu Lys Gln Phe Ala Glu Met
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 109

Ala Glu Met Tyr Val Ala Lys Phe Ala
1 5

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 110

Phe Thr Ala Asp Leu Arg Ser Asn Thr
1 5

<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 111

Met Ile Asp Pro Val Leu Gly Thr Val
1 5

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 112

Tyr Leu Pro Val Asn Glu Ser Phe Gly
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 113

Asn Pro Ala Asp Leu Pro Lys Leu Val
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 114

Gly Pro Ala Glu Arg Ala Lys Lys Val
1 5

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 115

Asp Leu Pro Lys Leu Val Glu Gly Leu
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 116

Met Val Asn Phe Thr Val Asp Gln Ile
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 117

Gly Gly Gln Ala Phe Pro Gln Cys Val
1 5

<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 118

Val Leu Thr Ala Gln Pro Arg Leu Met
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 119

Ser Gly Leu His Gly Trp Ala Phe Thr
1 5

<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 120

Ile Thr Ile His Leu Pro Ser Pro Val
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 121

Lys Ser Thr Leu Thr Asp Ser Leu Val
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 122

Gly Glu Leu His Leu Glu Ile Cys Leu
1 5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 123

Cys Ile Thr Ile Lys Ser Thr Ala Ile
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 124

Ser Glu Val Thr Ala Ala Leu Arg Val
1 5

<210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 125

Phe Thr Val Asp Gln Ile Arg Ala Ile
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 126

Ala Gln Pro Arg Leu Met Glu Pro Ile
1 5

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 127

Tyr Leu Ala Glu Lys Tyr Glu Trp Asp
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 128

Lys Ile Trp Cys Phe Gly Pro Asp Gly
1 5

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 129

Gly Thr Val Gly Phe Gly Ser Gly Leu
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 130

Val Glu Ile Gln Cys Pro Glu Gln Val
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 131

Lys Asn Pro Ala Asp Leu Pro Lys Leu
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 132

Gly Val Arg Phe Asp Val His Asp Val
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 133

Thr Thr Phe Glu His Ala His Asn Met
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 134

Gly Asn Ile Val Gly Leu Val Gly Val
1 5

<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 135

Ile Ile Pro Thr Ala Arg Arg Cys Leu
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 136

Pro Leu Met Met Tyr Ile Ser Lys Met
1 5

<210> 137
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 137

Gly Gln Leu Gly Pro Ala Glu Arg Ala
1 5

<210> 138
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 138

Leu Lys Gln Phe Ala Glu Met Tyr Val
1 5

<210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 139

Met Gly Asn Ile Met Ile Asp Pro Val
1 5

<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 140

Lys Val Phe Asp Ala Ile Met Asn Phe
1 5

<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 141

Met Glu Pro Ile Tyr Leu Val Glu Ile
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de cánceres en un sujeto positivo para HLA-A*2402, en donde dicha composición farmacéutica comprende un péptido eEF2 que consiste en una secuencia de aminoácidos compuesta por aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2, en donde la secuencia de aminoácidos se selecciona entre:

(a) Ala Tyr Leu Pro Val Asn Glu Ser Phe(SEQ ID NO:7); y
(b) una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución del aminoácido Tyr en la posición 2 por Phe, y/o una sustitución del aminoácido Phe en la posición 9 por Ile o Leu.

en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en (a).

2. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de cánceres en un sujeto positivo para HLA-A*2402, en donde dicha composición farmacéutica comprende un polinucleótido que codifica un péptido eEF2 que consiste en una secuencia de aminoácidos compuesta por aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2, en donde la secuencia de aminoácidos se selecciona entre:

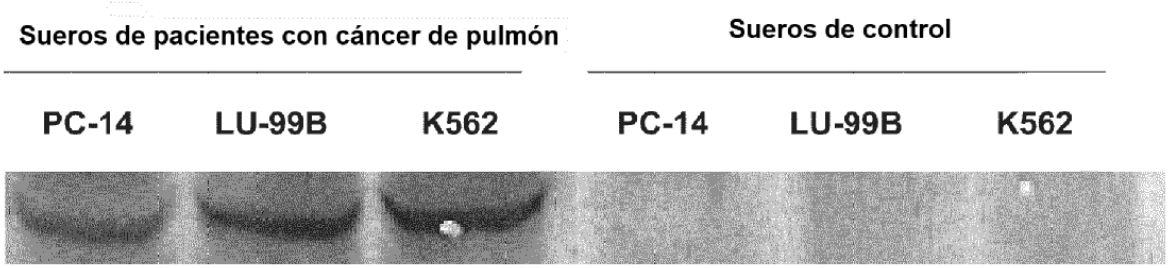
(a) Ala Tyr Leu Pro Val Asn Glu Ser Phe (SEQ ID NO:7); y
(b) una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución del aminoácido Tyr en la posición 2 por Phe, y/o una sustitución del aminoácido Phe en la posición 9 por Ile o Leu en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en (a).

3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el cáncer se selecciona de adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer ductal pancreático, glioblastoma maligno, linfoma maligno y cáncer de células escamosas de cabeza y cuello.

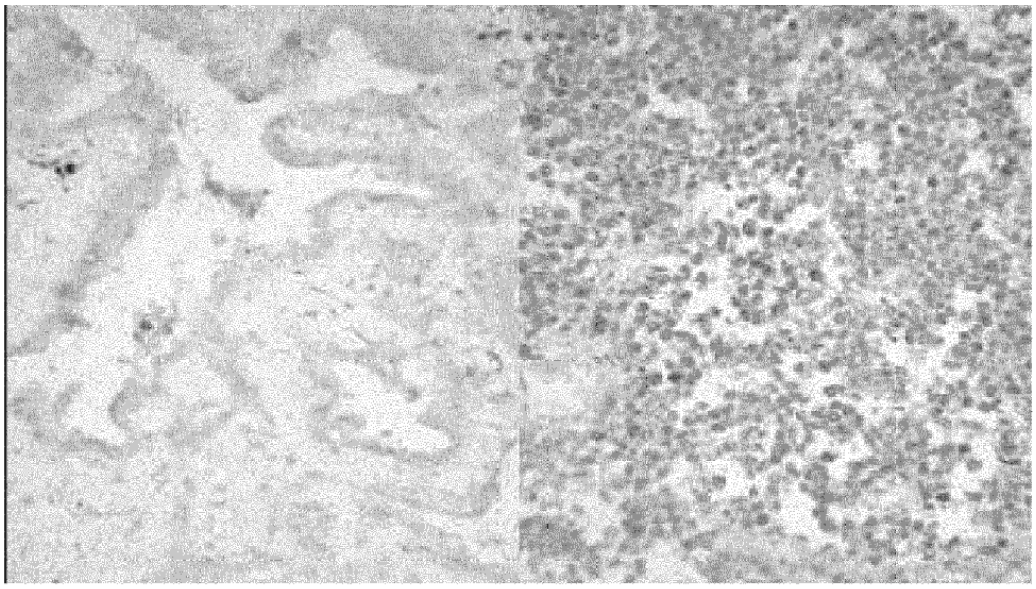
4. Uso de un péptido eEF2 que consiste en una secuencia de aminoácidos compuesta de aminoácidos contiguos derivados de una proteína eEF2, en donde la secuencia de aminoácidos se selecciona entre:

(a) Ala Tyr Leu Pro Val Asn Glu Ser Phe (SEQ ID NO:7); y
(b) una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución del aminoácido Tyr en la posición 2 por Phe, y/o una sustitución del aminoácido Phe en la posición 9 por Ile o Leu en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en (a) o un polinucleótido que codifica dicho péptido eEF2
para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de cánceres.

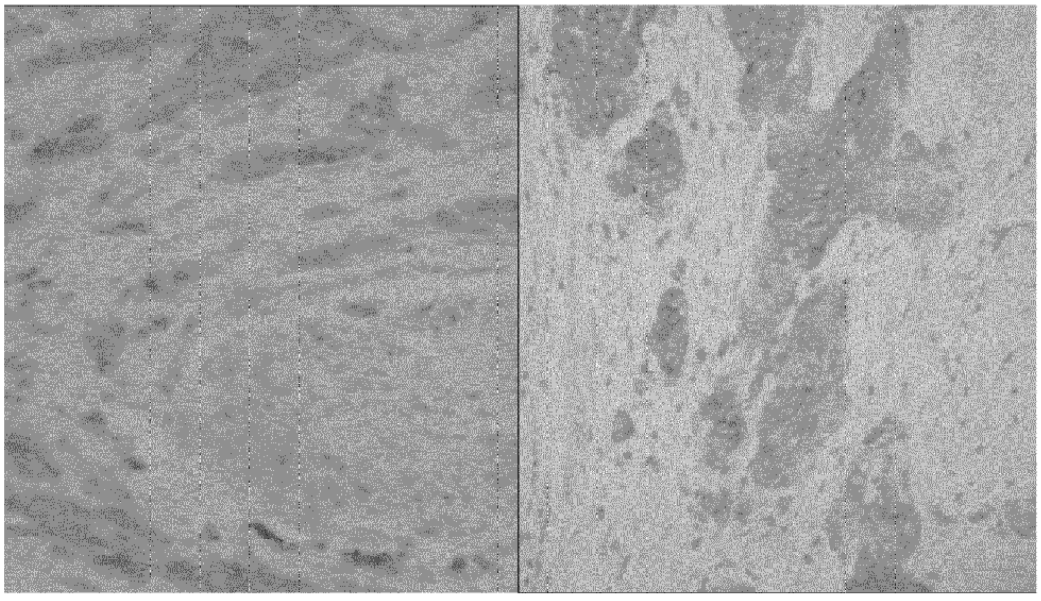
[Fig 1]



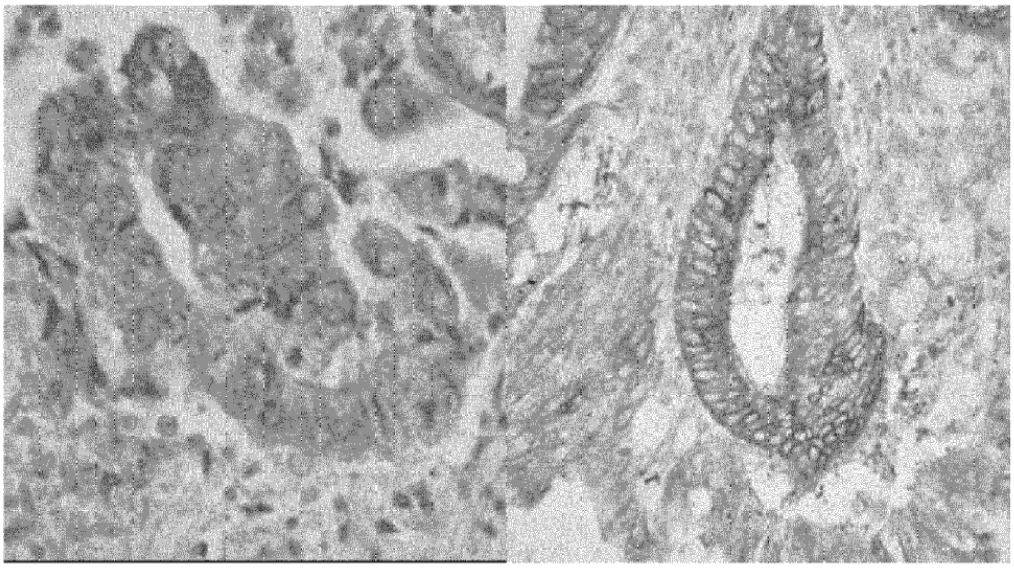
[Fig 2]



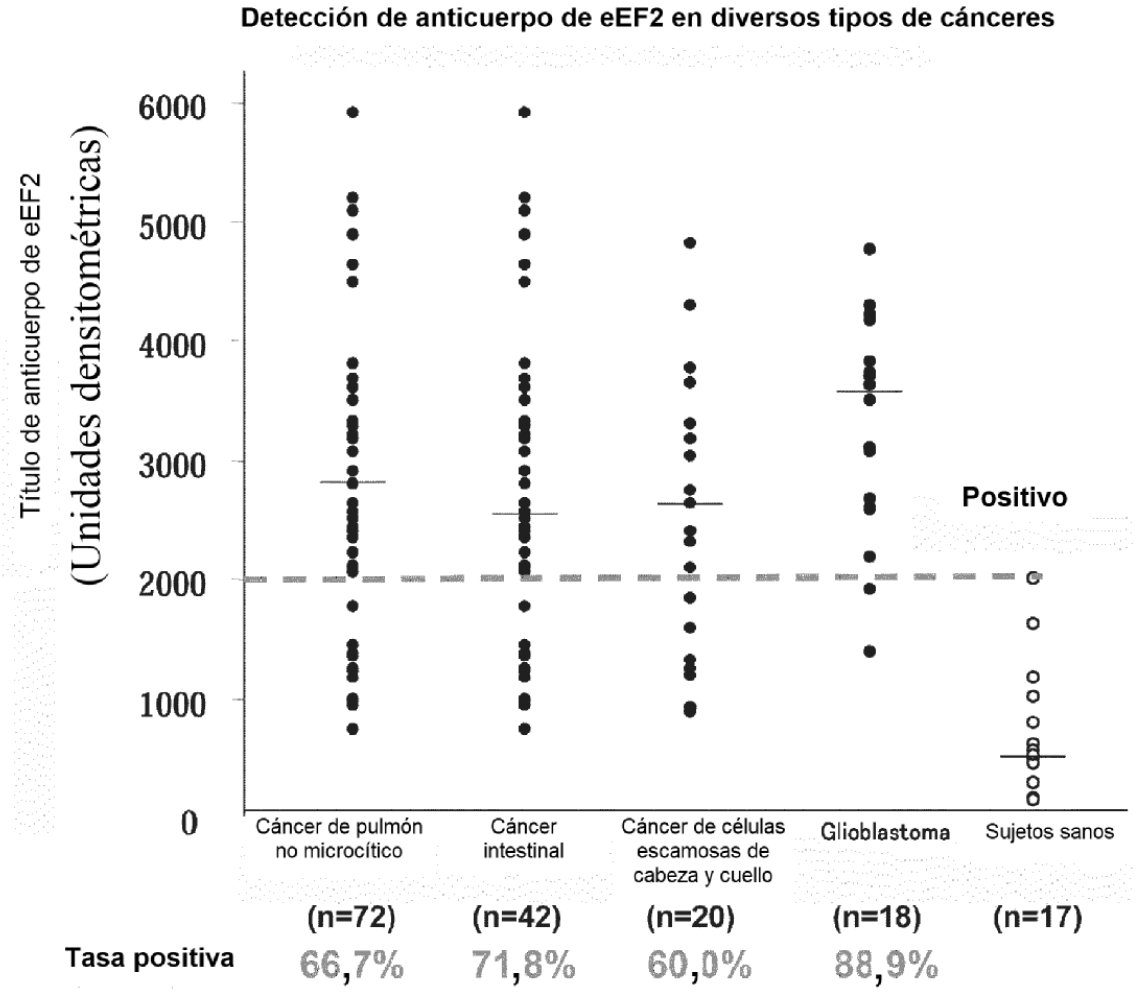
[Fig 3]



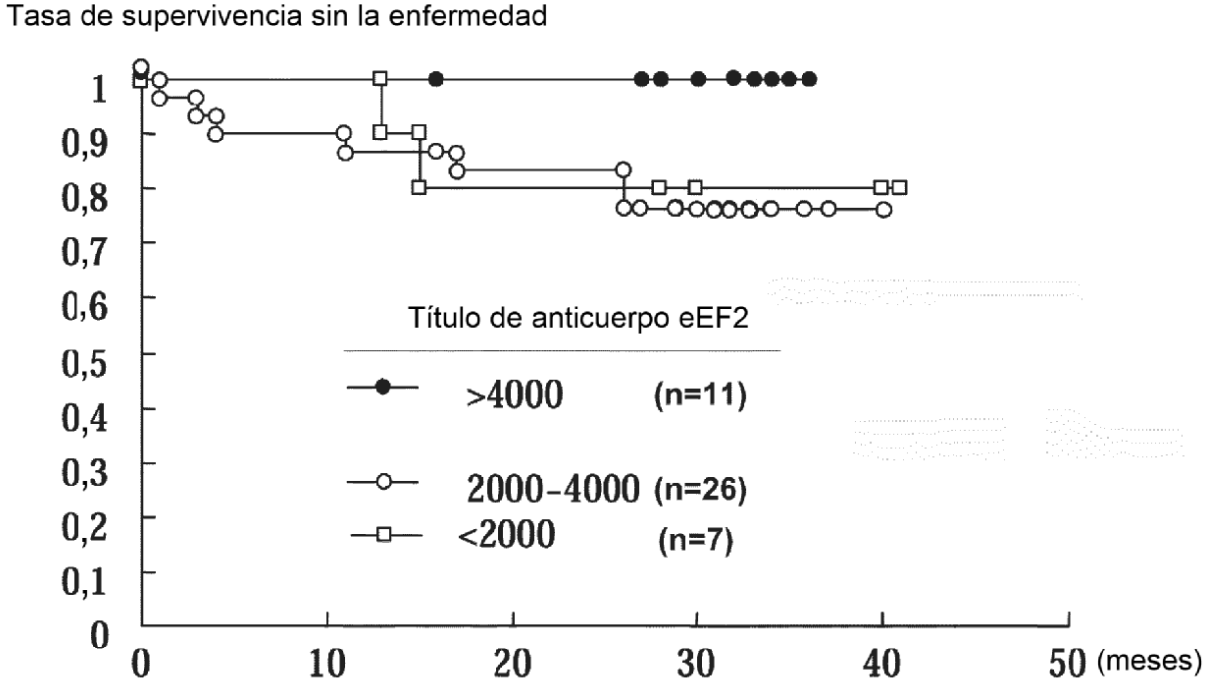
[Fig 4]



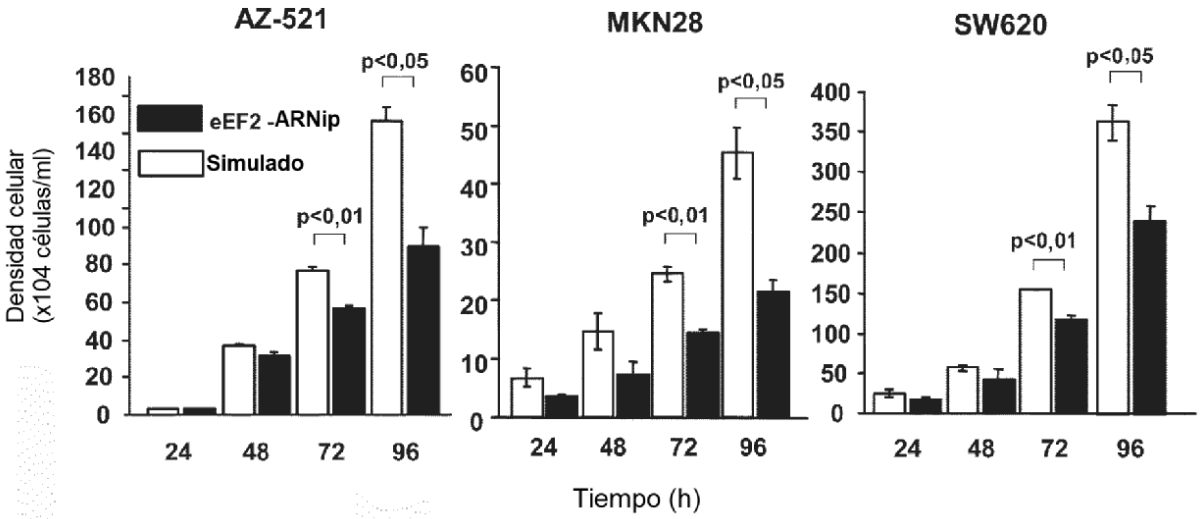
[Fig 5]


Detección de anticuerpo de eEF2 en diversos tipos de cánceres
Título de anticuerpo de eEF2
(Unidades densitométricas)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Positivo
Cáncer de pulmón no microcítico
Cáncer intestinal
Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello
Glioblastoma
Sujetos sanos
(n=72)
(n=42)
(n=20)
(n=18)
(n=17)
Tasa positiva
66,7%
71,8%
60,0%
88,9%

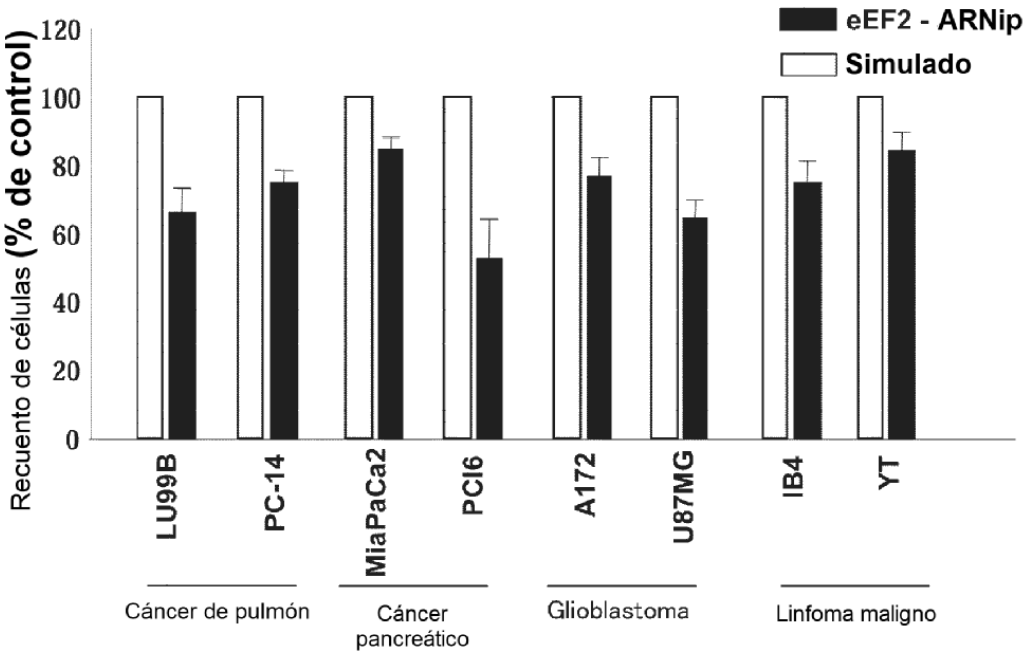
[Fig 6]


Tasa de supervivencia sin la enfermedad
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
10
20
30
40
50 (meses)
Título de anticuerpo eEF2
>4000 (n=11)
2000-4000 (n=26)
<2000 (n=7)

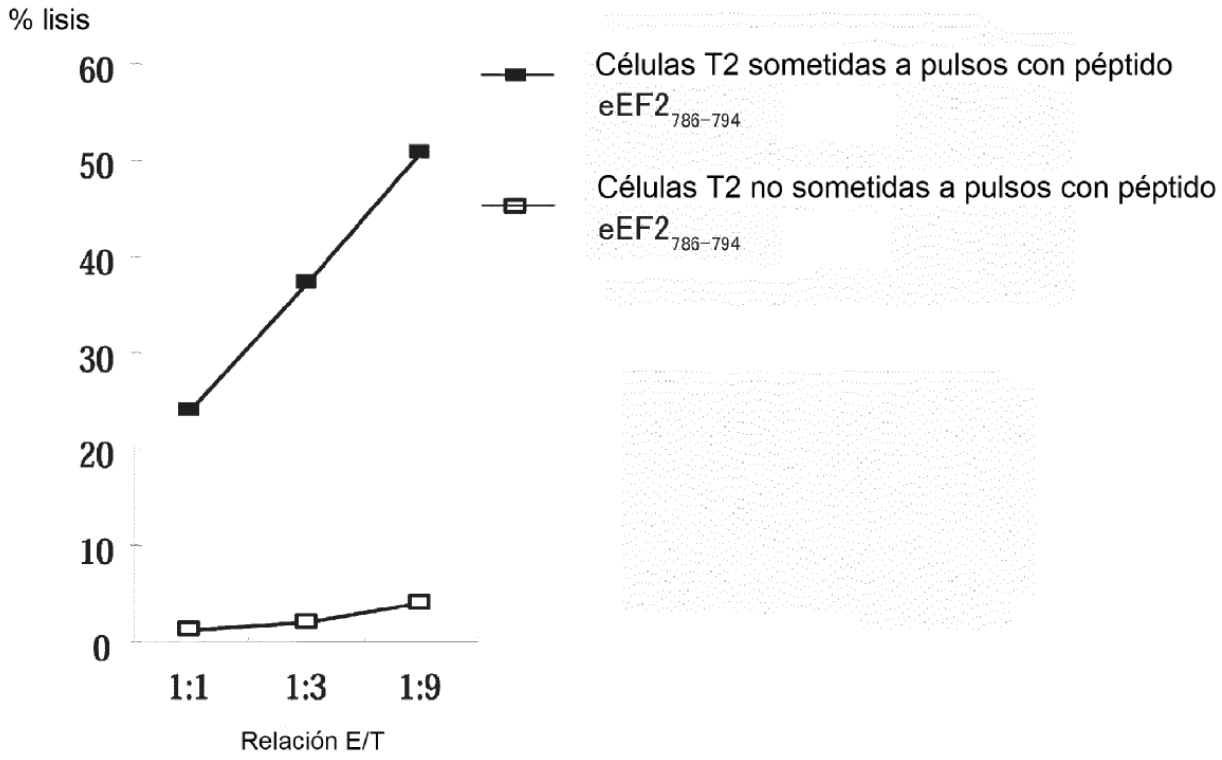
[Fig 7]


AZ-521
MKN28
SW620
Densidad celular (x104 células/ml)
eEF2 -ARNip
Simulado
p<0,05
p<0,01
24
48
72
96
Tiempo (h)

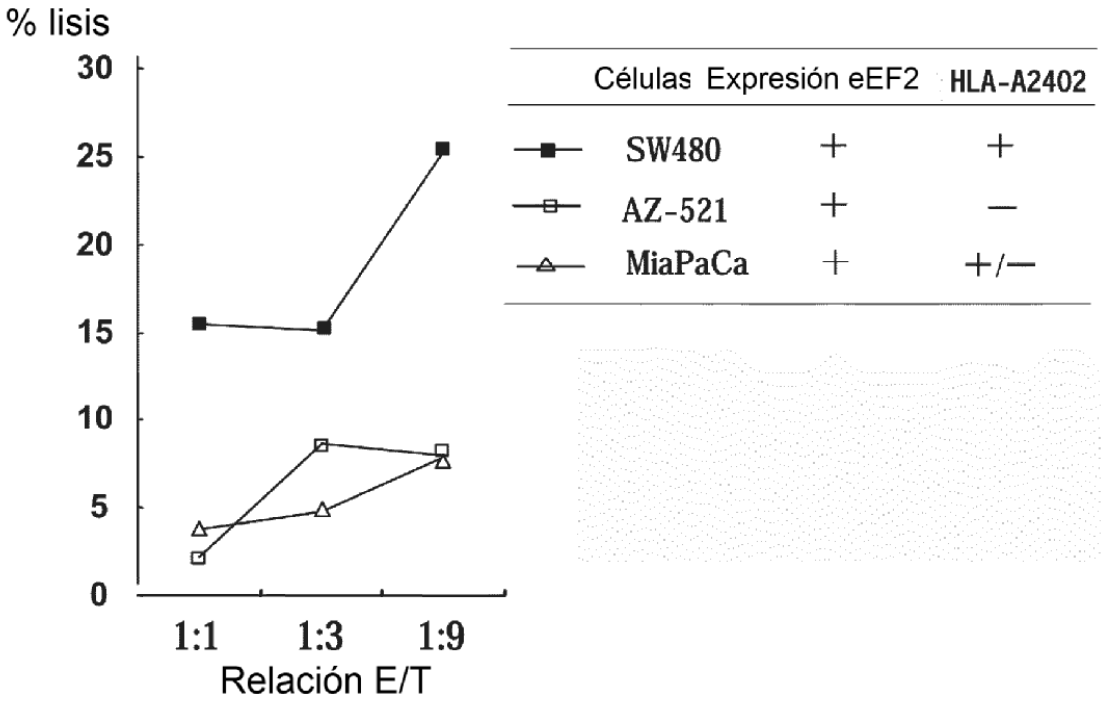
[Fig 8]


eEF2 - ARNip
Simulado
Recuento de células (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
LU99B
PC-14
MiaPaCa2
PCI6
A172
U87MG
IB4
YT
Cáncer de pulmón
Cáncer pancreático
Glioblastoma
Linfoma maligno

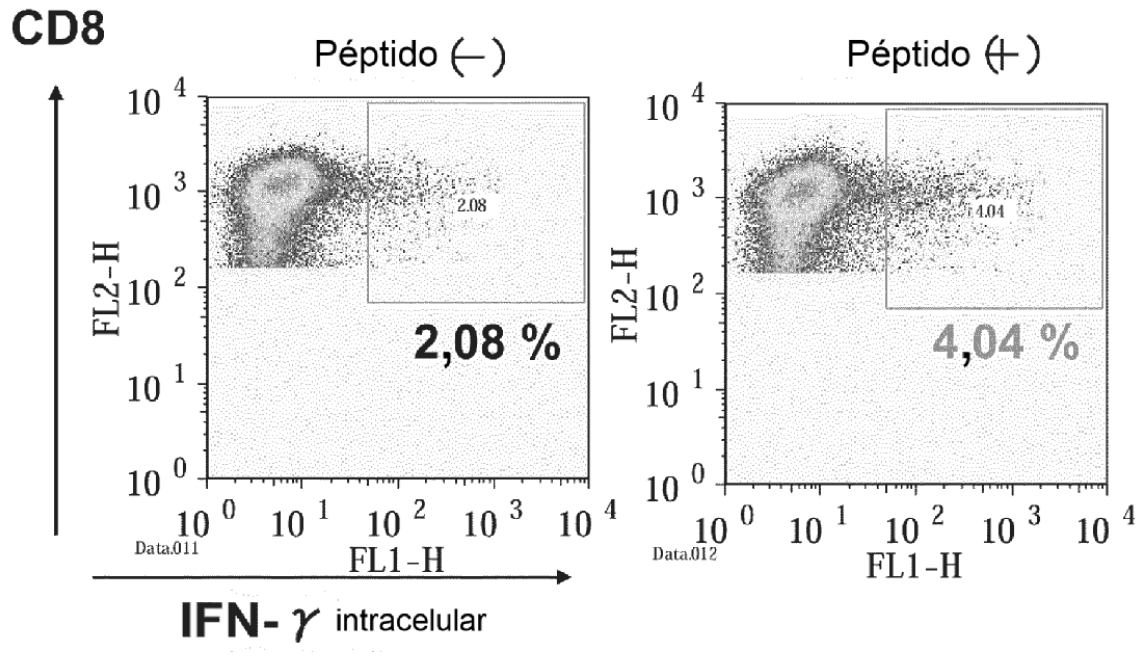
[Fig 9]


% lisis
60
50
40
30
20
10
0
1:1
1:3
1:9
Relación E/T
Células T2 sometidas a pulsos con péptido eEF2786–794
Células T2 no sometidas a pulsos con péptido eEF2786–794

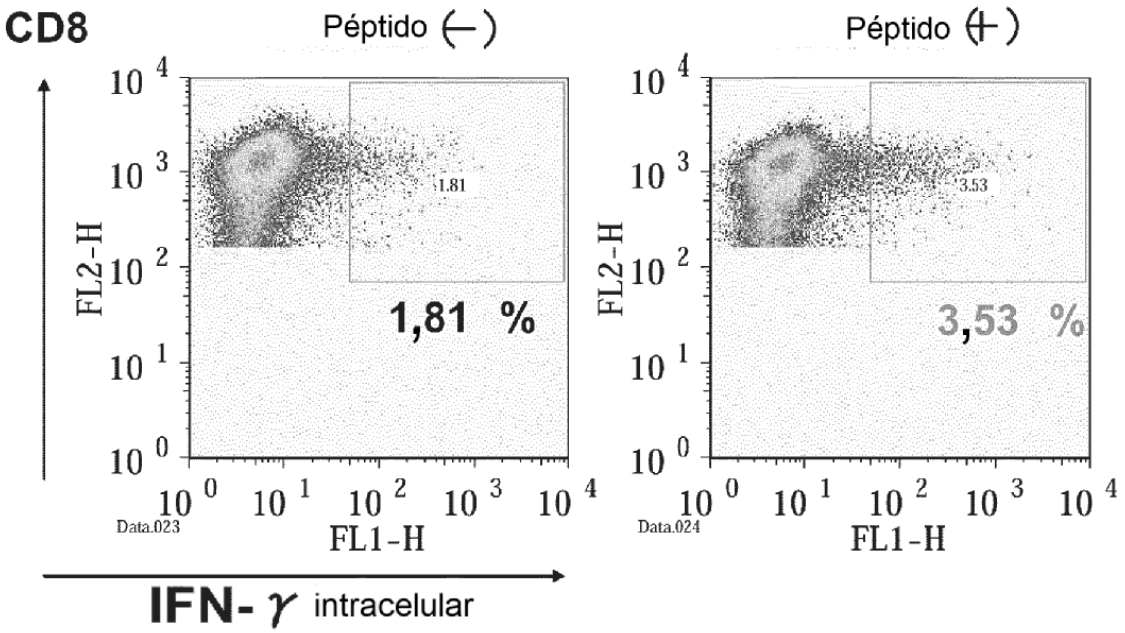
[Fig 10]


% lisis
30
25
20
15
10
5
0
1:1
1:3
1:9
Relación E/T
Células Expresión eEF2 HLA-A2402
SW480 + +
AZ-521 + —
MiaPaCa + +/—

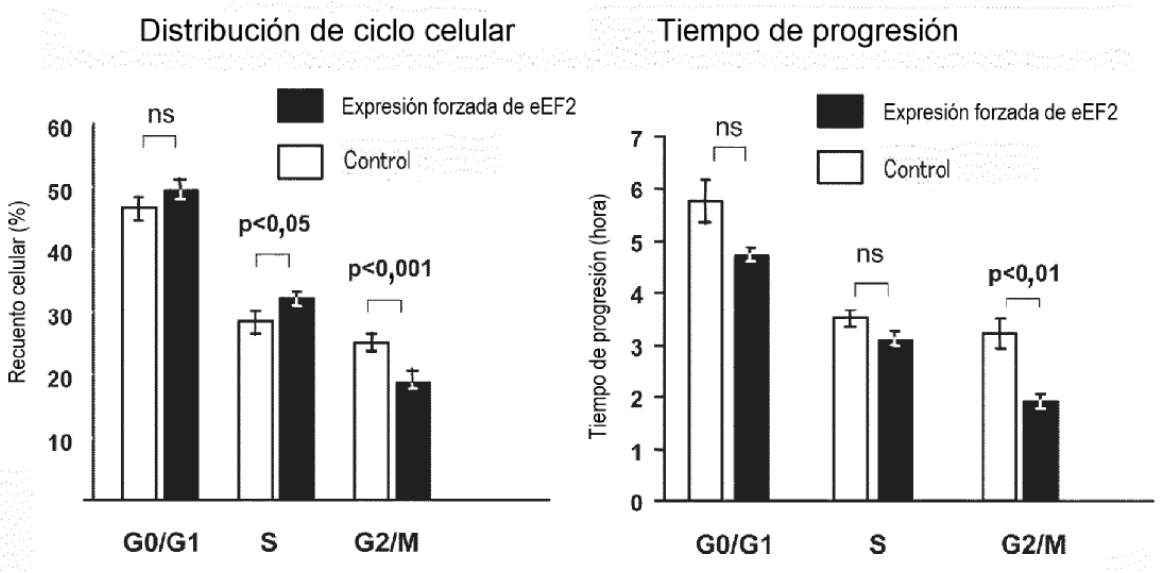
[Fig 11]


CD8
Péptido (—)
Péptido (+)
FL2-H
FL1-H
2.08
2,08 %
4.04
4,04 %
Data.011
Data.012
IFN- γ intracelular

[Fig 12]

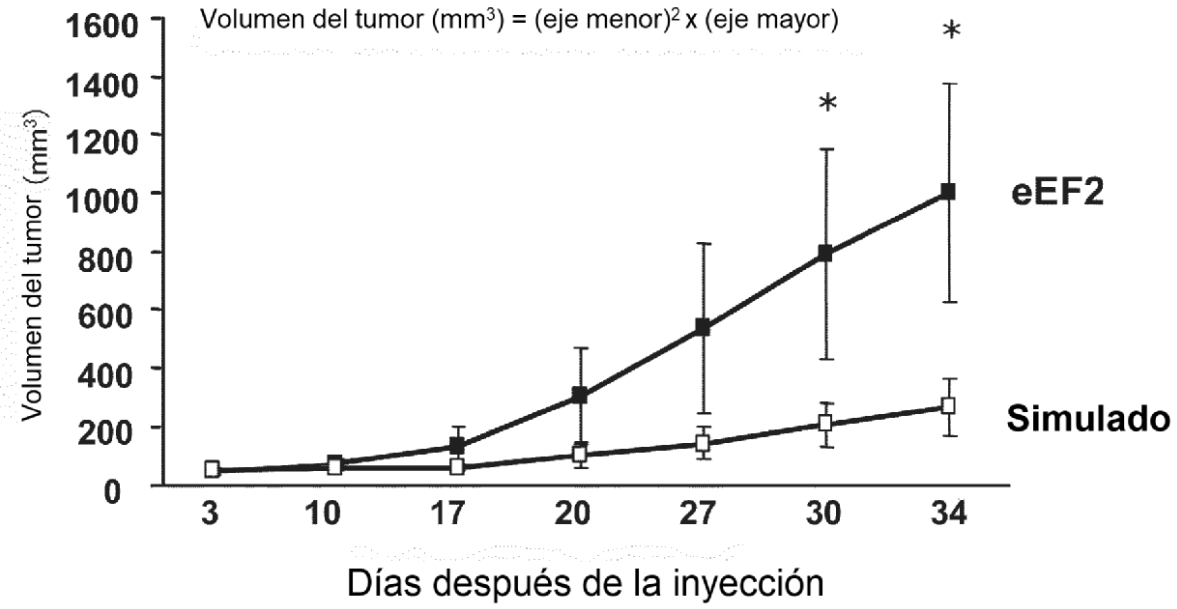


[Fig 13]

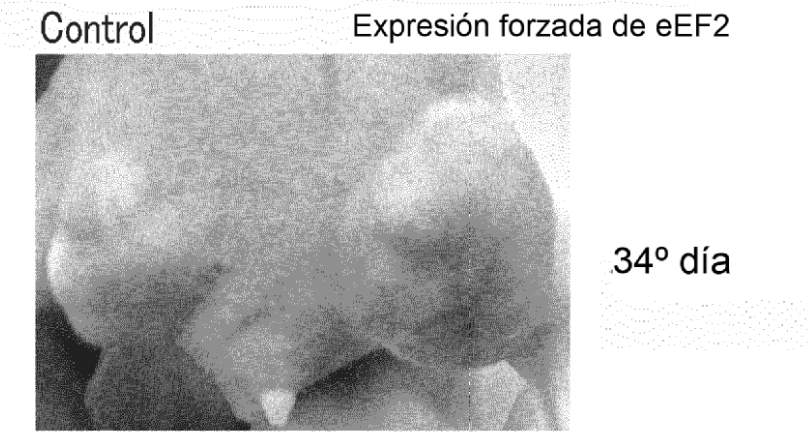


	Control	Expresión forzada de eEF2
Tiempo de duplicación (h)	12,7 h	9,6 h

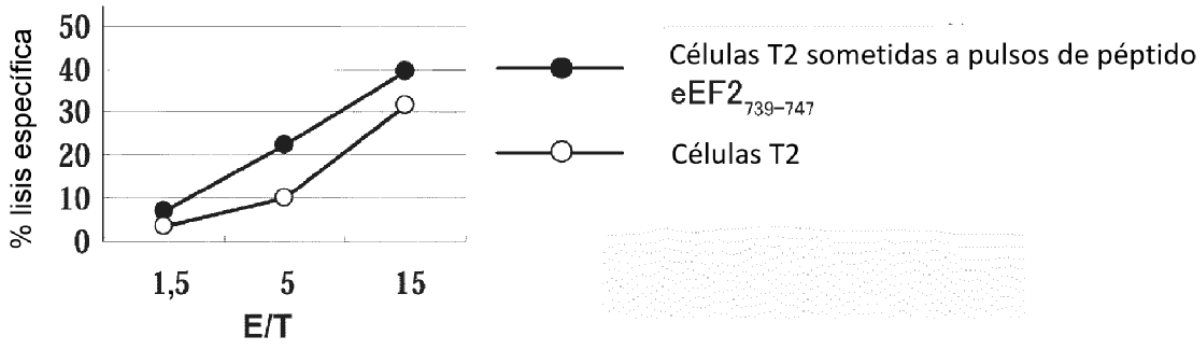
[Fig 14]


Volumen del tumor (mm3) = (eje menor)2 x (eje mayor)
Volumen del tumor (mm3)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
3
10
17
20
27
30
34
*
*
eEF2
Simulado
Días después de la inyección

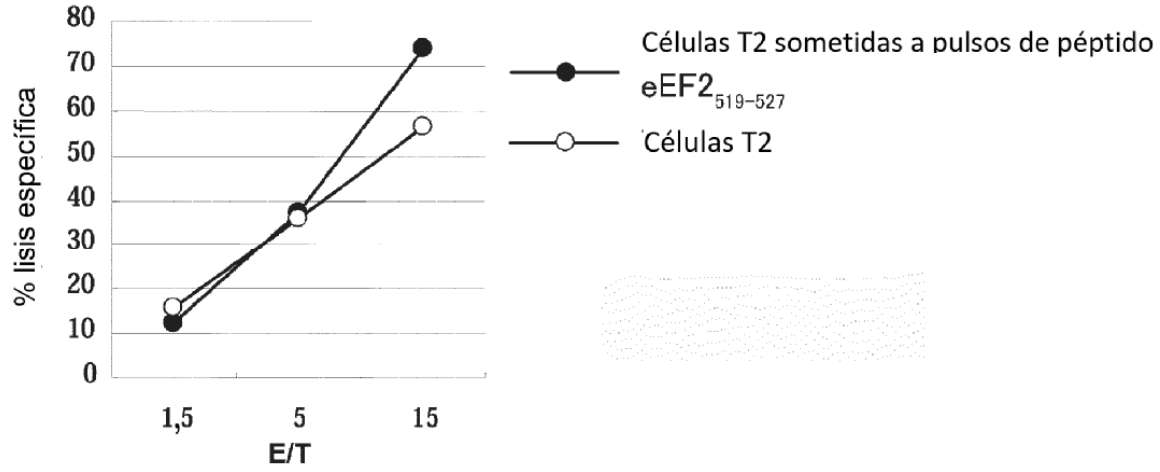
[Fig 15]


Control
Expresión forzada de eEF2
34º día

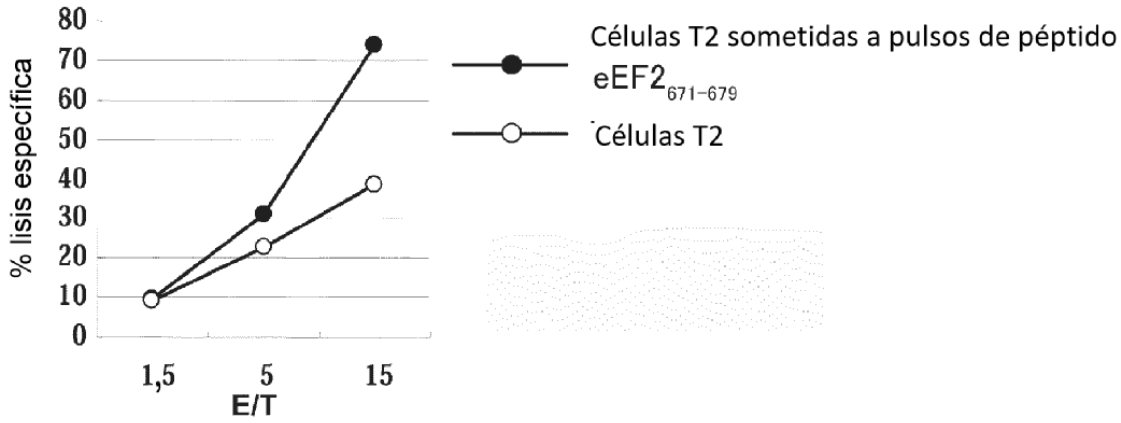
[Fig 16]



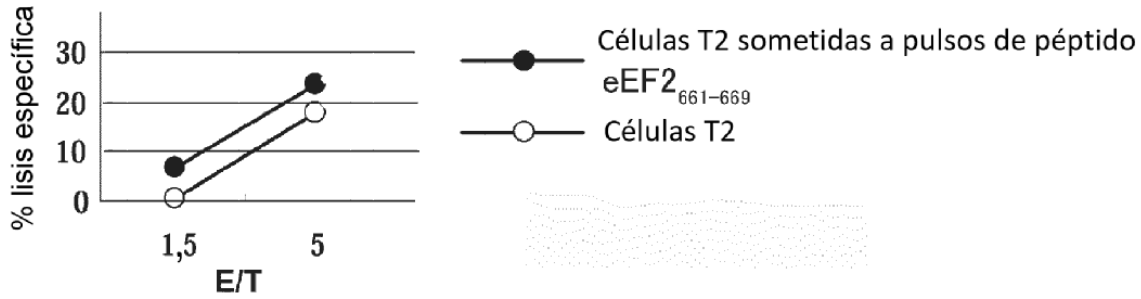
[Fig 17]



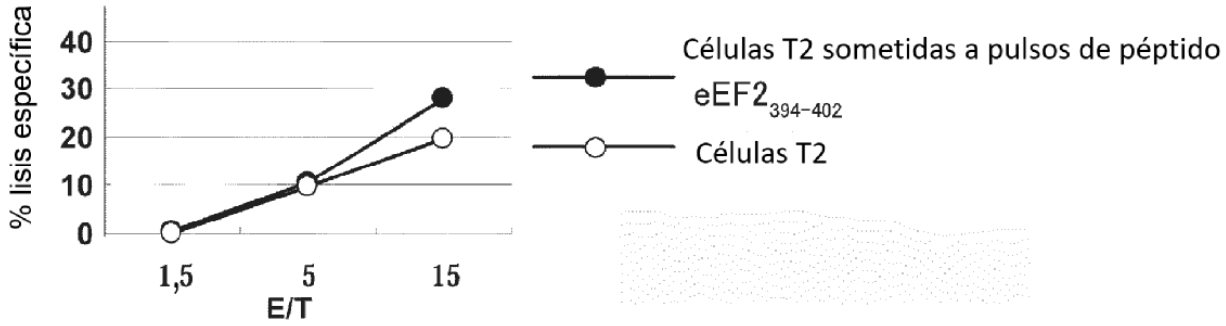
[Fig 18]



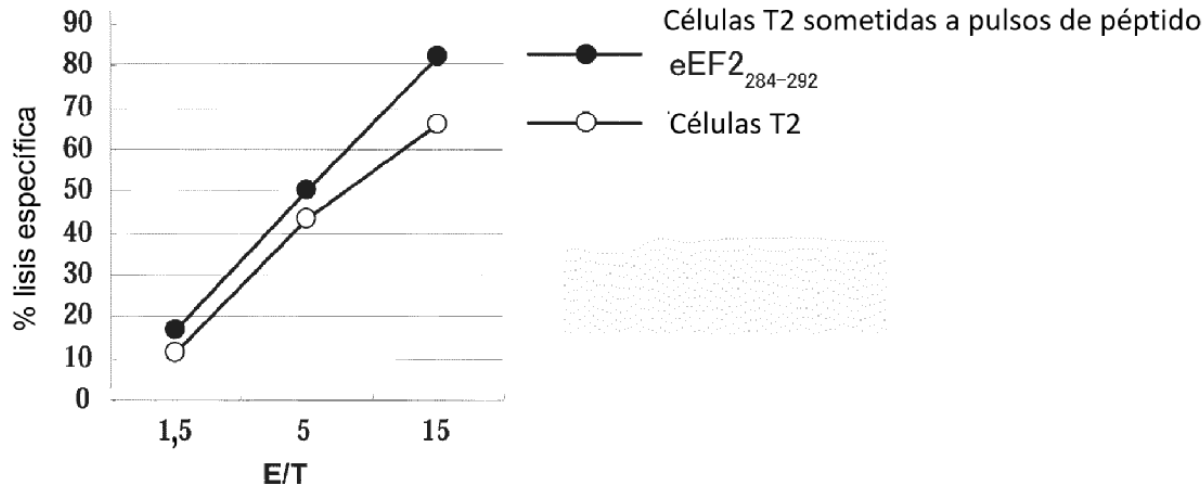
[Fig 19]



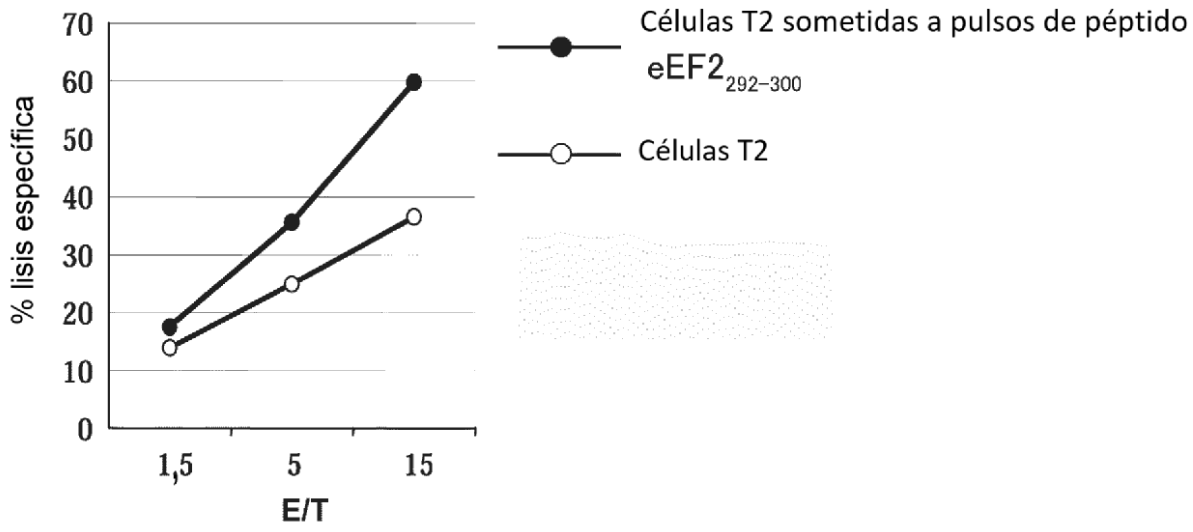
[Fig 20]



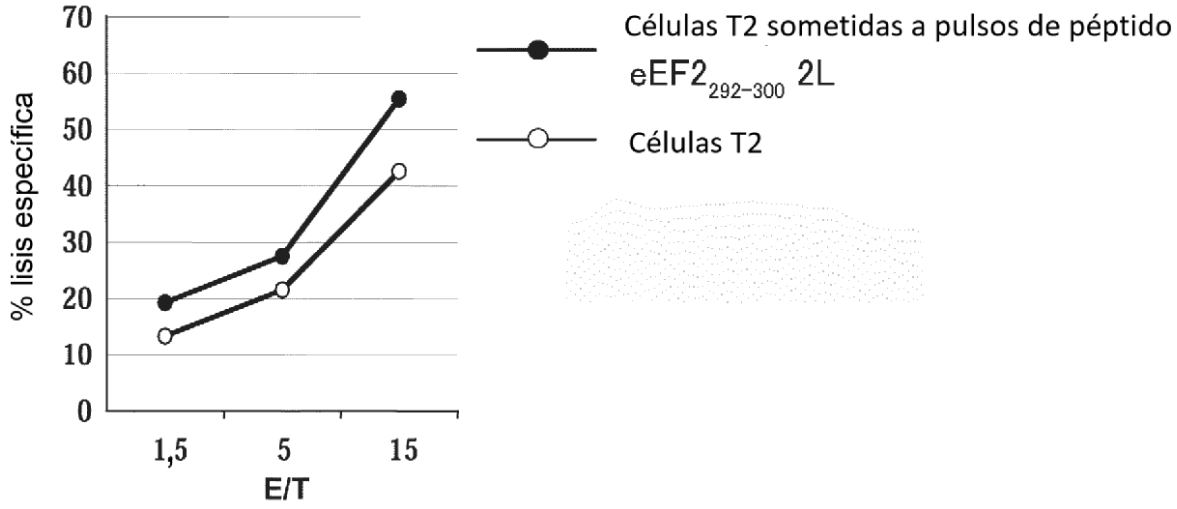
[Fig 21]



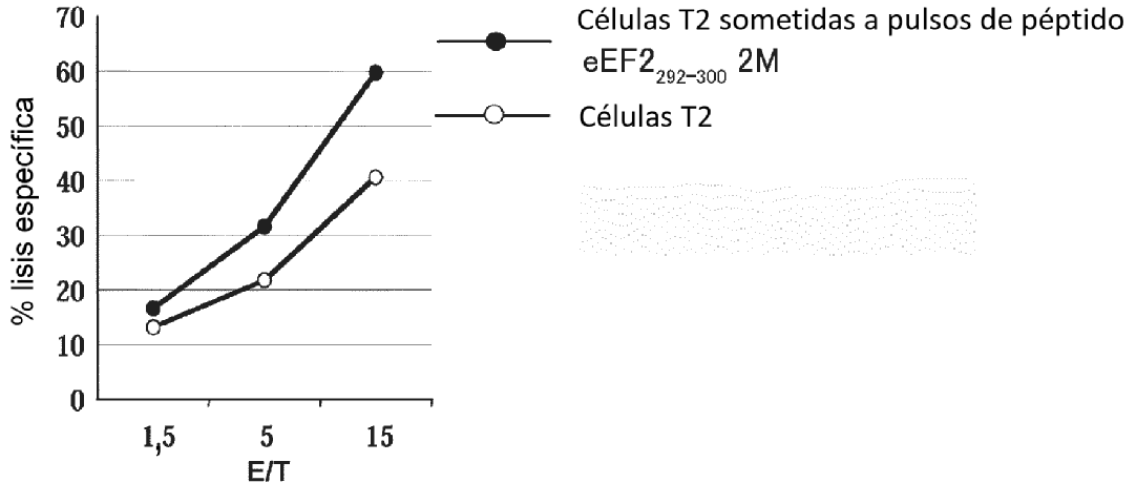
[Fig 22]


70
60
50
40
30
20
10
0
% lisis específica
1,5
5
15
E/T
Células T2 sometidas a pulsos de péptido
eEF2292–300
Células T2

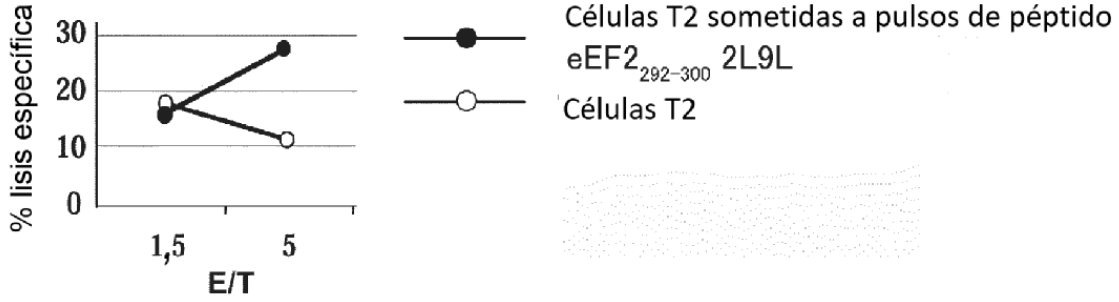
[Fig 23]


70
60
50
40
30
20
10
0
% lisis específica
1,5
5
15
E/T
Células T2 sometidas a pulsos de péptido
eEF2292–300 2L
Células T2

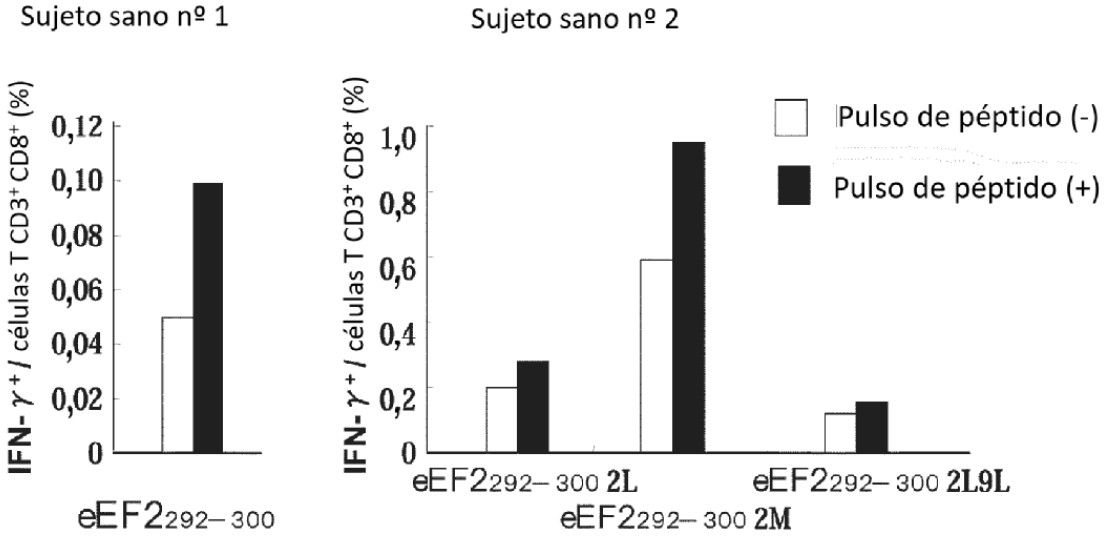
[Fig 24]



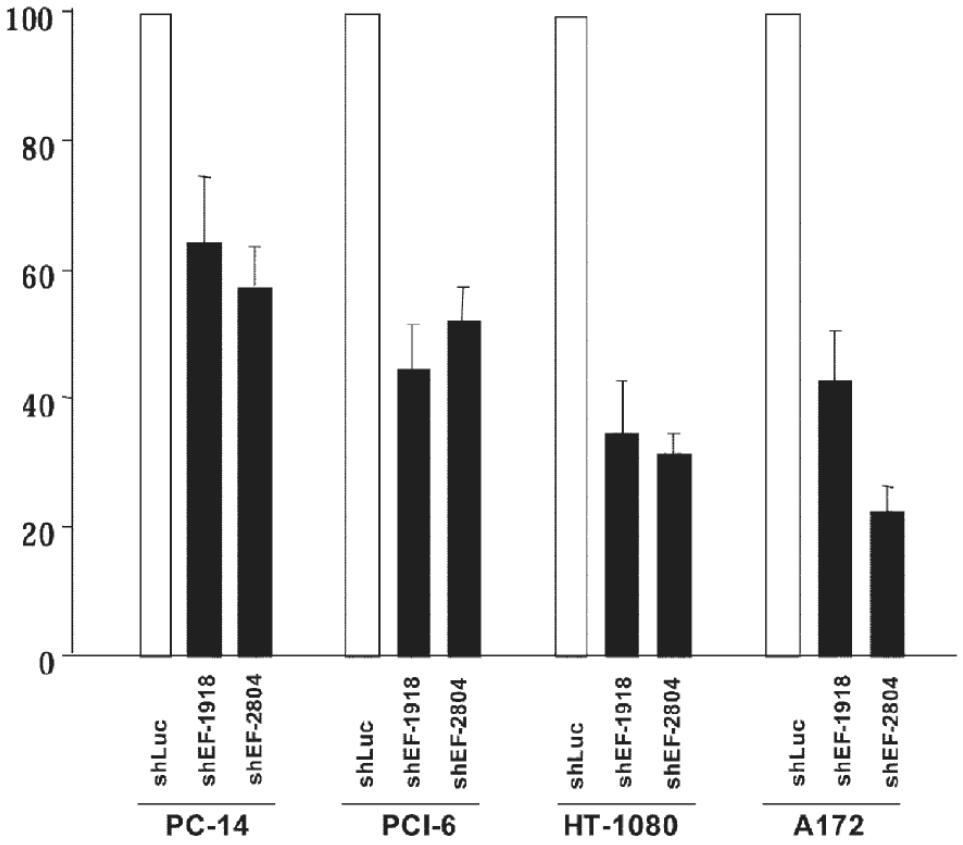
[Fig 25]



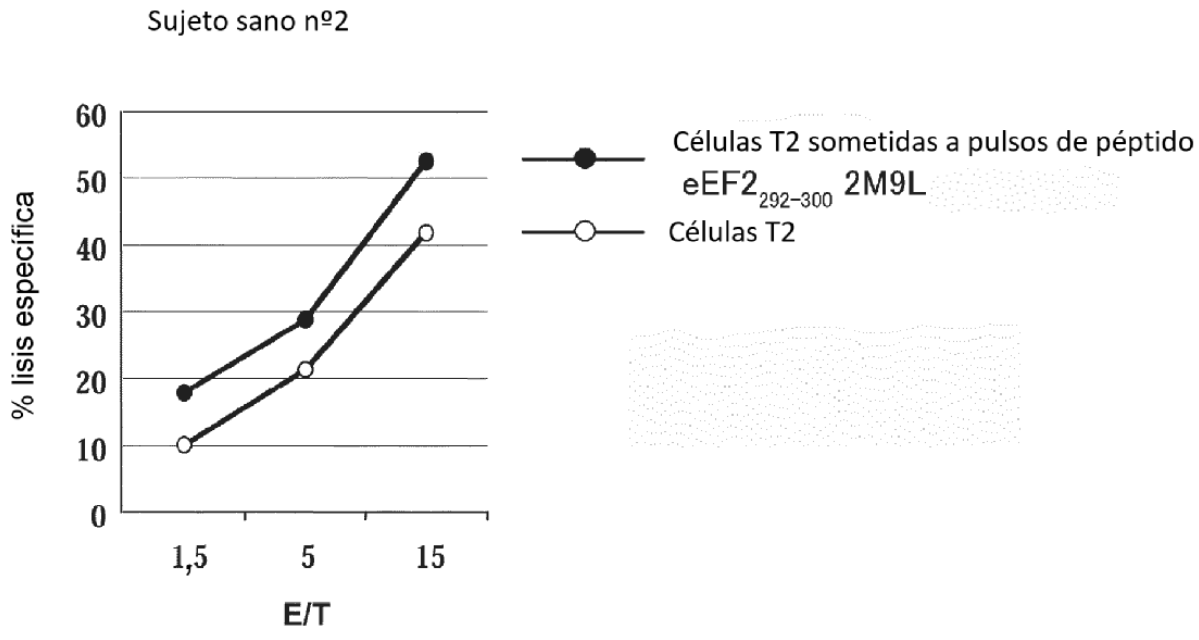
[Fig 26]



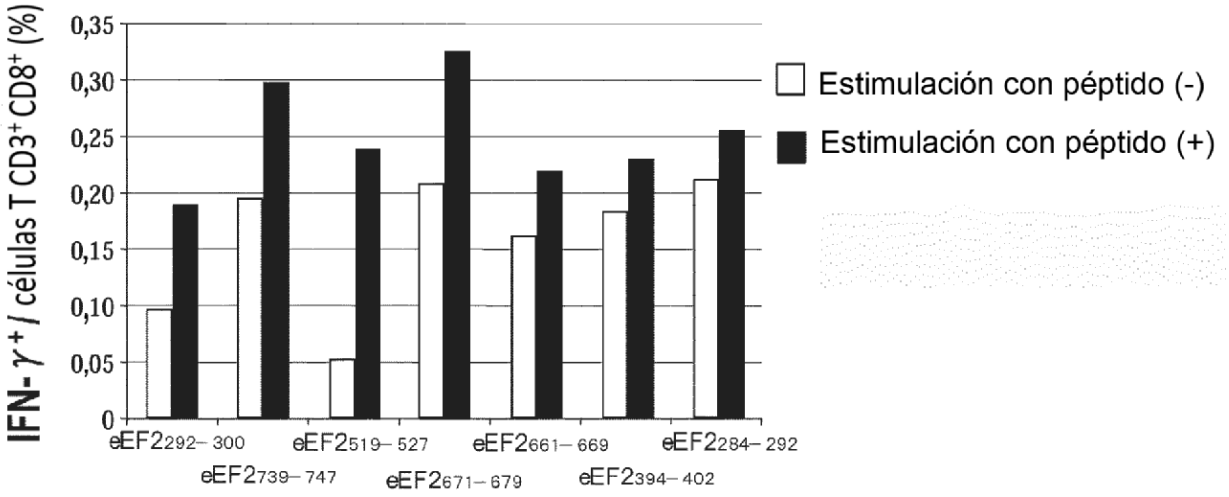
[Fig 27]


100
80
60
40
20
0
shLuc
shEF-1918
shEF-2804
PC-14
PCI-6
HT-1080
A172

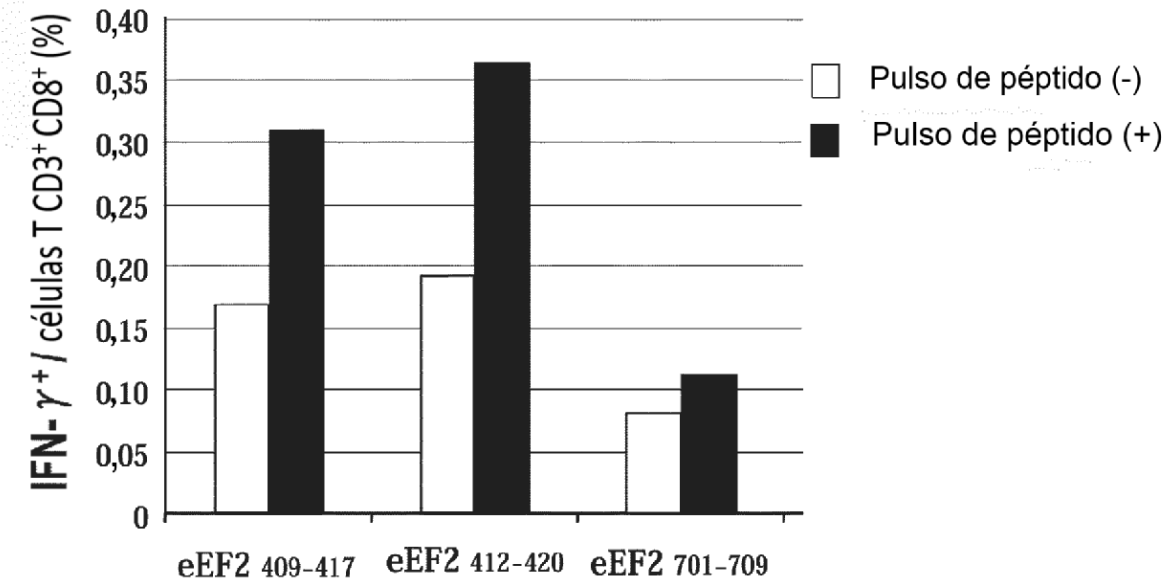
[Fig 28]


Sujeto sano nº2
% lisis especifica
60
50
40
30
20
10
0
1,5
5
15
E/T
Células T2 sometidas a pulsos de péptido
eEF2292–300 2M9L
Células T2

[Fig 29]


IFN-γ+ / células T CD3+ CD8+ (%)
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0
eEF2292–300
eEF2519–527
eEF2661–669
eEF2284–292
eEF2739–747
eEF2671–679
eEF2394–402
Estimulación con péptido (-)
Estimulación con péptido (+)

[Fig 30]


IFN-γ+ / células T CD3+ CD8+ (%)
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0
eEF2 409-417
eEF2 412-420
eEF2 701-709
Pulso de péptido (-)
Pulso de péptido (+)