

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 334**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2010** **E 17163532 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 3208334**

54 Título: **Péptidos CDC45L y vacunas que incluyen los mismos**

30 Prioridad:

26.05.2009 US 217133 P

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

05.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

NISHIMURA, YASUHARU;
TOMITA, YUSUKE;
NAKAMURA, YUSUKE y
TSUNODA, TAKUYA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 746 334 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos CDC45L y vacunas que incluyen los mismos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al campo de la ciencia biológica, más específicamente, al campo de la terapia de cáncer. En particular, la presente invención se refiere a péptidos novedosos que son extremadamente eficaces como vacunas de cáncer y fármacos para su uso en el tratamiento y la prevención de tumores.

Técnica anterior

10 El cáncer de pulmón es la forma más común de cáncer, que representa 1,35 millones de los 10,9 millones de casos nuevos de cáncer al año. También es la causa frecuente de muerte de enfermedades asociadas al cáncer, que representa 1,18 millones de los 6,7 millones de muertes relacionadas con cáncer a nivel mundial (NPL 1). A pesar de las mejoras recientes en la terapia sistémica, tal como quimioterapia y terapia de dirección molecular, el pronóstico de pacientes con cáncer de pulmón de etapa avanzada sigue siendo muy deficiente (NPL 2). El cáncer de pulmón vuelve a aparecer en el 50 % de los pacientes después de la cirugía y menos del 25 % de los pacientes responde a la quimioterapia sistémica. Por consiguiente, se requieren urgentemente modalidades de tratamiento más eficaces, y 15 la inmunoterapia representa un enfoque prometedor para futuras terapias de cáncer de pulmón (NPL 3-5).

20 El éxito de las vacunas de cáncer terapéuticas se basa por último lugar en la identificación de antígenos inmunogénicos que se expresan en exceso en tumores con respecto a tejidos normales. La inducción eficaz de linfocitos T citotóxicos (CTL) mediante antígeno asociado a tumor (TAA) ha mostrado resultados prometedores (NPL 6-7). Recientemente, el desarrollo de tecnologías de micromatrices de ADNc, acopladas a la información de genoma, ha proporcionado perfiles integrales de la expresión génica de células malignas, que entonces puede compararse con los de las células normales (NPL 8). La pauta de expresión génica con tecnologías de micromatrices de ADNc constituye un enfoque eficaz para la identificación de nuevos TAA útiles para diagnóstico de cáncer e inmunoterapia (NPL 9-12).

25 Aunque se han publicado diversos TAA candidato expresados en cáncer de pulmón (NPL 13-14), es importante identificar múltiples TAA expresados en exceso en un cáncer determinado para desarrollar inmunoterapia de cáncer mediada por linfocitos T más eficaz (NPL 15).

30 CDC45L (ciclo de división celular tipo 45) es una proteína celular esencial que funciona tanto en el inicio como en la prolongación de la replicación de ADN para asegurar que el ADN cromosómico se replique únicamente una vez por ciclo celular (NPL 16-19). CDC45L está altamente conservado entre todos los eucariotas, y una interrupción dirigida de este gen origina letalidad embrionaria en ratones (NPL 20). En humanos adultos, la gran mayoría de las células tiene división celular diferenciada e interrumpida, y únicamente una pequeña población de células está proliferando en algunos tejidos de auto-renovación (NPL 21). Así, aunque CDC45L esté ausente en células humanas quiescentes, diferenciadas terminalmente y senescentes a largo plazo, está presente a través de todo el ciclo celular de células de proliferación de cáncer (NPL 18). Por consiguiente, la expresión de CDC45L está fuertemente 35 asociada a poblaciones de células de proliferación, y así se considera que es un candidato prometedor para un marcador de proliferación novedoso en la biología de células de cáncer (NPL 18, 22). Sin embargo, aún no ha sido investigado completamente la utilidad de CDC45L como diana para la inmunoterapia de cáncer.

40 El documento WO2007/013671 desvela el uso de la expresión en exceso de CDC45L en cáncer de esófago como diana terapéutica. Más específicamente, el documento WO2007/013671 confirma la expresión en exceso de CDC45L en cáncer de esófago y la supresión de la proliferación de células de cáncer de esófago inhibiendo su expresión.

45 Tomita et al. (2009) desvelan cuatro tipos de epítopes de CTL restringidos por HLA-A24 derivados de CDC45L y que la inducción de CTL resultante mostró actividad citotóxica contra la célula de cáncer de pulmón Lu99 en un modo específico de CDC45L. Tomita et al (2009) no contienen datos experimentales específicos para soportar estas declaraciones.

Lista de referencias**Bibliografía no de patente**

- [NPL 1] Parkin DM et al. CA Cancer J Clin 2005;55:74-108
- [NPL 2] Bunn PA, Jr. et al. Conclusion. Oncologist 2008;13 Suppl 1:37-46
- 50 [NPL 3] Ruttinger D et al. Surg Oncol Clin N Am 2007;16:901-18
- [NPL 4] Hirschowitz EA et al. Proc Am Thorac Soc 2009;6:224-32
- [NPL 5] Romero P et al. Clin Lung Cancer 2008;9 Suppl 1:S28-36

[NPL 6] Stevanovic S et al. Nat Rev Cancer 2002;2:514-20

[NPL 7] Brichard VG et al. Vaccine 2007;25 Suppl 2:B61-71

[NPL 8] Hasegawa S et al. Cancer Res 2002;62:7012-7

[NPL 9] Mathiassen S et al. Eur J Immunol 2001;31:1239-46

5 [NPL 10] Schmidt SM et al. Cancer Res 2004;64:1164-70

[NPL 11] Yamabuki T et al. Int J Oncol 2006;28:1375-84

[NPL 12] Imai K et al. Clin Cancer Res 2008;14:6487-95

[NPL 13] Harao M et al. Int J Cancer 2008;123:2616-25

[NPL 14] Yokomine K et al. Int J Cancer 2009;126:2153-63

10 [NPL 15] Fukushima S et al. J Immunother 2009;32:219-31

[NPL 16] Aparicio T et al. Nucleic Acids Res 2009;37:2087-95

[NPL 17] Saha P et al. J Biol Chem 1998;273:18205-9

[NPL 18] Pollok S et al. FEBS J 2007;274:3669-84

[NPL 19] Bauerschmidt C et al. Genes Cells 2007;12:745-58

15 [NPL 20] Pollok S et al. Biochem Biophys Res Commun 2007;362:910-5

[NPL 21] Hall PA et al. Development 1989;106:619-33

[NPL 22] Li JN et al. BMC Cancer 2008;8:395

[NPL 23] Tomita et al., Proceedings of the 13th. Annual Meeting of the Japanese Society of Cancer Immunology, 20 de mayo de 2009.

20 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de péptidos que pueden servir de dianas de inmunoterapia. Debido a que los TAA son algunas veces percibidos por el sistema inmune como "propios", y por consiguiente frecuentemente no tienen inmunogenicidad, el descubrimiento de dianas adecuadas es de extrema importancia. Como se observó anteriormente, CDC45L (una secuencia de aminoácidos típica y una secuencia de genes se muestran en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 17, respectivamente, y las secuencias también están disponibles del N° de acceso de GenBank NM_003504) ha sido identificado como regulado por incremento en cánceres, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal. Por lo tanto, CDC45L es un candidato para la dirección de inmunoterapia de cáncer/tumor.

La presente invención se refiere además a la identificación de péptidos de epítipo específicos de productos génicos de CDC45L que poseen la capacidad de inducir CTL específicos para CDC45L. Como se trata en detalle más adelante, se estimularon células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de un donante sano usando péptidos candidatos de unión a HLA-A*2402 o HLA-A*0201 derivados de CDC45L. Entonces se establecieron líneas CTL con citotoxicidad específica contra células diana HLA-A24 o HLA-A2 positivas pulsadas con cada uno de los péptidos candidatos. Estos resultados demuestran que estos péptidos son péptidos de epítipo restringidos por HLA-A24 o HLA-A2 que pueden inducir respuestas inmunitarias potentes y específicas contra células que expresan CDC45L. Además, los resultados indican que CDC45L es fuertemente inmunogénico y que los epítopes de los mismos son dianas eficaces para la inmunoterapia de cáncer/tumor.

Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención proporcionar péptidos aislados que se unen al antígeno HLA, particularmente los derivados de CDC45L (SEQ ID NO: 18) o fragmentos inmunológicamente activos de los mismos. Se espera que estos péptidos tengan inducibilidad de CTL y, así, puedan usarse para inducir CTL *ex vivo* o para administrarse a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres tales como tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar, cáncer colorrectal y similares. Los péptidos preferidos son nonapéptidos o decapeptidos, y más preferentemente, los que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada

de entre SEQ ID NO: 1 a 16. De estos, el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 mostró fuerte inducibilidad de CTL y así es el más preferido.

Los péptidos de la presente invención engloban aquellos en los que uno o dos aminoácidos están sustituidos, mientras que los péptidos modificados resultantes retengan la inducibilidad de CTL original. La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican uno cualquiera de los péptidos de la presente invención. Estos polinucleótidos pueden usarse para inducir APC con inducibilidad de CTL y pueden administrarse a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres muy parecidas a las de los presentes péptidos.

Cuando se administran a un sujeto, los presentes péptidos se presentan preferentemente en la superficie de APC para inducir CTL que dirigen los péptidos respectivos. Por consiguiente, es otro objetivo de la presente invención proporcionar composiciones o agentes que induzcan CTL, tales como composiciones o sustancias que incluyen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención. La presente invención contempla además composiciones o agentes que incluyen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención formulados para el tratamiento y/o la profilaxis de cánceres, además de la prevención de reaparición posoperatoria de los mismos, incluyendo tales cánceres, pero no se limitan a, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal. Así, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas o agentes para el tratamiento y/o la profilaxis de cánceres, y/o la prevención de la reaparición posoperatoria de los mismos, incluyendo tales composiciones farmacéuticas o agentes uno o más de los péptidos o polinucleótidos de la presente invención. Además, y/o en lugar del péptido o polinucleótido anteriormente mencionado, las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención pueden incluir opcionalmente como principios activos APC o exosomas que presentan uno o más de los presentes péptidos de la presente invención.

Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención pueden inducir APC que presentan en su superficie un complejo de un antígeno HLA y un presente péptido, por ejemplo, poniendo en contacto APC derivadas de un sujeto con un péptido de la presente invención o introduciendo un polinucleótido que codifica un péptido tal en las APC. Tales APC tienen alta inducibilidad de CTL contra péptidos diana y encuentran uso en la inmunoterapia de cáncer. Por consiguiente, la presente invención engloba los métodos de inducción de APC con inducibilidad de CTL y las APC obtenidas por tales métodos.

La presente invención también proporciona un método de inducción de CTL que incluye la etapa de co-cultivar células CD8 positivas con APC o exosomas que presentan un péptido de la presente invención en su superficie. Alternativamente, el método puede incluir la etapa de introducir un gen que incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido de subunidad de receptor de linfocitos T (TCR) capaz de unirse a un péptido de la presente invención. Los CTL obtenidos por tales métodos pueden encontrar uso en el tratamiento y/o la prevención de cánceres, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal. Por tanto, la presente invención comprende los CTL obtenidos por los presentes métodos.

Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar métodos de inducción de una respuesta inmunitaria contra cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, incluyendo tales métodos la etapa de administrar composiciones o agentes que incluyen polipéptidos CDC45L de la presente invención o un fragmento inmunológicamente activo de los mismos, polinucleótidos que codifican los polipéptidos CDC45L de la presente invención, o exosomas o las APC que presentan tales polipéptidos CDC45L.

Específicamente, la presente descripción proporciona lo siguiente [1] a [22];

[1] Un péptido aislado que se une a un antígeno HLA y que tiene inducibilidad de linfocitos T citotóxicos (CTL), en el que el péptido se deriva de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo,

[2] El péptido aislado de [1], en el que el antígeno HLA es HLA-A24 o A2,

[3] El péptido aislado de [1] o [2], en el que dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) SEQ ID NO: 4, 2, 3, 7 y 12; y

(b) SEQ ID NO: 4, 2, 3, 7 y 12, en la que 1, 2 o varios aminoácidos están sustituidos, insertados, deletados y/o añadidos,

[4] El péptido aislado de una cualquiera de [1] a [3], en el que el péptido tiene una o ambas de las siguientes características:

- (a) el segundo aminoácido del extremo N está modificado o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, metionina y triptófano; y
- (b) el aminoácido del extremo C está modificado o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano y metionina,
- 5 [5] El péptido aislado de una cualquiera de [1] a [3], en el que el péptido tiene una o ambas de las siguientes características:
- (a) el segundo aminoácido del extremo N está modificado o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina y metionina; y
- 10 (b) el aminoácido del extremo C está modificado o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina y leucina,
- [6] El péptido aislado de una cualquiera de [1] a [5], en el que el péptido es un nonapéptido o decapeptido,
- [7] Un polinucleótido aislado que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [6],
- 15 [8] Una composición para inducir CTL, en la que la composición comprende uno o más del (de los) péptido(s) expuestos en uno cualquiera de [1] a [6], o uno o más del (de los) polinucleótido(s) expuestos en [7],
- [9] Una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis de cánceres, y/o la prevención de la reaparición posoperatoria de los mismos, en la que la composición comprende uno o más del (de los) péptido(s) expuestos en uno cualquiera de [1] a [6], o uno o más del (de los) polinucleótido(s) de [7],
- 20 [10] La composición farmacéutica de [9] formulada para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A2,
- [11] La composición farmacéutica de [9] o [10] formulada para el tratamiento de cáncer,
- [12] Un método de inducción de una célula presentadora de antígenos (APC) con inducibilidad de CTL que comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- 25 (a) poner en contacto una APC con el péptido de uno cualquiera de [1] a [6] *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, y
- (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [6] en una APC,
- [13] Un método de inducción de CTL, en el que el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- 30 (a) co-cultivar linfocitos T CD8 positivos con APC, que presentan en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [6];
- (b) co-cultivar linfocitos T CD8 positivos con exosomas, que presentan en su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de uno cualquiera de [1] a [6]; y
- 35 (c) introducir un gen que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de subunidad de receptor de linfocitos T (TCR) capaz de unirse al péptido de uno cualquiera de [1] a [6] en un linfocito T,
- [14] Una APC aislada que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [6],
- [15] La APC de [14], que se induce por el método de [12],
- [16] Un CTL aislado que se dirige a cualquiera de los péptidos de [1] a [6],
- 40 [17] El CTL de [16], que se induce por el método de [13],
- [18] Un método de inducción de una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto, en el que el método comprende administrar al sujeto una composición que comprende uno o más péptido(s) de [1] a [6], uno o más fragmento(s) inmunológicamente activo(s) del mismo, o uno o más polinucleótido(s) que codifica(n) el péptido o el fragmento,
- 45 [19] Un anticuerpo o fragmento del mismo contra cualquiera de los péptidos de [1] a [6],

[20] Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los péptidos de [1] a [6],

[21] Una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión según [20], y

[22] Un kit de diagnóstico que comprende cualquiera de los péptidos de [1] a [6], el nucleótido de [7] o el anticuerpo de [19].

La aplicabilidad de la presente invención se extiende a cualquiera de varias enfermedades que se relacionan con, o que surgen de, la expresión en exceso de CDC45L, tal como cáncer, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal.

Además de lo anterior, otros objetivos y características de la invención llegarán a ser más completamente evidentes cuando la siguiente descripción detallada se lea conjuntamente con las figuras y ejemplos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Diversos aspectos y aplicaciones de la presente invención serán evidentes para el experto tras la consideración de la breve descripción de las figuras y la descripción detallada de la presente invención y sus realizaciones preferidas que siguen.

[Figura 1 a-d] La Figura 1 está compuesta de una serie de fotografías, A a F, que representan los resultados de los análisis de ARNm de CDC45L expresados en tejidos normales humanos, líneas de células de cáncer y tejidos de cáncer. Partes A, B: Análisis de RT-PCR y de transferencia Northern de ARNm de CDC45L expresado en diversos tejidos normales. Parte C: Análisis de RT-PCR de ARNm de CDC45L expresado en diversas líneas de células de cáncer. Parte D: Análisis de RT-PCR de ARNm de CDC45L expresado en tejidos de cáncer de pulmón y tejidos de pulmón normal adyacentes.

[Figura 1 e-f] Parte E: Análisis de RT-PCR de ARNm de CDC45L expresado en diversas líneas de células de cáncer derivadas de cánceres gástrico, hepatobiliar, de mama, páncreas y colorrectal. Parte F: Análisis inmunohistoquímico de la proteína CDC45L expresada en adenocarcinoma, carcinoma escamoso, carcinoma de células pequeñas, de pulmón normal, de testículos y piel normal (aumento original X400). Las señales de tinción positiva se observan en marrón. Barras de escala, 50 micro-m.

[Figura 2] La Figura 2 representa el protocolo para la inducción de CTL específicos de CDC45L de CMSP. Las CMSP se aislaron de donantes, y los linfocitos T CD8⁺ y las células CD14⁺ se aislaron usando microperlas recubiertas de mAb-anti-CD8 o mAb anti-CD14, respectivamente, de las CMSP, de los donantes sanos HLA-A24 positivos y pacientes con cáncer de pulmón. Se obtuvieron DC de células CD14⁺, a través del cultivo en presencia de GM-CSF e IL-4 durante 5 días. Las DC se pulsaron con péptidos de unión de HLA-A24 en presencia de beta-2-microglobulina durante 2 horas a 37 °C. Entonces se irradiaron estas DC pulsadas con péptido y se mezclaron a la relación 1:20 con linfocitos T CD8⁺ autólogos para generar CTL reactivos con péptidos. Las células se cultivaron con IL-7 en AIM-V complementado con 2 % de auto-suero en el día 0 y estos cultivos se complementaron con IL-2 en el día 2. Se llevaron a cabo dos estimulaciones semanales adicionales con blastos de PHA autólogos cargados con péptido en los días 7 y 14. Se llevaron a cabo ensayos ELISPOT de INF-gamma, movilización de CD107a y liberación de ⁵¹Cr 6 días después de la tercera ronda de estimulación con péptido de linfocitos T CD8⁺.

[Figura 3] La Figura 3 está compuesta de una serie de gráficos de barras, A a C, que representan la respuesta de CTL a péptidos derivados de CDC45L en donantes sanos. Partes A, B, C: Ensayo ELISPOT de CTL reactivos con péptidos CDC45L generados de CMSP de donantes sanos HLA-A24 positivos (A, C, donante sano 1; B, donante sano 4). Los linfocitos T CD8⁺ se estimularon con DC derivadas de monocitos autólogos (día 0) y blastos de PHA autólogos (días 7 y 14) pulsados con una mezcla de 4 de 16 péptidos candidatos (SEQ ID NO: 1 a 16). Los CTL se recolectaron en el día 20, y los CTL que producen IFN-gamma se detectaron por ensayo ELISPOT. Las barras indican el número de manchas de IFN-gamma cuando las líneas de CTL fueron re-estimuladas con células C1R-A2402 pulsadas con péptidos derivados de CDC45L (barras blancas) o péptidos VIH-A24 irrelevantes (barras negras). Relación de célula efectora con respecto a diana de 10:1. Los datos se indican como la media +/- DE de ensayos por triplicado. Se muestra un representante de dos experimentos independientes con resultado similares para cada donante.

[Figura 4] La Figura 4 está compuesta de una serie de paneles que representan el nivel de CD107a expuesto sobre la superficie celular de linfocitos T CD8⁺ después de la estimulación de antígeno. Todos los péptidos se usaron a una concentración final de 1 micro-g/ml. Los eventos mostrados son asistidos por linfocitos T CD8⁺. Paneles superiores y medios: estimulados con los péptidos derivados de CDC45L relacionados. Paneles inferiores: estimulados con el péptido VIH-A24 irrelevante. Los números dentro de los gráficos indican el porcentaje de la población celular con las características de cuadrante (linfocitos T CD8⁺ CD107a⁺). Cada carril es un representante de dos experimentos independientes con resultados similares.

[Figura 5a-c] La Figura 5 está compuesta de una serie de gráficas, A a D, que ilustran la inducción de CTL humanos específicos de CDC45L de CMSP de los pacientes con cáncer de pulmón HLA-A24 positivos. Parte A: Ensayo ELISPOT de CTL inducidos de pacientes con cáncer de pulmón co-cultivados con células diana pulsadas con el péptido CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2), CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3), CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4), CDC45L-A24-9-370-7 (SEQ ID NO: 7) o CDC45L-A24-10-556-12 (SEQ ID NO: 12). La producción de IFN-gamma estimulada con células C1R-A*2402 pulsadas con péptido fue significativamente mayor que la estimulada con células C1R-A*2402 pulsadas con péptido del VIH. Las barras indican el número de manchas de IFN-gamma cuando las líneas CTL generadas se re-estimularon con células C1R-A2402 pulsadas con péptidos derivados de CDC45L (barras blancas) o péptidos VIH-A24 irrelevantes (barras negras). La relación de células efectoras con respecto a diana fue 10:1. Los datos se presentan como la media $\pm$ DE de ensayos por triplicado. Parte B: Citotoxicidad de CTL contra células C1R-A2402 pulsadas con los péptidos derivados de CDC45L relacionados (triángulo blanco; CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2), CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3), CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4), CDC45L-A24-9-370-7 (SEQ ID NO: 7) o CDC45L-A24-10-556-12 (SEQ ID NO: 12)) y células C1R-A2402 pulsadas con péptidos VIH-A24 irrelevantes (triángulo negro) en el ensayo de liberación de ^{51}Cr . Cada valor representa el porcentaje de lisis específico calculado basándose en los valores medios de un ensayo por triplicado. Parte C: análisis de transferencia Western de lisados de células completas derivados de células Lu99 (panel izquierdo, carril 1), células Lu99 transfectadas con ARNip de CDC45L (panel izquierdo, carril 2) o ARNip de GFP de control (panel izquierdo, carril 3) y células EBC-1 (panel derecho, carril 1, células EBC-1 transfectadas con ARNip de CDC45L (panel derecho, carril 2) o ARNip de GFP de control (panel derecho, carril 3) usando anticuerpo anti-CDC45L. La beta-actina sirvió de control interno.

[Figura 5d] Parte D: Anulación de la actividad citotóxica específica de CDC45L de CTL mediante regulación por disminución de la proteína CDC45L en células diana Lu99 y EBC-1 (CDC45L⁺, HLA-A*2402⁺). Las actividades citotóxicas de CTL contra Lu99, EBC-1, Lu99 de ARNip de CDC45L, EBC-1 de ARNip de CDC45L, Lu99 de ARNip de GFP, EBC-1 de ARNip de GFP o A549 se analizaron por ensayo de liberación de ^{51}Cr . Cada valor representa el porcentaje de lisis específico calculado basándose en los valores promedio de un ensayo por triplicado.

[Figura 6] La Figura 6 está compuesta de una serie de gráficos que representan la inhibición de respuestas de CTL reactivos con CDC45L mediante mAb anti-clase I de HLA. Después de que las células diana Lu99 se incubaran con mAb anti-clase I de HLA (W6/32, IgG2a) o mAb anti-clase II de HLA de control (IgG2a) durante 1 h, las células Lu99 se co-cultivaron con los CTL generados de linfocitos T CD8⁺ de donantes sanos o pacientes con cáncer de pulmón mediante estimulación con el péptido CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2), CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3), CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) o CDC45L-A24-9-370-7 (SEQ ID NO: 7). Se indica la producción de IFN-gamma (Parte A) y la citotoxicidad (Parte B) mediada por CTL. Círculo blanco, Lu99; círculo negro, Lu99 + W6/32; recuadro blanco, Lu99 + mAb de control. Los datos se presentan como la media $\pm$ DE de ensayos por triplicado. Se indican diferencias estadísticamente significativas con asteriscos (*P < 0,05).

[Figura 7] La Figura 7 está compuesta de una serie de gráficas, A a C, que representan la inducción de tanto CTL restringidos por HLA-A24 (A*2402) como por HLA-A2 (A*0201) mediante estimulación con el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4, también denominado en la presente invención CDC45L-A24-9-556-4), $^{556}\text{KFLDALISL}^{564}$. Parte A: ensayo ELISPOT de IFN-gamma de CTL inducidos de un donante sano HLA-A*0201 positivo co-cultivados con células T2 pulsadas con el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4). Los datos se presentan como la media $\pm$ DE de ensayos por triplicado. Parte B: Actividad citotóxica de CTL contra células T2 pulsadas con péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) (triángulo blanco), células T2 pulsadas con el péptido VIH-A2 de control (triángulo negro) y células C1R-A2402 pulsadas con el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) (recuadro negro) tal como se analiza por el ensayo de liberación ^{51}Cr . Parte C: Inhibición de respuestas de CTL reactivos con CDC45L por mAb anti-clase I de HLA como se analiza por el ensayo de liberación de ^{51}Cr . Después de que las células diana Panc1 (CDC45L⁺, HLA-A2⁺, HLA-A24⁻) se incubaron con mAb anti-clase I de HLA (W6/32, IgG2a) o mAb anti-clase II de HLA de control (IgG2a), durante 1 h, las células Panc1 se co-cultivaron con CTL generados de linfocitos T CD8⁺ de un donante sano HLA-A*0201 positivo mediante estimulación con el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4). Círculo blanco, células Panc1; círculo negro, Panc1 + W6/32; recuadro blanco, Panc1 + mAb de control. Cada valor representa el porcentaje de lisis específica calculada basándose en los valores promedio de un ensayo por triplicado. Se muestran datos representativos de tres experimentos independientes con resultados similares.

[Figura 8a-b] La Figura 8 está compuesta de una serie de gráficos, A a D, que representan la actividad antitumoral *in vivo* de CTL humanos reactivos con CDC45L en ratones NOD/SCID. Partes A, B, C: Actividad citotóxica específica del péptido de CTL humanos generados de dos donantes sanos mediante estimulación con la mezcla de tres péptidos derivados de CDC45L. Parte A: Ensayo ELISPOT de IFN-gamma de CTL co-cultivados con células C1R-A2402 pulsadas con cualquiera de los péptidos CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2), CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3) o CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) Parte B: Citotoxicidad específica de CDC45L de CTL contra Lu99 (CDC45L⁺, HLA-A24⁺) en ausencia (círculo blanco) o presencia de

mAb anti-clase I de HLA (W6/32, círculo negro) o mAb anti-clase II de HLA de control (cuadro blanco) como se analiza por el ensayo de liberación de ^{51}Cr .

[Figura 8c-d] Parte C: Actividad citotóxica de CTL para células C1R-A2402 pulsadas con uno de los tres péptidos derivados de CDC45L (círculo blanco, CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2); recuadro blanco, CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3); triángulo blanco, CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4)) o un péptido VIH-A24 irrelevante (círculo negro) como se analiza por ensayo de liberación de ^{51}Cr . Parte D: Tumores en ratones NOD/SCID inoculados por vía intravenosa con CTL inducidos con CDC45L (recuadro negro, $n = 5$), linfocitos T CD8^+ de control (rombo blanco, $n = 5$), o PBS solo (círculo blanco, $n = 5$). Cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 25 mm^2 en el día 7 después de la implantación de tumor por vía subcutánea, se inocularon en por vía intravenosa CTL humanos (4×10^6) reactivos con una mezcla de tres péptidos CDC45L. Se repitió la inoculación de CTL en el día 14. Los linfocitos T CD8^+ de control estimulados con péptido de VIH restringido por HLA-A24 irrelevante también fueron inoculados en ratones como un control. El tamaño de tumor se expresa en milímetros cuadrados. Cada símbolo representa los tamaños de tumor promedio en cada grupo de ratones; las barras indican DE. Se usó la prueba de la t de Student bilateral para determinar la significancia de diferencias entre los dos grupos en el día 42.

Descripción de realizaciones

Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de las realizaciones de la presente invención, ahora se describen métodos, dispositivos y materiales preferidos.

I. Definiciones

Las palabras “un”, “una”, “el” y “la”, como se usan en el presente documento, significan “al menos uno”, a menos que se indique específicamente de otro modo.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos pueden ser resto(s) modificado(s) o resto(s) que no existe(n) de forma natural, tal como mimético(s) químico(s) artificial(es) de aminoácido(s) que existe(n) de forma natural correspondiente(s), además de a polímeros de aminoácidos que existe(n) de forma natural.

El término “aminoácido”, como se usa en el presente documento, se refiere a aminoácidos que existen de forma natural y sintéticos, además de análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan similarmente a los aminoácidos que existen de forma natural. El aminoácido puede ser tanto L-aminoácidos como D-aminoácidos. Los aminoácidos que existen de forma natural son los codificados por el código genético, además de los modificados después de la traducción en las células (por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina). La expresión “análogo de aminoácido” se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica (un enlace de carbono alfa a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) como aminoácido que existe de forma natural, pero tienen uno o más grupos R modificados o esqueletos modificados (por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metionina metil sulfonio). La expresión “mimético de aminoácido” se refiere a compuestos químicos que tienen estructuras diferentes, pero funciones similares a los aminoácidos generales.

Los aminoácidos pueden denominarse en el presente documento por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

Los términos “gen”, “polinucleótidos”, “nucleótidos” y “ácidos nucleicos” se usan indistintamente en el presente documento y, a menos que se indique específicamente de otro modo, son referidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

El término “composición”, como se usa en el presente documento, pretende englobar un compuesto que incluye los componentes especificados en las cantidades especificadas, además de cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación de los componentes especificados en las cantidades especificadas. Tal término, en relación con “composición farmacéutica”, pretende englobar un producto que incluye el (los) principio(s) activo(s) y cualquier componente inerte que constituya el vehículo, además de cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de dos o más de los componentes, o de la disociación de uno o más de los componentes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los componentes. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, la expresión “composición farmacéutica” engloba cualquier composición preparada por mezcla de un compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéutico o fisiológicamente aceptable. La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “vehículo fisiológicamente aceptable”, como se usa en el presente documento, significa un material, composición, sustancia o vehículo farmacéutico o fisiológicamente aceptable que incluye, pero no se limita a, una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, implicado en llevar o transportar el (los) principio(s) activo(s) de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo.

A menos que se defina de otro modo, el término “cáncer” se refiere a cánceres o tumores que expresan en exceso el gen CDC45L, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal. A menos que se defina de otro modo, los términos “linfocito T citotóxico”, “célula T citotóxica” y “CTL” se usan indistintamente en el presente documento y, a menos que se indique específicamente de otro modo, se refieren a un subgrupo de linfocitos T que son capaces de reconocer células no propias (por ejemplo, células de tumor/cáncer, células infectadas con virus) e inducir la muerte de tales células.

A menos que se defina de otro modo, los términos “HLA- A24” se refieren al tipo HLA-A24 que contiene subtipos tales como HLA-A*2402.

A menos que se defina de otro modo, el término “HLA-A2”, como se usa en el presente documento, se refiere representativamente a subtipos tales como HLA-A*0201 y HLA-A*0206.

A menos que se defina de otro modo, el término “kit”, como se usa en el presente documento, se usa en referencia a una combinación de reactivos y otros materiales. Se contempla en el presente documento que el kit puede incluir una micromatriz, chip, marcador, etc. No se pretende que el término “kit” se limite a una combinación particular de reactivos y/o materiales.

Hasta el punto que los métodos y composiciones de la presente invención encuentren utilidad en el contexto del “tratamiento” de cáncer, un tratamiento se considera “eficaz” si conduce a un beneficio clínico tal como reducción en la expresión del gen CDC45L, o una disminución en el tamaño, prevalencia o potencial metastásico del cáncer en el sujeto. Cuando el tratamiento se aplica profilácticamente, el término “eficacia” significa que retarda o previene que los cánceres se formen o previene o alivia un síntoma clínico de cáncer. La eficacia se determina en asociación con cualquier método de diagnóstico conocido o tratamiento del tipo de tumor particular.

Hasta el punto que los métodos y composiciones de la presente invención encuentren utilidad en el contexto de la “prevención” y “profilaxis” de cáncer, tales términos se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier actividad que reduzca la carga de mortalidad o morbilidad de la enfermedad. La prevención y profilaxis pueden producirse “a niveles de prevención primarios, secundarios y terciarios”. Aunque la prevención y profilaxis primaria evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles de prevención y profilaxis secundarios y terciarios engloban actividades que pretenden la prevención y profilaxis de la progresión de una enfermedad y la aparición de síntomas, además de la reducción del impacto negativo de una enfermedad ya establecida, restaurando la función y reduciendo las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y profilaxis puede incluir un amplio intervalo de terapias profilácticas que pretenden aliviar la gravedad del trastorno particular, por ejemplo, reducir la proliferación y metástasis de tumores.

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

En el contexto de la presente invención, el término “anticuerpo” se refiere a inmunoglobulinas y fragmentos de los mismos que son específicamente reactivos a una proteína o péptido designado de los mismos. Un anticuerpo puede incluir anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos fusionados a otras proteínas o radiomarcas y fragmentos de anticuerpo. Además, un anticuerpo en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Un “anticuerpo” indica todas las clases (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención.

II. Péptidos

Para demostrar que los péptidos derivados de CDC45L funcionan como un antígeno reconocido por CTL, se analizaron los péptidos derivados de CDC45L (SEQ ID NO: 18) para determinar si fueron epítopes de antígeno restringidos por HLA-A24 o A2 que son los alelos HLA comúnmente encontrados (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994). Se identificaron candidatos de péptidos de unión a HLA-A24 derivados de CDC45L basándose en sus afinidades de

unión a HLA-A24. Se consideran que los siguientes péptidos son péptidos candidatos para su uso en la inmunoterapia;

CDC45L-A24-9-237-1 (SEQ ID NO: 1),
 CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2),
 5 CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3),
 CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4),
 CDC45L-A24-9-328-5 (SEQ ID NO: 5),
 CDC45L-A24-9-396-6 (SEQ ID NO: 6),
 CDC45L-A24-9-370-7 (SEQ ID NO: 7),
 10 CDC45L-A24-9-192-8 (SEQ ID NO: 8),
 CDC45L-A24-9-541-9 (SEQ ID NO: 9),
 CDC45L-A24-9-364-10 (SEQ ID NO: 10),
 CDC45L-A24-10-109-11 (SEQ ID NO: 11),
 CDC45L-A24-10-556-12 (SEQ ID NO: 12),
 15 CDC45L-A24-10-271-13 (SEQ ID NO: 13),
 CDC45L-A24-10-313-14 (SEQ ID NO: 14),
 CDC45L-A24-10-21-15 (SEQ ID NO: 15), y
 CDC45L-A24-10-459-16 (SEQ ID NO: 16).

Además, después de la estimulación *in vitro* de linfocitos T por células dendríticas (DC) pulsadas (cargadas) con estos péptidos, los CTL se establecieron satisfactoriamente usando cada uno de los siguientes péptidos;

CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2),
 CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3),
 CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4),
 CDC45L-A24-9-370-7 (SEQ ID NO: 7), y
 25 CDC45L-A24-10-556-12 (SEQ ID NO: 12).

Estos CTL establecidos mostraron potente actividad de CTL específica contra células diana pulsadas con péptidos respectivos. Los resultados en el presente documento demuestran que CDC45L es un antígeno reconocido por CTL y que los péptidos probados son péptidos de epítipo de CDC45L restringido por HLA-A24.

Entre estos péptidos, CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) también se identificó como candidato de péptido de unión a HLA-A2. En el presente documento, CDC45L-A24-556-4 (SEQ ID NO: 4) también se denomina CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) en el contexto de los péptidos restringidos por HLA-A2. Usando el péptido, se establecieron satisfactoriamente los CTL contra células diana que expresan CDC45L y HLA-A2. Así, CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) no es únicamente un péptido de epítipo restringido por HLA-A24, sino también un péptido de epítipo restringido por HLA-A24.

Como el gen CDC45L se expresa en exceso en células de cáncer y tejido, que incluyen, por ejemplo, aquellos de tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama y cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal, y no se expresa en la mayoría de los órganos normales, representa una buena diana para inmunoterapia de cáncer. Así, la presente invención proporciona nonapéptidos (péptidos que consisten en nueve restos de aminoácidos) y decapeptidos (péptidos que consisten en diez restos de aminoácidos) correspondientes a los epítopos reconocidos por CTL de CDC45L. Alternativamente, la presente invención proporciona péptidos aislados que se unen a antígenos HLA e inducen linfocitos T citotóxicos (CTL), en los que el péptido tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o es un fragmento inmunológicamente activo del mismo. Ejemplos particularmente preferidos de la presente invención incluyen el péptido que tiene SEQ ID NO: 4.

Generalmente, pueden usarse los programas de software actualmente disponibles, por ejemplo, en internet, tales como los descritos por Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163- 75 y Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, para calcular las afinidades de unión entre los diversos péptidos y los antígenos HLA in silico. Puede medirse la afinidad de unión con antígenos HLA tal como se describe, por ejemplo, en Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007 Oct 31; 8: 424, Buus S et al. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003, Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, y Nielsen M et al. PLoS ONE 2007; 2: e796, que se resumen en, por ejemplo, Lafuente EM et al., Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220. Los métodos de determinación de la afinidad de unión se describen, por ejemplo en Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190 y Protein Science, 2000, 9: 1838-1846. Por tanto, pueden seleccionarse fragmentos derivados de CDC45L que tengan alta afinidad de unión con antígenos HLA usando tales programas de software. . Así, la presente invención engloba péptidos compuestos de cualquier fragmento derivado de CDC45L que se une con los antígenos HLA mediante tales programas conocidos. Además, tales péptidos pueden incluir el péptido que consiste en la longitud completa de CDC45L.

Los nonapéptidos y decapeptidos de la presente invención pueden flanquearse con restos de aminoácidos adicionales, siempre que el péptido resultante retenga su inducibilidad de CTL. Los restos de aminoácidos adicionales pueden estar compuestos de cualquier tipo de aminoácidos, siempre que no alteren la inducibilidad de CTL del péptido original. Así, la presente invención engloba péptidos con afinidad de unión a antígenos HLA, que incluyen péptidos derivados de CDC45L. Tales péptidos tienen menos de aproximadamente 15 aminoácidos.

En general, la modificación de uno o más aminoácidos en un péptido no influirá en la función del péptido, y en algunos casos incluso potenciará la función deseada de la proteína original. En realidad, se ha sabido que los péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos de una secuencia de aminoácidos en la que, uno, dos o varios restos de aminoácidos han sido modificados (es decir, sustituidos, añadidos, delecionados y/o insertados) en comparación con una secuencia de referencia original) retienen la actividad biológica del péptido original (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13). Así, en una realización, los péptidos de la presente invención tienen tanto inducibilidad de CTL como una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos.

Aquellos expertos en la materia reconocerán que adiciones, deleciones o sustituciones individuales a una secuencia de aminoácidos que alteran un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos tienden a producir la conservación de las propiedades de la cadena lateral de aminoácidos original. Como tales, frecuentemente se denominan "sustituciones conservativas" o "modificaciones conservativas", en las que la alteración de una proteína produce una proteína modificada que tiene una función análoga a la proteína original. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Ejemplos de características de la cadena lateral de aminoácidos que se desea conservar incluyen, por ejemplo: aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos o características funcionales en común: cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene átomo en azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene grupo aromático (H, F, Y, W). Además, los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son aceptados en la técnica como sustituciones conservativas para otros:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins 1984).

También se considera que tales péptidos conservativamente modificados son péptidos de la presente invención. Sin embargo, los péptidos de la presente invención no están restringidos a los mismos y pueden incluir modificaciones no conservativas, siempre que el péptido modificado retenga la inducibilidad de CTL del péptido original. Además, los péptidos modificados no deben excluir péptidos inducibles por CTL de las variantes polimórficas, homólogos interespecie y alelos de CDC45L.

Para retener la inducibilidad de CTL requerida, se puede modificar (es decir, insertar, deleccionar, añadir y/o sustituir) un pequeño número (por ejemplo, 1, 2 o varios) o un pequeño porcentaje de aminoácidos. En el presente

documento, el término "varios" significa 5 o menos aminoácidos, por ejemplo, 4 o 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos a modificar es preferentemente 20 % o menos, más preferentemente 15 % o menos, e incluso más preferentemente 10 % o menos o 1 a 5 %.

Cuando se usa en el contexto de inmunoterapia de cáncer, los péptidos de la presente invención deben presentarse en la superficie de una célula o exosoma, preferentemente como un complejo con un antígeno HLA. Por tanto, es preferible seleccionar péptidos que no solo induzcan CTL, sino que también posean alta afinidad de unión por el antígeno HLA. Para este fin, los péptidos pueden ser modificados por sustitución, inserción y/o adición de los restos de aminoácidos para dar un péptido modificado que tenga afinidad de unión mejorada. Además de los péptidos que son naturalmente presentados, como ya se conoce la regularidad de las secuencias de péptidos presentadas por la unión a antígenos HLA (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), pueden introducirse modificaciones basadas en tal regularidad en los péptidos inmunogénicos de la presente invención.

Por ejemplo, puede desearse sustituir el segundo aminoácido del extremo N con tirosina, metionina o triptófano, y/o el aminoácido en el extremo C con fenilalanina, isoleucina, triptófano o metionina con el fin de aumentar la afinidad de unión a HLA-A24. Así, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, en la que el segundo aminoácido del extremo N está sustituido con tirosina, metionina o triptófano, y/o en la que el extremo C está sustituido con fenilalanina, isoleucina, triptófano o metionina, están englobados por la presente invención.

Alternativamente, puede desearse sustituir el segundo aminoácido del extremo N con leucina o metionina, y/o el aminoácido en el extremo C con valina con el fin de aumentar la afinidad de unión a HLA-A2. Así, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 4, en la que el segundo aminoácido del extremo N está sustituido con leucina o metionina, y/o en la que el extremo C está sustituido con valina, están englobados por la presente invención.

Las sustituciones pueden introducirse no solo en los aminoácidos terminales, sino también en la posición del posible reconocimiento de péptidos del receptor de linfocitos T (TCR). Varios estudios han demostrado que un péptido con sustituciones de aminoácidos puede tener igual o mejor función que el original, por ejemplo, CAP1, p53⁽²⁶⁴⁻²⁷²⁾, Her-2/neu⁽³⁶⁹⁻³⁷⁷⁾ o gp100⁽²⁰⁹⁻²¹⁷⁾ (Zaremba et al., Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb 1;168(3):1338-47, S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 y S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

La presente invención también contempla la adición de uno, dos o varios aminoácidos también se pueden añadir al extremo N y/o C de los presentes péptidos. También se incluyen en la presente invención dichos péptidos modificados que tienen alta afinidad de unión con antígenos HLA y retuvieron la inducibilidad de CTL.

Sin embargo, cuando la secuencia de péptidos es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, pueden inducirse efectos secundarios tales como trastornos autoinmunitarios y/o síntomas alérgicos contra sustancias específicas. Por tanto, es preferible llevar a cabo primero búsquedas de homología usando bases de datos disponibles para evitar situaciones en las que la secuencia del péptido coincida con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando quede claro a partir de las búsquedas de homología que no existe incluso un péptido con 1 o 2 diferencias de aminoácidos en comparación con el péptido objetivo, el péptido objetivo puede modificarse con el fin de aumentar su afinidad de unión con antígenos HLA, y/o aumentar su inducibilidad de CTL sin peligro alguno de tales efectos secundarios.

Aunque se espera que los péptidos que tienen alta afinidad de unión a los antígenos HLA como se ha descrito anteriormente sean altamente eficaces, se examinan adicionalmente los péptidos candidatos, que se seleccionan según la presencia de afinidad de unión alta como un indicador, para la presencia de inducibilidad de CTL. En el presente documento, la expresión "inducibilidad de CTL" indica la capacidad del péptido para inducir linfocitos citotóxicos (CTL) cuando se presentan en células que presentan antígenos (APC). Además, la "inducibilidad de CTL" incluye la capacidad del péptido para inducir la activación de CTL, proliferación de CTL, promover la lisis por CTL de células diana y aumentar la producción de IFN-gamma por CTL.

La confirmación de la inducibilidad de CTL se lleva a cabo induciendo APC que llevan antígenos MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DC)), o más específicamente, DC derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana, y después de la estimulación con los péptidos, mezclando con células CD8 positivas, y entonces midiendo el IFN-gamma producido y liberado por CTL contra las células diana. Como sistema de reacción puede usarse animales transgénicos que hayan sido producidos para expresar un antígeno HLA humano (por ejemplo, los descritos en BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on MHC (HLA) class II restricted T(H) response). Por ejemplo, pueden radiomarcarse células diana con ⁵¹Cr y similares, y la actividad citotóxica puede calcularse a partir de la radiactividad liberada de las células diana. Alternativamente, puede evaluarse la inducibilidad de CTL midiendo el IFN-gamma producido y liberado por CTL en presencia de APC que llevan péptidos inmovilizados, y visualizando la zona de inhibición en el medio usando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

Como resultado de examinar la inducibilidad de CTL de los péptidos como se ha descrito anteriormente, se descubrió que los nonapéptidos o decapeptidos de SEQ ID NO: 4 mostraron inducibilidad de CTL particularmente alta, además de afinidad de unión alta a un antígeno HLA. Así, estos péptidos se ejemplifican como realizaciones preferidas de la presente invención.

Además, el resultado del análisis de homología mostró que aquellos péptidos no tienen homología significativa con los péptidos derivados de cualquier otro producto de gen humano. Por consiguiente, se reduce la posibilidad de respuestas inmunitarias no conocidas o no deseadas cuando se usan para inmunoterapia. Por tanto, también desde este aspecto, estos péptidos encuentran uso para provocar inmunidad en pacientes con cáncer contra CDC45L. Así, los péptidos de la presente invención, preferentemente, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

Además de las modificaciones anteriormente descritas, los péptidos de la presente invención también pueden unirse a otros péptidos, siempre que el péptido unido resultante retenga la inducibilidad de CTL requerida del péptido original. Ejemplos de péptidos adecuados incluyen: los péptidos de la presente invención o péptidos inducibles por CTL derivados de otros TAA. Conectores interpeptídicos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Suttmüller et al., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) o K (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715).

Por ejemplo, también pueden usarse los péptidos de antígeno asociados a tumor no CDC45L de forma sustancialmente simultánea para aumentar la respuesta inmunitaria mediante clase I y/o clase II de HLA. Está bien establecido que las células de cáncer pueden expresar más de un gen asociado a tumor. Así, está dentro del alcance de la experimentación rutinaria para un experto en la técnica determinar si un sujeto particular expresa genes asociados a tumores adicionales, y entonces incluir péptidos de unión a clase I de HLA y/o clase II de HLA derivados de productos de expresión de tales genes en composiciones de CDC45L o vacunas según la presente invención.

Ejemplos de péptidos de unión a clase I de HLA y clase II de HLA son conocidos para los expertos habituales en la técnica (por ejemplo, véase Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995), y pueden usarse en la invención en una forma similar a la desvelada en el presente documento. Así, un experto habitual en la técnica puede preparar fácilmente polipéptidos que incluyen uno o más péptidos CDC45L y uno o más de los péptidos no CDC45L, o ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos, usando procedimientos convencionales de biología molecular.

Tales péptidos unidos anteriores se denominan en el presente documento "politopes", es decir, grupos de dos o más péptidos estimulantes posiblemente inmunogénicos o de respuesta inmunitaria que pueden unirse juntos en diversas disposiciones (por ejemplo, concatenados, solapados). El politope (o ácido nucleico que codifica el politope) puede administrarse en un protocolo de inmunización estándar, por ejemplo, a animales, para probar la eficacia del politope en estimular, potenciar y/o provocar una respuesta inmunitaria.

Los péptidos pueden unirse juntos directamente o a través del uso de secuencias flanqueantes para formar politopes, y el uso de politopes como vacunas es muy conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990). Pueden prepararse politopes que contienen diversos números y combinaciones de epítopes y probarse para el reconocimiento por CTL y para la eficacia en aumentar una respuesta inmunitaria.

Los péptidos de la presente invención también pueden unirse a otras sustancias, siempre que el péptido unido resultante retenga la inducibilidad de CTL requerida del péptido original. Ejemplos adecuados incluyen, por ejemplo: péptidos, lípidos, azúcar y cadenas de azúcar, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glucosilación, oxidación de cadenas laterales, o fosforilación, etc., siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Estos tipos de modificaciones pueden realizarse para conferir funciones adicionales (por ejemplo, función de dirección y función de administración) o para estabilizar el polipéptido.

Por ejemplo, para aumentar la estabilidad *in vivo* de un polipéptido, se conoce en la técnica introducir D-aminoácidos, miméticos de aminoácido o aminoácidos no naturales; este concepto también puede adaptarse a los presentes polipéptidos. La estabilidad de un polipéptido puede ensayarse en varias formas. Por ejemplo, pueden usarse peptidasas y diversos medios biológicos, tales como plasma y suero humano, para probar la estabilidad (véase, por ejemplo, Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

Además, como se observa anteriormente, entre los péptidos modificados que están sustituidos, delecionados y/o añadidos por uno, dos o varios restos de aminoácidos, pueden cribarse o seleccionar aquellos que tienen la misma actividad o más alta en comparación con los péptidos originales. La presente invención, por tanto, también proporciona el método de cribado o selección de péptidos modificados que tienen la misma actividad o más alta, en comparación con las originales. Un método ilustrativo puede incluir las etapas de:

a: sustituir, delecionar o añadir al menos un resto de aminoácido de un péptido de la presente invención,

b: determinar la actividad del péptido producido en la etapa (a), y

c: seleccionar el péptido que tenga la misma actividad o más alta en comparación con el original.

En el presente documento, la actividad que va a ensayarse puede incluir actividad de unión a MHC, inducibilidad de APC o CTL y actividad citotóxica. Preferentemente, la actividad que va a ensayarse es inducibilidad de CTL y tal actividad puede ensayarse usando los métodos descritos en "EJEMPLOS".

En el presente documento, los péptidos de la presente invención también pueden describirse como "péptido(s) CDC45L" o polipéptido(s) "CDC45L".

III. Preparación de péptidos CDC45L

Los péptidos de la presente invención pueden prepararse usando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, los péptidos pueden prepararse sintéticamente, usando tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse individualmente o como polipéptidos más largos que incluyen dos o más péptidos. Los péptidos pueden entonces aislarse, es decir, purificarse o aislarse de manera que estén sustancialmente libres de otras proteínas de célula hospedadora que existen de forma natural y fragmentos de las mismas, o cualquier otra sustancia química.

Los péptidos de la presente invención pueden contener modificaciones, tales como glucosilación, oxidación de cadena lateral o fosforilación, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Otras modificaciones ilustrativas incluyen incorporación de D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácidos que pueden usarse, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero de los péptidos.

Un péptido de la presente invención puede obtenerse mediante síntesis química basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Ejemplos de métodos de síntesis de péptidos convencionales que pueden adaptarse para la síntesis incluyen:

(i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

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

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

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

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

(vi) Documento WO99/67288; y

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

Alternativamente, los presentes péptidos pueden obtenerse adaptando cualquier método de ingeniería genética conocido para producir péptidos (por ejemplo, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, primero, se prepara un vector adecuado que alberga un polinucleótido que codifica el péptido objetivo en una forma expresable (por ejemplo, en la dirección 3' de una secuencia reguladora que se corresponde con una secuencia promotora) y se transforma en una célula hospedadora adecuada. Tales vectores y células hospedadoras también se proporcionan por la presente invención. La célula hospedadora se cultiva entonces para producir el péptido de interés. El péptido también puede producirse *in vitro* adoptando un sistema de traducción *in vitro*.

IV. Polinucleótidos

La presente invención también proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los péptidos anteriormente mencionados de la presente invención. Éstos incluyen polinucleótidos derivados del gen CDC45L que existe de forma natural (Nº de acceso de GenBank NM_003504 (por ejemplo, SEQ ID NO: 17)), además de aquellos que tienen una secuencia de nucleótidos conservativamente modificada de los mismos. En el presente documento, la expresión "secuencia de nucleótidos conservativamente modificada" se refiere a secuencias que codifican secuencias de aminoácido idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Así, en cada posición en donde una alanina sea especificada por un codón, el codón puede ser alterado a cualquier de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones conservativamente modificadas. Cada secuencia de ácidos nucleicos en el presente documento que codifica un péptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un experto en la técnica reconocerá que puede modificarse cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que generalmente

es el único codón para metionina, y TGG, que generalmente es el único codón para triptófano) para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un péptido está descrita implícitamente en cada secuencia desvelada.

5 El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto de ADN, ARN, o derivados de los mismos. Como es muy conocido en la técnica, una molécula de ADN está compuesta de bases tales como las bases que existen de forma natural A, T, C y G, y T se sustituye por U en un ARN. Un experto reconocerá que en los polinucleótidos también están incluidas bases que no existen de forma natural.

10 El polinucleótido de la presente invención puede codificar múltiples péptidos de la presente invención con o sin secuencias de aminoácidos intermedias. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos intermedia puede proporcionar un sitio de escisión (por ejemplo, secuencia de reconocimiento de enzimas) del polinucleótido o los péptidos traducidos. Además, el polinucleótido puede incluir cualquier secuencia adicional a la secuencia codificante que codifica el péptido de la presente invención. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido recombinante que incluye secuencias reguladoras requeridas para la expresión del péptido o puede ser un vector de expresión (plásmido) con genes marcadores y similares. En general, tales polinucleótidos recombinantes pueden prepararse por la manipulación de polinucleótidos a través de técnicas recombinantes convencionales usando, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

15 Pueden usarse tanto técnicas de síntesis recombinante como química para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, puede producirse un polinucleótido mediante la inserción en un vector adecuado, que puede expresarse cuando se transfecta en una célula competente. Alternativamente, un polinucleótido puede amplificarse usando técnicas de PCR o expresión en hospedadores adecuados (ver véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989). Alternativamente, puede sintetizarse un polinucleótido usando las técnicas en fase sólida, como se describen en Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-3111; Matthes et al., EMBO J 1984, 3:801-5.

V. Exosomas

25 La presente invención proporciona además vesículas intracelulares, llamadas, exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de la presente invención y antígenos HLA en su superficie. Los exosomas pueden prepararse, por ejemplo, usando los métodos detallados en las publicaciones Kohyo de solicitud de patente japonesa N.º Hei 11-510507 y el documento WO99/03499, y pueden prepararse usando las APC obtenidas de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención. Los exosomas de la presente invención pueden inocularse como vacunas, en un modo similar a los péptidos de la presente invención.

30 El tipo de antígenos HLA incluidos en los complejos debe coincidir con el del sujeto que requiere el tratamiento y/o la prevención. Por ejemplo, en la población Japonesa, HLA-A24 y HLA-A2, particularmente HLA-A*2402 y HLA-A*0201 y HLA-A*0206, son los más predominantes y, por tanto, serían apropiados para el tratamiento de un paciente Japonés. El uso de los tipos A24 y A2 que son altamente expresados entre los japoneses y caucásicos es favorable para obtener resultados eficaces, y subtipos tales como A*2402, A*0201 y A*0206 también encuentran uso. Normalmente, en la clínica, el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento se investiga por adelantado, lo cual permite la selección apropiada de péptidos que tienen altos niveles de afinidad de unión por el antígeno particular, o que tienen inducibilidad de CTL por presentación de antígenos. Además, con el fin de obtener péptidos que tienen tanto afinidad de unión alta como inducibilidad de CTL, pueden realizarse sustitución, delección, inserción y/o adición de 1, 2, o varios aminoácidos, basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido parcial CDC45L que existe de forma natural.

Si se usa el antígeno HLA tipo A24 para el exosoma de la presente invención, encuentran uso los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2.

45 Alternativamente, si se usa el antígeno HLA tipo A2 para el exosoma de la presente invención, encuentra uso el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

VI. Células presentadoras de antígeno (APC)

La presente invención también proporciona células presentadoras de antígenos (APC) aisladas que presentan complejos formados con antígenos HLA y péptidos de la presente invención en su superficie. Las APC pueden derivar de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención, y pueden administrarse como vacunas por sí mismas o en combinación con otros fármacos que incluyen los péptidos de la presente invención, exosomas, o CTL.

55 Las APC no se limitan a un tipo particular de células e incluyen células dendríticas (DC), células de Langerhans, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T activados, que son conocidas por presentar antígenos proteínicos en su superficie celular de manera que sean reconocidos por los linfocitos. Como la DC es una APC representativa que tiene la actividad de inducción de CTL más fuerte de entre las APC, las DC encuentran uso como las APC de la presente invención.

Por ejemplo, las APC de la presente invención pueden obtenerse induciendo DC de monocitos de sangre periférica y entonces poniéndolas en contacto (estimulándolas) con los péptidos de la presente invención *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Cuando los péptidos de la presente invención se administran a los sujetos, las APC que presentan los péptidos de la presente invención se inducen en el cuerpo del sujeto. La expresión "inducción de APC" incluye poner en contacto (estimular) una célula con los péptidos de la presente invención, o nucleótidos que codifican los péptidos de la presente invención para presentar complejos formados entre antígenos HLA y los péptidos de la presente invención en la superficie de la célula. Por tanto, las APC de la presente invención pueden obtenerse recolectando las APC del sujeto después de administrar los péptidos de la presente invención al sujeto. Alternativamente, las APC de la presente invención pueden obtenerse poniendo en contacto las APC recolectadas de un sujeto con el péptido de la presente invención.

Las APC de la presente invención pueden administrarse a un sujeto para inducir respuesta inmunitaria contra cáncer en el sujeto por sí mismos o en combinación con otros fármacos que incluyen los péptidos, exosomas o CTL de la presente invención. Por ejemplo, la administración *ex vivo* puede incluir las etapas de:

a: recolectar APC de un primer sujeto,

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

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

El primer sujeto y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo, o pueden ser individuos diferentes. Las APC obtenidas por la etapa b pueden usarse como una vacuna para el tratamiento y/o la prevención de cáncer, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal.

La presente invención proporciona la fabricación de una composición farmacéutica que incluye tales células presentadoras de antígeno inducidas con los péptidos de la presente invención. Según un aspecto de la presente invención, las APC tienen un alto nivel de inducibilidad de CTL. En el término de "alto nivel de inducibilidad de CTL", el alto nivel es con respecto al nivel de esa APC que se pone en contacto con el no péptido o péptido que puede no inducir el CTL. Tales APC que tienen un alto nivel de inducibilidad de CTL pueden prepararse por un método que incluye la etapa de transferir un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención a las APC *in vitro*, además del método mencionado anteriormente. Los genes introducidos pueden estar en forma de ADN o ARN. Ejemplos de métodos para la introducción incluyen, sin limitaciones particulares, diversos métodos convencionalmente realizados en este campo, tales como lipofección, electroporación, o puede usarse el método de fosfato de calcio. Más específicamente, puede realizarse como se describe en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161:5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; traducción japonesa publicada de la publicación internacional N.º 2000-509281. Al transferir el gen en las APC, el gen experimenta transcripción, traducción, y similares, en la célula, y entonces la proteína obtenida es procesada por clase I o clase II de MHC, y procede a través de una vía de presentación para presentar péptidos parciales.

En realizaciones preferidas, las APC de la presente invención pueden ser aquellas que presentan complejos formados entre un antígeno HLA-A24 tales como HLA-A*2402 y el péptido de la presente invención en su superficie. Alternativamente, las APC de la presente invención pueden presentar complejos formados entre un antígeno HLA-A2 tal como HLA-A*0201 y el péptido de SEQ ID NO: 4 o el péptido modificado del mismo en su superficie.

VII. Linfocitos T citotóxicos (CTL)

Un CTL inducido contra uno cualquiera de los péptidos de la presente invención refuerza la respuesta inmunitaria que dirige las células de cáncer *in vivo* y así pueden usarse como vacunas, en una forma similar a los péptidos por sí mismos. Así, la presente invención proporciona CTL aislados que son específicamente inducidos o activados por uno cualquiera de los presentes péptidos.

Tales CTL pueden obtenerse (1) administrando el (los) péptido(s) de la presente invención a un sujeto o (2) poniendo en contacto (estimulando) las APC derivadas del sujeto, y células CD8 positivas, o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con el (los) péptido(s) de la presente invención o (3) poniendo en contacto las células CD8 positivas o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con las APC o exosomas que presentan un complejo de un antígeno HLA y el péptido en su superficie o (4) introduciendo un gen que incluye un polinucleótido que codifica una subunidad de receptor de linfocitos T (TCR) capaz de unirse al péptido de la presente invención. Tales APC o exosomas pueden ser preparados por los métodos descritos anteriormente y los detalles del método de (4) se describen más adelante en la sección "VIII. Receptor de linfocitos T (TCR)".

Los CTL de la presente invención pueden derivarse de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención, y pueden administrarse por sí mismos o en combinación con otros fármacos que incluyen los péptidos de la presente invención o exosomas con el fin de efectos de regulación. Los CTL obtenidos actúan específicamente contra células diana que presentan los péptidos de la presente invención, por ejemplo, los mismos péptidos usados para la

inducción. Las células diana pueden ser células que expresan endógenamente CDC45L, tales como células de cáncer, o células que son transfectadas con el gen CDC45L; y células que presentan un péptido de la presente invención en la superficie celular debido a estimulación por el péptido también pueden servir de dianas del ataque por CTL activado.

5 VIII. Receptor de linfocitos T (TCR)

La presente invención también proporciona una composición que incluye ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de receptor de linfocitos T (TCR), y métodos de uso de la misma. Las subunidades de TCR de la presente invención tienen la capacidad de formar TCR que confieren especificidad a linfocitos T contra células de tumor que presentan CDC45L. Usando los métodos conocidos en la técnica, pueden
10 identificarse los ácidos nucleicos que codifican las cadenas alfa y beta que constituyen las subunidades de TCR del CTL inducido con uno o más péptidos de la presente invención (documento WO2007/032255 y Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Por ejemplo, se prefieren los métodos PCR para analizar las secuencias de nucleótidos que codifican las subunidades de TCR. Los cebadores de PCR para el análisis pueden ser, por ejemplo, cebadores 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') como los cebadores del lado 5' (SEQ ID NO: 23) y cebadores 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgagcgt-3') específicos para la región C de la cadena alfa de TCR (SEQ ID NO: 24), cebadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatccttctcttgac-3') específicos para la región C1 de la cadena beta de TCR (SEQ ID NO: 25) o
15 cebadores 3-TRbeta-C2 (5'-ctagcctctggaatccttctt-3') específicos para la región C2 de la cadena beta de TCR (SEQ ID NO: 26) como cebadores del lado 3', pero no se limitan a éstos. Los TCR de derivados pueden unirse a células diana que presentan el péptido CDC45L con alta avidez, y opcionalmente median en la eficiente destrucción de las células diana que presentan el péptido CDC45L *in vivo* e *in vitro*.
20

Los ácidos nucleicos que codifican las subunidades de TCR pueden incorporarse en vectores adecuados, por ejemplo, vectores retrovirales. Estos vectores son muy conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos o los vectores que los incluyen pueden ser transferidos útilmente en un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T de un paciente. Ventajosamente, la presente invención proporciona una composición disponible para venta que permite la rápida
25 modificación de los linfocitos T del propio paciente (o los de otro mamífero) para producir rápida y fácilmente linfocitos T modificados que tienen excelentes propiedades de destrucción de células de cáncer.

El TCR específico es un receptor capaz de reconocer específicamente un complejo de un péptido de la presente invención y la molécula HLA, dando una actividad específica de linfocitos T contra la célula diana cuando el TCR se presenta en la superficie del linfocito T. Un reconocimiento específico del complejo anterior puede confirmarse por
30 cualquier método conocido, cuyos ejemplos preferidos incluyen, pero no se limitan a, análisis de tinción de multímeros de HLA usando moléculas de HLA y péptidos de la presente invención, y ensayos ELISPOT. Realizando el ensayo ELISPOT, puede confirmarse si un linfocito T transducido con el ácido nucleico que codifica las subunidades de TCR reconoce una célula que expresa la molécula de HLA y CDC45L, y la señal se transmite intracelularmente. También puede confirmarse si las subunidades de TCR introducidas en un linfocito T pueden o no
35 dar una actividad citotóxica de linfocitos T por métodos conocidos en la técnica. Métodos preferidos incluyen, por ejemplo, ensayo de liberación de cromo usando HLA-A2 positivo y células que expresa en exceso CDC45L como células diana.

Por tanto, la presente invención proporciona CTL que se preparan por transducción con los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de subunidades de TCR que se unen al péptido CDC45L de, por ejemplo, SEQ ID NO: 4
40 en el contexto de HLA-A2, y también el péptido de SEQ ID NO: 4 en el contexto de HLA-A24.

Los CTL transducidos son capaces de albergar células de cáncer *in vivo*, y pueden expandirse por métodos de cultivo bien conocidos *in vitro* (por ejemplo, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Los CTL de la presente invención pueden usarse para formar una composición inmunogénica útil en el tratamiento de y/o la
prevención de cáncer en un paciente en necesidad de terapia o protección (véase el documento WO2006/031221).

45 IX. Agentes farmacéuticos o composiciones

Como la expresión de CDC45L se eleva específicamente en cánceres, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal en comparación con tejido normal,
50 los péptidos de la presente invención y polinucleótidos que codifican tales péptidos encuentran utilidad en el tratamiento y/o la profilaxis de cáncer, y/o la prevención de reaparición posoperatoria del mismo. Así, la presente invención proporciona un agente farmacéutico o composición para su uso en el tratamiento y/o la prevención de cáncer, y/o para su uso en la prevención de la reaparición posoperatoria del mismo, incluyendo tal agente farmacéutico o composición como principio activo uno o más de los péptidos o polinucleótidos de la presente
55 invención. Alternativamente, los presentes péptidos pueden expresarse en la superficie de cualquier de los exosomas o células anteriores, tales como las APC para uso como agentes farmacéuticos o composiciones. Además, los CTL anteriormente mencionados que dirigen uno cualquiera de los péptidos de la presente invención también pueden usarse como el principio activo de los presentes agentes farmacéuticos o composiciones.

Los agentes farmacéuticos y composiciones (por ejemplo, "agentes farmacéuticos") de la presente invención también encuentran uso como vacunas. En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" (también denominado una "composición inmunogénica") se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad antitumoral tras la inoculación en los animales.

5 Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar y/o prevenir cánceres y/o la prevención de reaparición posoperatoria de los mismos en sujetos o pacientes que incluyen humanos y cualquier otro mamífero que incluye, pero no se limita a, ratón, rata, cobaya, conejo, gato, perro, oveja, cabra, cerdo, ganado vacuno, caballo, mono, babuino y chimpancé, particularmente un animal comercialmente importante o un animal doméstico.

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

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un ácido nucleico que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;

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

15 (d) un linfocito T citotóxico de la presente invención

en la fabricación de una composición farmacéutica o agente para tratar o prevenir cáncer o tumor.

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

(a) un péptido de la presente invención;

20 (b) un ácido nucleico que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;

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

(d) un linfocito T citotóxico de la presente invención

para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer o tumor.

25 Alternativamente, la presente invención proporciona además un método o proceso de fabricación de una composición farmacéutica o agente para tratar o prevenir cáncer o tumor, en el que el método o proceso incluye la etapa de formular un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable con un principio activo seleccionado de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

30 (b) un ácido nucleico que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;

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

(d) un linfocito T citotóxico de la presente invención

como principios activos.

35 En otra realización, la presente invención también proporciona un método o proceso de fabricación de una composición farmacéutica o agente para tratar o prevenir cáncer o tumor, en el que el método o proceso incluye las etapas de mezclar un principio activo con un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable, en el que el principio activo se selecciona de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

40 (b) un ácido nucleico que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;

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

(d) un linfocito T citotóxico de la presente invención.

45 Según la presente invención, se ha encontrado que el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 son péptidos de epítipo restringidos por HLA-A24 o los candidatos que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica. Por tanto, los presentes agentes farmacéuticos o composiciones que incluyen el

péptido con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 son particularmente adecuados para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A24. También se ha encontrado que el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 son péptidos de epítipo restringidos por HLA-A2. Por tanto, los agentes farmacéuticos o composiciones que incluyen un péptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 también son adecuados para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A2, además de sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A24. Lo mismo aplica a agentes farmacéuticos o composiciones que contienen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de la presente invención).

Los cánceres que van a tratarse por los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención no están limitados e incluyen cualquier cáncer en el que participe CDC45L (por ejemplo, se exprese en exceso), que incluyen, por ejemplo, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal.

Los presentes agentes farmacéuticos o composiciones pueden contener, además de los principios activos anteriormente mencionados, otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTL contra células cancerosas, otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, o similares. En el presente documento, los otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTL contra células cancerosas se ejemplifican por antígenos específicos de cáncer (por ejemplo, TAA identificados), pero no se limitan a éstos.

Si se necesita, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como un principio activo, siempre que las sustancias no inhiban el efecto antitumoral del principio activo, por ejemplo, cualquier de los presentes péptidos. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir agentes antiinflamatorios o composiciones, analgésicos, quimioterapéuticos y similares. Además de otras sustancias terapéuticas en el propio medicamento, los medicamentos de la presente invención también pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente con uno o varios de los otros agentes farmacológicos o composiciones. Las cantidades de medicamento y agente farmacológico o composición dependen, por ejemplo, de qué tipo de agente(s) farmacológico(s) o composición (composiciones) se use, la enfermedad que esté tratándose, y los programas y vías de administración.

Debe entenderse que, además de los componentes particularmente mencionados en el presente documento, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden incluir otros agentes o composiciones convencionales en la técnica que tienen en cuenta el tipo de formulación en cuestión.

En una realización de la presente invención, los presentes agentes farmacéuticos o composiciones pueden incluirse en artículos de fabricación y kit que contienen materiales útiles para tratar las afecciones patológicas de la enfermedad que va a tratarse, por ejemplo, cáncer. El artículo de fabricación puede incluir un recipiente de cualquier de las presentes sustancias farmacéuticas o composiciones con una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen frascos, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta en el recipiente debe indicar la sustancia o composición que se usa para el tratamiento o prevención de una o más condiciones de la enfermedad. La etiqueta también puede indicar indicaciones para administración, etc.

Además del recipiente descrito anteriormente, un kit que incluye un agente farmacéutico o composición de la presente invención puede incluir opcionalmente un segundo recipiente que alberga un diluyente farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse, si se desea, en un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El paquete puede incluir, por ejemplo, hoja de metal o de plástico, tal como un envase alveolado. El paquete o dispositivo dispensador pueden ir acompañados de instrucciones para la administración.

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

Los péptidos de la presente invención pueden administrarse directamente como un agente farmacéutico o composición, o si fuera necesario, formularse mediante métodos de formulación convencionales. En el último caso, además de los péptidos de la presente invención, pueden incluirse según convenga vehículos, excipientes, y similares que son generalmente usados para fármacos, sin limitaciones particulares. Ejemplos de tales vehículos son agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón fosfato, líquido de cultivo y similares. Además, los agentes farmacéuticos o composiciones pueden contener, según sea necesario, estabilizadores, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares. Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden usarse para fines contra el cáncer.

Los péptidos de la presente invención puede prepararse como una combinación compuesta de dos o más péptidos de la presente invención, para inducir CTL *in vivo*. La combinación de péptido puede tomar la forma de una mezcla o pueden conjugarse entre sí usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los péptidos pueden unirse químicamente o expresarse como una secuencia de polipéptidos de fusión simple que puede

tener uno o varios aminoácidos como conector (por ejemplo, Lysine linker: K. S. Kawamura et al. J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715). Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes. Al administrar los péptidos de la presente invención, los péptidos son presentados en alta densidad por los antígenos HLA en las APC, entonces se inducen los CTL que reaccionan específicamente hacia el complejo formado entre el péptido presentado y el antígeno HLA. Alternativamente, las APC (por ejemplo, DC) se eliminan de los sujetos y entonces son estimuladas por los péptidos de la presente invención para obtener las APC que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención en su superficie celular. Estas APC se vuelven administrar a los sujetos para inducir CTL en los sujetos, y como resultado, puede aumentarse la agresividad hacia el endotelio asociado a tumor.

Los agentes farmacéuticos o composiciones para el tratamiento y/o la prevención de cáncer que contienen como principio activo un péptido de la presente invención también pueden incluir un adyuvante conocido por establecer eficazmente inmunidad celular. Alternativamente, las sustancias farmacéuticas o composiciones pueden administrarse con otros principios activos, y pueden ser administrados por la formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a cualquier compuesto, sustancia o composición que potencie la respuesta inmunitaria contra la proteína cuando se administran juntas (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Un adyuvante contemplado en el presente documento incluye los descritos en la bibliografía (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina del cólera, toxina de salmonella, adyuvante incompleto de Freund (IFA), adyuvante completo de Freund (CFA), ISCOMatrix, GM-CSF, CpG, emulsión O/W y similares, aunque no se limitan a éstos. Además, pueden usarse convenientemente formulaciones de liposoma, formulaciones granulares en las que el péptido está unido a perlas de pocos micrómetros de diámetro, y formulaciones en las que un lípido se une al péptido.

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

En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden incluir además un componente que sensibiliza a los CTL. Se han identificado lípidos como agentes o composiciones capaces de sensibilizar a CTL *in vivo* contra antígenos virales. Por ejemplo, pueden unirse restos de ácido palmítico a los grupos épsilon- y alfa-amino de un resto de lisina, y entonces unirse a un péptido de la presente invención. El péptido lipidado puede entonces administrarse ya sea directamente en una micela o partícula, incorporarse en un liposoma o emulsionarse en un adyuvante. Como otro ejemplo de sensibilización de lípidos de respuestas de CTL, pueden usarse lipoproteínas de *E. coli*, tal como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS) para sensibilizar CTL cuando se unen covalentemente a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).

El método de administración puede ser oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, o similares, y administración sistémica o administración local en los alrededores de los sitios dirigidos. La administración puede realizarse mediante administración simple o reforzarse por múltiples administraciones. La dosis de péptidos de la presente invención puede ajustarse apropiadamente según la enfermedad que va a tratarse, edad del paciente, peso, método de administración y similares, y generalmente es 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo, 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 10 mg, y puede administrarse una vez en unos cuantos días hasta unos cuantos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar en forma adecuada una dosis adecuada.

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

Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención también puede contener ácidos nucleicos que codifican el (los) péptido(s) desvelado(s) en el presente documento en una forma expresable. En el presente documento, la expresión "en una forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando se introduce en una célula, se expresará *in vivo* como un polipéptido que induce inmunidad antitumoral. En una realización ejemplificada, la secuencia de ácidos nucleicos del polinucleótido de interés incluye elementos reguladores necesarios para la expresión del polinucleótido. El (Los) polinucleótido(s) puede(n) equiparse de manear que se logre la inserción estable en el genoma de la célula diana (véase, por ejemplo, Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503- 12 para una descripción de los vectores de casete de recombinación homóloga. Véanse, por tanto, por ejemplo, Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; patentes de EE.UU. N.º 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y documento WO 98/04720). Ejemplos de tecnologías de administración basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", administración facilitada (mediada por bupivacaína, polímeros, péptido), complejos de lípido catiónicos y administración mediada por partículas ("pistola de genes") o presión (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.922.687).

Los péptidos de la presente invención también pueden expresarse por vectores virales o bacterianos. Ejemplos de vectores de expresión incluyen hospedadores virales atenuados tales como variolovacuna o viruela aviar. Este enfoque implica el uso de virus de la variolovacuna, por ejemplo, como un vector para expresar secuencias de

nucleótidos que codifican el péptido. Tras la introducción en un hospedador, el virus de la variolovacuna recombinante expresa el péptido inmunogénico, y así provoca una respuesta inmunitaria. Los vectores de la variolovacuna y métodos útiles en protocolos de inmunización se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.722.848. Otro vector es BCG (bacilo de Calmette Guérin). Vectores de BCG se describen en Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60. Serán evidentes una amplia variedad de otros vectores útiles para administración terapéutica o inmunización, por ejemplo, vectores de adenovirus y virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores de *Salmonella typhi*, vectores de toxina del carbunco desintoxicados y similares. Véanse, por ejemplo, Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85.

10 La administración de un polinucleótido en un paciente puede ser ya sea directa, en la que el paciente se expone directamente a un vector transportador de polinucleótido, o indirecta, en la que las células se transforman primero con el polinucleótido de interés *in vitro*, entonces las células se trasplantan en el paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapias génica *in vivo* y *ex vivo*.

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

20 El método de administración puede ser oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, o similares, y encuentra uso la administración sistémica o administración local en los alrededores de los sitios dirigidos. La administración puede realizarse por administración simple o reforzarse mediante múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el vehículo adecuado o las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de la presente invención pueden ajustarse apropiadamente según la enfermedad que va a tratarse, edad del paciente, peso, método de administración y similares, y generalmente es 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 10 mg, y puede administrarse una vez cada unos cuantos días, hasta una vez cada unos cuantos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente la dosis adecuada.

X. Métodos de uso de los péptidos, exosomas, APC y CTL

30 Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención pueden usarse para preparar o inducir APC y CTL. Los exosomas y APC de la presente invención también pueden usarse para inducir CTL. Los péptidos, polinucleótidos, exosomas y APC pueden usarse en combinación con cualquier otro compuesto, siempre que los compuestos no inhiban su inducibilidad de CTL. Así, cualquiera de los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden usarse para inducir CTL, y además de esto, los que incluyen los péptidos y polinucleótidos también pueden usarse para inducir APC tal como se trata en mayor detalle más adelante.

(1) Método de inducción de células presentadoras de antígenos (APC)

La presente invención proporciona métodos de inducción de APC con alta inducibilidad de CTL usando péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

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

a: recolectar APC de un sujeto; y

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

45 Las APC no se limitan a un tipo particular de células e incluyen DC, células de Langerhans, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T activados, que son conocidas por presentar antígenos proteínicos en su superficie celular de manera que sean reconocidos por linfocitos. Preferentemente, pueden usarse DC que tienen la inducibilidad de CTL más fuerte entre las APC. Puede usarse cualquier péptido de la presente invención por sí mismo o con otros péptidos de la presente invención.

50 Por otra parte, cuando los péptidos de la presente invención se administran a un sujeto, las APC se ponen en contacto con los péptidos *in vivo*, por consiguiente, las APC con alta inducibilidad de CTL son inducidas en el cuerpo del sujeto. Así, la presente invención incluye administrar los péptidos de la presente invención a un sujeto. Similarmente, cuando los polinucleótidos de la presente invención se administran a un sujeto en una forma expresable, los péptidos de la presente invención se expresan y se ponen en contacto con APC *in vivo*, por consiguiente, las APC con alta inducibilidad de CTL se inducen en el cuerpo del sujeto. Así, la presente invención también puede incluir administrar los polinucleótidos de la presente invención a un sujeto. "Forma expresable" se

describe anteriormente en la sección "IX. Agentes farmacéuticos o composiciones, (2) Agentes farmacéuticos o composiciones que contienen polinucleótidos como el principio activo".

La presente invención también puede incluir la etapa de introducir el polinucleótido de la presente invención en APC para inducir las APC con inducibilidad de CTL. Un ejemplo ilustrativo de un método tal puede incluir las etapas de:

- 5 a: recolectar las APC de un sujeto;
- b: introducir un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención.

La etapa b puede realizarse como se ha descrito anteriormente en la sección de "VI. Células presentadoras de antígenos".

- 10 Alternativamente, la presente invención proporciona un método de preparación de una célula presentadora de antígenos (APC) que induce específicamente la actividad de CTL contra CDC45L, en el que el método puede incluir una de las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto una APC con un péptido de la presente invención *in vitro* o *ex vivo*; y
- (b) introducir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en una APC.

(2) Método de inducción de CTL

- 15 Además, la presente invención proporciona métodos de inducción de CTL usando los péptidos, polinucleótidos, exosomas o APC de la presente invención.

- 20 La presente invención también proporciona métodos de inducción de CTL usando un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad de receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce un complejo de los péptidos de la presente invención y antígenos HLA. Preferentemente, los métodos de inducción de CTL pueden incluir al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

- a) poner en contacto un linfocito T CD8 positivo con una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención; y
- b) introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad de TCR que reconoce un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA en una célula CD8 positiva.

- 25 Cuando los péptidos, los polinucleótidos, APC o exosomas de la presente invención se administran a un sujeto, los CTL se inducen en el cuerpo del sujeto, y se potencia la intensidad de la respuesta inmunitaria que se dirige a las células de cáncer. Así, los métodos de la presente invención incluyen la etapa de administrar los péptidos, los polinucleótidos, las APC o exosomas de la presente invención a un sujeto.

- 30 Alternativamente, los CTL también pueden ser inducidos usándolos *ex vivo* o *in vitro*, y después de inducir los CTL, los CTL activados pueden ser devueltos al sujeto. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

- a: recolectar APC de un sujeto;
- b: poner en contacto las APC de la etapa a, con el péptido; y
- c: co-cultivar las APC de la etapa b con células CD8 positivas.

- 35 Las APC que van a co-cultivarse con las células CD8 positivas en la etapa c anterior también se pueden prepararse transfiriendo un gen que incluye un polinucleótido de la presente invención en APC como se ha descrito anteriormente en la sección "VI. Células presentadoras de antígenos", aunque la presente invención no se limita a esto, y, por tanto, puede comprender cualquier APC que presente eficazmente en su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención. En lugar de tales APC, también pueden usarse los exosomas que presentan en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención.
- 40 Concretamente, la presente invención puede incluir la etapa de co-cultivar exosomas que presentan en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención. Tales exosomas pueden prepararse por los métodos descritos anteriormente en la sección "V. Exosomas".

- 45 Además, el CTL puede ser inducido introduciendo un gen que incluye un polinucleótido que codifica la subunidad de TCR que se une al péptido de la presente invención en las células CD8 positivas. Tal transducción puede realizarse como se ha descrito anteriormente en la sección "VIII. Receptor de linfocitos T (TCR)".

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

(3) Método de inducción de la respuesta inmunitaria

Además, la presente invención proporcionar métodos de inducción de una respuesta inmunitaria contra enfermedades relacionadas con CDC45L. Enfermedades adecuadas incluyen cáncer, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal.

Los métodos de la presente invención pueden incluir la etapa de administrar agente(s) o composición (composiciones) que contiene cualquiera de los péptidos de la presente invención o polinucleótidos que los codifican. Los métodos inventivos también contemplan la administración de exosomas o APC que presentan cualquier de los péptidos de la presente invención. Para detalles, véase el punto de "IX. Agentes farmacéuticos o composiciones", particularmente la parte que describe el uso de los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención como vacunas. Además, los exosomas y las APC que pueden emplearse para los presentes métodos de inducción de la respuesta inmunitaria se describen con detalle en los puntos de "V. Exosomas", "VI. Células presentadoras de antígenos (APC)", y (1) y (2) de "X. Métodos que usan los péptidos, exosomas, APC y CTL", arriba.

La presente invención también proporciona un método o proceso de fabricación de un agente farmacéutico o composición que induce una respuesta inmunitaria, en el que el método puede incluir la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención en su superficie; o
- (d) un linfocito T citotóxico de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, puede tratarse cáncer que expresa en exceso CDC45L con estos principios activos. Ejemplos de tales cánceres incluyen, pero no se limitan a, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal. Por consiguiente, antes de la administración de las vacunas o agentes farmacéuticos o composiciones que incluyen los principios activos, es preferible confirmar si se potencia o no el nivel de expresión de CDC45L en las células o tejidos que van a tratarse en comparación con células normales de mismo órgano. Así, en una realización, la presente invención proporciona un método de tratamiento de cáncer que expresa (en exceso) CDC45L, método que puede incluir las etapas de:

- i) determinar el nivel de expresión de CDC45L en células o tejido(s) obtenidos de un sujeto con el cáncer que va a tratarse;
- ii) comparar el nivel de expresión de CDC45L con el nivel de control normal; y
- iii) administrar al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en (a) a (d) descrito anteriormente a un sujeto con cáncer que expresa en exceso CDC45L en comparación con el control normal.

Alternativamente, la presente invención puede proporcionar una vacuna o agente farmacéutico o composición que incluye al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en (a) a (d) descritos anteriormente, para su uso en la administración a un sujeto que tiene cáncer que expresa en exceso CDC45L. En otras palabras, la presente invención proporciona además un método de identificación de un sujeto que va a tratarse con un polipéptido CDC45L de la presente invención, incluyendo tal método la etapa de determinar un nivel de expresión de CDC45L en células derivadas del sujeto o tejido(s), en el que un aumento del nivel en comparación con un nivel de control normal del gen indica que el sujeto puede tener cáncer que puede tratarse con el polipéptido CDC45L de la presente invención. Los métodos de tratamiento de cáncer de la presente invención se describen con mayor detalle más adelante.

Puede usarse cualquier célula o tejido derivado del sujeto para la determinación de la expresión CDC45L, siempre que incluya el producto de transcripción o traducción objetivo de CDC45L. Ejemplos de muestras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, tejidos y líquidos corporales, tales como sangre, esputo y orina. Preferentemente, la muestra de célula o tejido derivada del sujeto contiene una población de células que incluye una célula epitelial, más preferentemente una célula epitelial cancerosa o una célula epitelial derivada de tejido que se sospecha será cancerosa. Además, si fuera necesario, la célula puede purificarse de los tejidos y líquidos corporales obtenidos, y entonces se usa como la muestra derivada del sujeto.

En el contexto de la presente invención, un nivel de control determinado de una muestra biológica que sabe que es no cancerosa se denomina un "nivel de control normal". Por otra parte, si el nivel de control se determina a partir de una muestra biológica cancerosa, se denomina un "nivel de control canceroso". La diferencia entre un nivel de expresión de muestra y un nivel de control puede normalizarse al nivel de expresión de los ácidos nucleicos de control, por ejemplo, genes de mantenimiento, cuyos niveles de expresión son conocidos por no ser diferentes dependiendo del estado canceroso o no canceroso de la célula. Genes de control a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a beta-actina, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y proteína ribosómica P1.

Un sujeto que va a tratarse por el presente método es preferentemente un mamífero. Mamíferos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, humano, primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo y vaca.

Según la presente invención, puede determinarse el nivel de expresión de CDC45L en células o tejidos obtenidos de un sujeto. El nivel de expresión puede determinarse al nivel del producto de transcripción (ácido nucleico) usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede cuantificarse el ARNm de CDC45L usando sondas mediante métodos de hibridación (por ejemplo, hibridación Northern). La detección puede llevarse a cabo en un chip, una matriz o similares. El uso de una matriz puede ser preferible para detectar el nivel de expresión de CDC45L. Aquellos expertos en la técnica pueden preparar tales sondas usando la información de secuencia de CDC45L. Por ejemplo, puede usarse el ADNc de CDC45L como las sondas. Si fuera necesario, las sondas pueden marcarse con una etiqueta adecuada, tal como colorantes, sustancias fluorescentes e isótopos, y puede detectarse el nivel de expresión del gen como la intensidad de las marcas hibridadas.

Además, el producto de transcripción de CDC45L (por ejemplo, SEQ ID NO: 17) puede cuantificarse usando cebadores por métodos de detección basados en amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Tales cebadores pueden prepararse basándose en la información de secuencia disponible del gen.

Específicamente, una sonda o cebador usado para el presente método se hibrida bajo condiciones rigurosas, moderadamente rigurosas o de baja rigurosidad para el ARNm de CDC45L. Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones (de hibridación) rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda o cebador se hibridará con su secuencia diana, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes bajo diferentes circunstancias. Se observa hibridación específica de secuencias más largas a temperaturas más altas que las secuencias más cortas. Generalmente, la temperatura de una condición rigurosa se selecciona para ser aproximadamente 5 °C más baja que el punto de fusión térmico (T_m) para una secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias a su secuencia diana se hibridan con la secuencia objetivo en equilibrio. Como las secuencias diana generalmente están presentes en exceso, a T_m, el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio. Normalmente, condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sales es inferior a ión de sodio aproximadamente 1,0 M, normalmente ión de sodio aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para sondas o cebadores cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas o cebadores más largos. También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de sustancias desestabilizantes, tales como formamida.

Alternativamente, el producto de traducción puede ser detectado para el diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, puede determinarse la cantidad de proteína CDC45L (SEQ ID NO: 18) o el fragmento inmunológico de la misma. Métodos de determinación de la cantidad de proteína como el producto de traducción incluyen métodos de inmunoensayo que usan un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Además, puede usarse cualquier fragmento o modificación (por ejemplo, anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo para la detección, siempre que el fragmento o anticuerpo modificado retenga la capacidad de unión a la proteína CDC45L. También se proporcionan tales anticuerpos contra los péptidos de la presente invención y los fragmentos de los mismos en la presente invención. Métodos de preparación de estos tipos de anticuerpos para la detección de proteínas son bien conocidos en la técnica, y puede emplearse cualquier método en la presente invención para preparar tales anticuerpos y equivalentes de los mismos.

Como otro método de detección del nivel de expresión del gen CDC45L basado en su producto de traducción, puede medirse la intensidad de tinción mediante análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo contra la proteína CDC45L. Concretamente, en esta medición, tinción fuerte indica la presencia/nivel elevado de la proteína, y al mismo tiempo, alto nivel de expresión del gen CDC45L.

Puede determinarse si el nivel de expresión de un gen diana, por ejemplo, el gen CDC45L, en células de cáncer es elevado si el nivel aumenta a partir del nivel de control (por ejemplo, el nivel en células normales) del gen diana, por ejemplo, 10 %, 25 %, o 50 %; o aumenta a más de 1,1 veces, más de 1,5 veces, más de 2,0 veces, más de 5,0 veces, más de 10,0 veces, o más.

El nivel de control puede determinarse al mismo tiempo que las células de cáncer usando una muestra(s) previamente recolectada(s) y almacenada(s) en un sujeto(s) cuyo estado(s) de enfermedad (canceroso o no canceroso) es/son conocidos. Además, pueden usarse células normales obtenidas de regiones no cancerosas de un órgano que tiene el cáncer que va a tratarse como el control normal. Alternativamente, puede determinarse el nivel

de control por un método estadístico basado en los resultados obtenidos analizando nivel(es) de expresión previamente determinado(s) del gen CDC45L en muestras de sujetos cuyos estados de enfermedad son conocidos. Además, el nivel de control puede derivarse de una base de datos de patrones de expresión de células previamente probadas. Además, según un aspecto de la presente invención, puede compararse el nivel de expresión del gen CDC45L en una muestra biológica con los niveles de control múltiples determinados a partir de muestras de referencia múltiples. Se prefiere usar un nivel de control determinado de una muestra de referencia derivada de un tipo de tejido similar al de la muestra biológica derivada del sujeto. Además, se prefiere usar el valor estándar de los niveles de expresión del gen CDC45L en una población con un estado de enfermedad conocido. El valor estándar puede obtenerse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un intervalo de media $\pm$ 2 D.E. o media $\pm$ 3 D.E. como valor estándar.

Cuando el nivel de expresión del gen CDC45L aumenta en comparación con el nivel de control normal, o es similar/equivalente al nivel de control canceroso, el sujeto puede ser diagnosticado con el cáncer que va a tratarse. La presente invención también proporciona un método de (i) diagnosticar si un sujeto del que se sospecha que tiene el cáncer que va a tratarse y/o (ii) seleccionar un sujeto para tratamiento de cáncer, método que puede incluir las etapas de:

- a) determinar el nivel de expresión de CDC45L en células o tejido(s) obtenidos de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que va a tratarse;
- b) comparar el nivel de expresión de CDC45L con un nivel de control normal;
- c) diagnosticar al sujeto como que tiene el cáncer que va a tratarse, si el nivel de expresión de CDC45L aumenta en comparación con el nivel de control normal; y
- d) seleccionar al sujeto para el tratamiento de cáncer, si el sujeto es diagnosticado como que tiene el cáncer que va a tratarse, en la etapa c).

Alternativamente, dicho método puede incluir las etapas de:

- a) determinar el nivel de expresión de CDC45L en células o tejido(s) obtenidos de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que va a tratarse;
- b) comparar el nivel de expresión de CDC45L con un nivel de control canceroso;
- c) diagnosticar al sujeto como que tiene el cáncer que va a tratarse, si el nivel de expresión de CDC45L es similar o equivalente al nivel de control canceroso; y
- d) seleccionar al sujeto para el tratamiento de cáncer, si el sujeto es diagnosticado como que tiene el cáncer que va a tratarse, en la etapa c).

La presente invención también proporciona un kit de diagnóstico para diagnosticar o determinar un sujeto que se sospecha que padece cáncer que puede ser tratado con el polipéptido CDC45L de la presente invención, que puede también encontrar uso en la evaluación del pronóstico de cáncer y/o monitorización de la eficacia o aplicabilidad de una terapia de cáncer particular, más particularmente una inmunoterapia de cáncer. Ejemplos ilustrativos de los cánceres adecuados incluyen, pero no se limitan a, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal. Más particularmente, el kit puede incluir preferentemente al menos un reactivo para detectar la expresión del gen CDC45L en una célula derivada de sujeto, siendo tal reactivo seleccionado del grupo de:

- (a) un reactivo para detectar ARNm del gen CDC45L;
- (b) un reactivo para detectar la proteína CDC45L o el fragmento inmunológico del mismo; y
- (c) un reactivo para detectar la actividad biológica de la proteína CDC45L.

Ejemplos de reactivos adecuados para detectar ARNm del gen CDC45L pueden incluir ácidos nucleicos que se unen específicamente a o identifican el ARNm de CDC45L, tal como oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a una porción del ARNm de CDC45L. Estos tipos de oligonucleótidos se ejemplifican por cebadores y sondas que son específicos para el ARNm de CDC45L. Estos tipos de oligonucleótidos pueden prepararse basándose en métodos muy conocidos en la técnica. Si es necesario, el reactivo para detectar el ARNm de CDC45L puede ser inmovilizado en una matriz sólida. Además, puede estar incluido en el kit más de un reactivo para detectar el ARNm de CDC45L.

Por otra parte, ejemplos de reactivos adecuados para detectar la proteína CDC45L o el fragmento inmunológico de la misma pueden incluir anticuerpos para la proteína CDC45L o el fragmento inmunológico de la misma. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Además, puede usarse cualquier fragmento o modificación (por ejemplo, anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo como el reactivo, siempre que el

fragmento o anticuerpo modificado retengan la capacidad de unión a la proteína CDC45L o el fragmento inmunológico de la misma. Métodos de preparación de estos tipos de anticuerpos para la detección de proteínas son muy conocidos en la técnica, y puede emplearse cualquier método en la presente invención para preparar anticuerpos y equivalentes de los mismos. Además, el anticuerpo puede marcarse con moléculas de generación de señal a través de enlace directo o una técnica de marcado indirecto. Marcas y métodos de marcado de anticuerpos y detección de la unión de los anticuerpos a sus dianas son muy conocidos en la técnica, y puede emplearse cualquier marca y método para la presente invención. Además, puede incluirse en el kit más de un reactivo para detectar la proteína CDC45L.

El kit puede contener más de uno de los reactivos anteriormente mencionados. El kit puede incluir además una matriz sólida y un reactivo para unir una sonda contra un gen CDC45L o anticuerpo contra un péptido CDC45L, un medio y recipiente para cultivar células, reactivos de control positivo y negativo, y un anticuerpo secundario para detectar un anticuerpo contra un péptido CDC45L. Por ejemplo, las muestras de tejido obtenidas de los sujetos sin cáncer o que padecen cáncer pueden servir de reactivos de control útiles. Un kit de la presente invención puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluye tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos (por ejemplo, por escrito, cinta, CD-ROM, etc.) con instrucciones para uso. Estos reactivos y similares pueden ser retenidos en un recipiente con una etiqueta. Recipientes adecuados pueden incluir botellas, frascos y tubos de ensayo. Los recipientes pueden ser formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

Como una realización de la presente invención, cuando el reactivo es una sonda contra el ARNm de CDC45L, el reactivo puede ser inmovilizado en una matriz sólida, tal como una tira porosa, para formar al menos un sitio de detección. La región de medición o de detección de la tira porosa puede incluir una pluralidad de sitios, conteniendo cada uno un ácido nucleico (sonda). Una tira reactiva también puede contener sitios para controles negativos y/o positivos. Alternativamente, los sitios de control pueden localizarse en una tira separada de la tira reactiva. Opcionalmente, los diferentes sitios de detección pueden contener diferentes cantidades de ácidos nucleicos inmovilizados, es decir, una mayor cantidad en el primer sitio de detección y cantidades menores en sitios posteriores. Tras la adición de una muestra de prueba, el número de sitios que presentan una señal detectable proporciona una indicación cuantitativa de la cantidad de ARNm de CDC45L presente en la muestra. Los sitios de detección pueden estar configurados en cualquier forma adecuadamente detectable y normalmente están en forma de una barra o punto que abarca la anchura de una tira reactiva.

El kit de la presente invención puede además incluir una muestra de control positivo o una muestra estándar de CDC45L. La muestra de control positivo de la presente invención puede prepararse recolectando muestras CDC45L positivas y posteriormente ensayando sus niveles de CDC45L. Alternativamente, puede añadirse una proteína CDC45L purificada o polinucleótido a las células que no expresan CDC45L para formar la muestra positiva o la muestra estándar de CDC45L. En la presente invención, la CDC45L purificada puede ser una proteína recombinante. El nivel de CDC45L de la muestra de control positiva es, por ejemplo, superior al valor de corte.

En una realización, la presente invención proporciona además un kit de diagnóstico que incluye una proteína o una proteína parcial de la misma capaz de reconocer específicamente el anticuerpo de la presente invención o un fragmento inmunogénico de la misma.

Ejemplos de péptidos parciales y fragmentos inmunogénicos de proteínas de la presente invención contemplados en el presente documento incluyen polipéptidos compuestos de al menos 8, preferentemente 15 y más preferentemente 20 aminoácidos contiguos en la secuencia de polipéptidos de la proteína de la presente invención. El cáncer puede ser diagnosticado detectando un anticuerpo en una muestra (por ejemplo, sangre, tejidos) usando una proteína o un péptido (polipéptido) de la presente invención. Métodos de preparación de un péptido o proteína de la presente invención son como se describieron anteriormente. El método de diagnóstico de cáncer de la presente invención puede realizarse determinando la diferencia entre la cantidad de anticuerpo anti-CDC45L y aquella en la muestra de control correspondiente, como se describió anteriormente. Se sospecha que el sujeto padece cáncer si las células o tejidos del sujeto contienen anticuerpos contra los productos de expresión (CDC45L) del gen y se determina que la cantidad del anticuerpo anti-CDC45L es superior al valor de corte en nivel en comparación con aquella del control normal.

En otra realización, un kit de diagnóstico de la presente invención puede incluir el péptido de la presente invención y una molécula HLA que se une al mismo. Ya se ha establecido un método adecuado de detección CTL específicos de antígeno usando péptidos antigénicos y moléculas HLA (por ejemplo, Altman JD et al., Science, 1996, 274(5284): 94-6). Así, el complejo del péptido de la presente invención y la molécula HLA puede aplicarse al método de detección para detectar CTL específicos de antígeno de tumor, permitiendo así la detección temprana, reaparición y/o metástasis de cáncer. Además, puede emplearse para la selección de sujetos aplicables con los productos farmacéuticos que incluyen el péptido de la presente invención como principio activo, o la evaluación del efecto del tratamiento de los productos farmacéuticos.

Particularmente, según el método conocido (véase, por ejemplo, la publicación de Altman JD et al., Science, 1996, 274(5284): 94-6), puede prepararse el complejo de oligómero, tal como tetrámero de la molécula HLA radiomarcada

y el péptido de la presente invención. El complejo puede usarse para cuantificar los CTL específicos de antígeno-péptido en los linfocitos de sangre periférica derivados del sujeto que se sospecha que padece de cáncer.

La presente invención proporciona además métodos y agentes de diagnóstico para evaluar la respuesta inmunológica del sujeto usando epítopes de péptido como se describen en el presente documento. En una realización de la invención, los péptidos restringidos por HLA como se describen en el presente documento pueden usarse como reactivos para evaluar o predecir una respuesta inmunitaria de un sujeto. La respuesta inmunitaria que va a evaluarse puede ser inducida poniendo en contacto un inmunogén con células inmunocompetentes *in vitro* o *in vivo*. En ciertas realizaciones, las sustancias o composiciones empleadas como el reactivo pueden ser cualquier sustancia o composición que pueda producir la producción de CTL específicos de antígeno que reconocen y se unen al (a los) epítipo(s) del péptido. Los reactivos de péptidos no necesitan ser usados como el inmunogén. Los sistemas de ensayo que se usan para un análisis tal incluyen desarrollos técnicos relativamente recientes tales como tetrámeros, tinción para linfocinas intracelulares y ensayos de liberación de interferón, o ensayos ELISPOT. En una realización preferida, las células inmunocompetentes que se pondrán en contacto con el reactivo de péptido pueden ser células presentadoras de antígenos, que incluyen células dendríticas.

Por ejemplo, los péptidos de la presente invención pueden usarse en ensayos de tinción con tetrámero para evaluar células mononucleares de sangre periférica para la presencia de CTL específicos de antígeno tras la exposición a un antígeno de célula tumoral o un inmunogén. El complejo tetrámero de HLA puede usarse para visualizar directamente los CTL específicos de antígeno (véanse, por ejemplo, Ogg et al., *Science* 279: 2103-2106, 1998; y Altman et al., *Science* 174: 94-6, 1996) y determinar la frecuencia de la población de CTL específicos de antígeno en una muestra de células mononucleares de sangre periférica. Puede generarse un reactivo de tetrámero, tal como se describe más adelante, usando un péptido de la invención.

Un péptido que se une a una molécula HLA vuelve a plegarse en presencia de la cadena pesada de HLA correspondiente y beta-2-microglobulina para generar un complejo trimolecular. En el complejo, el extremo carboxilo de la cadena pesada se biotinila en un sitio que fue previamente modificado en la proteína. Entonces, se añade estreptavidina al complejo para formar un tetrámero que consiste en el complejo trimolecular y estreptavidina. Por medio de la estreptavidina fluorescentemente marcada, el tetrámero puede usarse para teñir células específicas de antígeno. Las células pueden entonces ser identificadas, por ejemplo, por citometría de flujo. Un análisis tal puede usarse con fines de diagnóstico o pronóstico. Las células mediante el procedimiento también pueden usarse para fines terapéuticos.

La presente invención también proporciona reactivos para evaluar las respuestas de memoria inmunitarias (véanse, por ejemplo, Berton et al., *J. Clin. Invest.* 100: 503-513, 1997 y Penna et al., *J. Exp. Med.* 174: 1565-1570, 1991) que incluyen los péptidos de la presente invención. Por ejemplo, pueden analizarse muestras de CMSP de individuos con cáncer que van a tratarse para la presencia de CTL específicos de antígeno usando péptidos específicos. Puede evaluarse una muestra de sangre que contiene células mononucleares cultivando las CMSP y estimulando las células con un péptido de la invención. Después de un período de cultivo adecuado, puede analizarse la población de células expandida, por ejemplo, para actividad de CTL.

Los péptidos también pueden usarse como reactivos para evaluar la eficacia de una vacuna. Pueden analizarse las CMSP obtenidas de un paciente vacunado con un inmunogén usando, por ejemplo, cualquier de los métodos descritos anteriormente. El paciente es tipificado HLA, y se seleccionan los reactivos de epítipo del péptido que reconocen las moléculas específicas de alelo presentes en el paciente para análisis. La inmunogenicidad de la vacuna indicarse por la presencia de los CTL específicos de epítipo en la muestra de CMSP. Los péptidos de la invención también pueden usarse para producir anticuerpos, usando técnicas muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY; y *Antibodies A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), que pueden tener uso como reactivos para diagnosticar, detectar o monitorizar el cáncer. Tales anticuerpos pueden incluir aquellos que reconocen un péptido en el contexto de una molécula de HLA, es decir, anticuerpos que se unen a un complejo de péptido-MHC.

Los péptidos y composiciones de la presente invención tienen varios usos adicionales, algunos de los cuales se describen en el presente documento. Por ejemplo, la presente invención proporciona un método de diagnóstico o detección de un trastorno caracterizado por la expresión de un polipéptido inmunogénico CDC45L. Tales métodos implican determinar la expresión de un péptido de unión a HLA CDC45L, o un complejo de un péptido de unión a HLA CDC45L y una molécula de clase I de HLA en una muestra biológica. La expresión de un péptido o complejo de péptido y una molécula de clase I de HLA puede determinarse o detectarse ensayando con un componente de unión para el péptido o complejo. En una realización preferida, un componente de unión para el péptido o complejo puede ser un anticuerpo que reconozca y se una específicamente al péptido. También puede probarse la expresión de CDC45L en una muestra biológica, tal como una biopsia de tumor, por protocolos de amplificación por PCR estándar usando cebadores de CDC45L. Se presenta en el presente documento un ejemplo de expresión de tumor y la divulgación adicional de las condiciones y cebadores a modo de ejemplo para la amplificación de CDC45L puede encontrarse en el documento W02003/27322.

Métodos de diagnóstico preferidos implican poner en contacto una muestra biológica aislada de un sujeto con un agente específico para el péptido de unión a HLA CDC45L para detectar la presencia del péptido de unión a HLA

CDC45L en la muestra biológica. Como se usa en el presente documento, "poner en contacto" significa colocar la muestra biológica en proximidad suficiente al agente y bajo condiciones apropiadas de, por ejemplo, concentración, temperatura, tiempo, fuerza iónica, para permitir la interacción específica entre el agente y el péptido de unión a HLA CDC45L que están presentes en la muestra biológica. En general, las condiciones para poner en contacto el agente con la muestra biológica son condiciones conocidas por aquellos expertos habituales en la materia para facilitar una interacción específica entre una molécula y su análogo (por ejemplo, una proteína y su análogo de receptor, un anticuerpo y su análogo de antígeno de proteína, un ácido nucleico y su análogo de secuencia complementaria) en una muestra biológica. Condiciones a modo de ejemplo para facilitar una interacción específica entre una molécula y su análogo se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.108.921, concedida a Low et al.

Los métodos de diagnóstico de la presente invención pueden realizarse en cualquiera o tanto *in vivo* como *in vitro*. Por consiguiente, la muestra biológica puede localizarse *in vivo* o *in vitro* en la presente invención. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser un tejido *in vivo* y el agente específico para el polipéptido inmunogénico CDC45L puede usarse para detectar la presencia de tales moléculas en el tejido. Alternativamente, la muestra biológica puede ser recolectada o aislada *in vitro* (por ejemplo, una muestra de sangre, biopsia de tumor, extracto de tejido). En una realización particularmente preferida, la muestra biológica puede ser una muestra que contiene células, más preferentemente, una muestra que contiene células tumorales recolectadas de un sujeto que va a diagnosticarse o tratarse.

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

XI. Anticuerpos

La presente invención proporciona además anticuerpos que se unen a péptidos de la presente invención. Los anticuerpos preferidos se unen específicamente a los péptidos de la presente invención y no se unirán (o se unirán débilmente) a un no péptido de la presente invención. Alternativamente, los anticuerpos se unen a péptidos de la presente invención, además de a los homólogos de los mismos. Los anticuerpos contra los péptidos de la presente invención pueden encontrar uso en ensayos de diagnóstico y pronóstico de cáncer, y metodologías de generación de imagen. Similarmemente, tales anticuerpos pueden encontrar uso en el tratamiento, diagnóstico y/o pronóstico de otros cánceres, hasta el punto que CDC45L también se exprese o exprese en exceso en un paciente con cáncer. Además, los anticuerpos intracelularmente expresados (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios) pueden encontrar uso terapéutico en el tratamiento de cánceres en los que participe la expresión de CDC45L, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal.

La presente divulgación también proporciona diversos ensayos inmunológicos para la detección y/o cuantificación de la proteína CDC45L (SEQ ID NO: 18) o fragmentos de la misma que incluyen un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Tales ensayos pueden incluir uno o más anticuerpos anti-CDC45L capaces de reconocer y unirse a la proteína CDC45L o fragmentos de la misma, según convenga. En el contexto de la presente invención, los anticuerpos anti-CDC45L que se unen al polipéptido CDC45L reconocen preferentemente el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Puede confirmarse una especificidad de unión de anticuerpo con una prueba de inhibición. Es decir, cuando la unión entre un anticuerpo que va a analizarse y la longitud completa del polipéptido CDC45L se inhibe en presencia de cualquier polipéptido de fragmento que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, se muestra que este anticuerpo se une específicamente al fragmento. En este contexto de la presente invención, tales ensayos inmunológicos se realizan dentro de diversos formatos de ensayo inmunológico muy conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, diversos tipos de radioinmunoensayos, técnica de inmunocromatografía, enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), enzoinmunoanálisis de fluorescencia (ELIFA), y similares.

Los ensayos inmunológicos relacionados pero no de anticuerpo de la presente invención pueden también incluir ensayos de inmunogenicidad de linfocitos T (inhibidores o estimulantes), así como ensayos de unión a MHC. Además, la presente invención contempla métodos de generación de imagen inmunológica capaces de detectar cánceres que expresan CDC45L, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, métodos de generación de imagen radioescintigráfica que usan anticuerpos marcados de la presente invención. Tales ensayos encuentran uso clínico en la detección, monitorización y diagnóstico de cánceres que expresan CDC45L, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal.

La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen a los péptidos de la invención. Un anticuerpo de la invención puede ser usado en cualquier forma, por ejemplo como un anticuerpo monoclonal o policlonal, y puede incluir además un antisuero obtenido inmunizando un animal, tal como un conejo con el péptido de la invención, todas las clases de anticuerpos policlonales o monoclonales, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados producidos por recombinación genética.

Un péptido de la invención usado como un antígeno para obtener un anticuerpo puede derivarse de cualquier especie de animal, pero preferentemente se deriva de un mamífero tal como un ser humano, ratón o rata, más preferentemente de un ser humano. Un péptido derivado de un ser humano puede obtenerse de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos desveladas en el presente documento.

Según la presente invención, el péptido que va a usarse como antígeno de inmunización puede ser una proteína completa o un péptido parcial de la proteína. Un péptido parcial puede incluir, por ejemplo, el fragmento del extremo amino (N) o extremo carboxi (C) de un péptido de la presente invención.

En el presente documento, un anticuerpo se define como una proteína que reacciona ya sea con la longitud completa o un fragmento de un péptido CDC45L. En una realización preferida, un anticuerpo de la presente invención puede reconocer péptido de fragmentos de CDC45L que consisten de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Métodos de síntesis de un oligopéptido son muy conocidos en la técnica. Después de la síntesis, los péptidos pueden ser opcionalmente purificados antes de usarse como un inmunógeno. En el contexto de la presente invención, el oligopéptido (por ejemplo, 9- o 10-mero) puede conjugarse o unirse a vehículos para potenciar la inmunogenicidad. La hemocianina de lapa californiana (KLH) es muy conocida como el vehículo. El método para conjugar KLH y el péptido también es muy conocido en la técnica.

Alternativamente, un gen que codifica un péptido de la presente invención o fragmento del mismo puede insertarse en un vector de expresión conocido, que entonces se usa para transformar una célula hospedadora como se describe en el presente documento. El péptido deseado o fragmento del mismo puede recuperarse del interior o exterior de las células hospedadoras por cualquier método convencional, y puede usarse posteriormente como antígeno. Alternativamente, pueden usarse como antígeno células completas que expresan el péptido o sus lisados o un péptido químicamente sintetizado.

Puede inmunizarse cualquier animal mamífero con el antígeno, pero preferentemente se tiene en cuenta la compatibilidad con las células parentales usadas para la fusión celular. En general, pueden usarse los animales de Rodentia, Lagomorpha o Primates. Animales de la familia Rodentia incluyen, por ejemplo, ratón, rata y hámster. Animales de la familia Lagomorpha incluyen, por ejemplo, conejo. Animales de la familia de Primates incluyen, por ejemplo, un mono catarrino (mono del viejo mundo) tal como *Macaca fascicularis*, mono Rhesus, babuino sagrado y chimpancés.

Se conocen en la técnica métodos de inmunización de animales con antígenos. La inyección intraperitoneal o inyección subcutánea de antígenos es un método convencional para la inmunización de mamíferos. Más específicamente, los antígenos pueden diluirse y suspenderse en una cantidad apropiada de solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, etc. Si se desea, la suspensión de antígeno puede mezclarse con una cantidad apropiada de un adyuvante estándar, tal como adyuvante completo de Freud, convertirse en emulsión y posteriormente administrarse a animales mamíferos. Preferentemente, es seguido por varias administraciones de antígeno mezclado con una cantidad apropiada de adyuvante incompleto de Freud durante 4 a 21 días. También puede usarse un vehículo apropiado para la inmunización. Después de la inmunización como antes, el suero puede examinarse por un método convencional para un aumento en la cantidad de anticuerpos deseados.

Pueden prepararse anticuerpos policlonales contra los péptidos de la presente invención recolectando sangre del mamífero inmunizado examinado para el aumento de anticuerpos deseados en el suero, y separando el suero de la sangre por cualquier método convencional. Los anticuerpos policlonales pueden incluir un suero que contiene los anticuerpos policlonales, así como la fracción que contiene los anticuerpos policlonales puede ser aislada del suero. Puede prepararse inmunoglobulina G o M a partir de una fracción que reconoce únicamente el péptido de la presente invención usando, por ejemplo, una columna de afinidad acoplada con el péptido de la presente invención, y adicionalmente purificando esta fracción usando la columna de proteína A o proteína G.

Para preparar anticuerpos monoclonales, se recolectan células inmunitarias de un mamífero inmunizado con el antígeno y se comprueba para el aumento del nivel de anticuerpos deseado en el suero, como se ha descrito anteriormente, y se someten a fusión celular. Las células inmunitarias usadas para la fusión celular pueden obtenerse preferentemente del bazo. Otras células parenterales preferidas que van a fusionarse con el inmunocito anterior incluyen, por ejemplo, células de mieloma de mamíferos, y más preferentemente células de mieloma que tienen una propiedad adquirida para la selección de células fusionadas por fármacos.

El inmunocito anterior y las células de mieloma pueden fusionarse según métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein et al. (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).

Los hibridomas resultantes obtenidos por la fusión celular pueden ser seleccionados cultivándolos en un medio de selección estándar, tal como medio HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo celular normalmente continúa en el medio HAT durante varios días a varias semanas, siendo el tiempo suficiente para permitir que todas las otras células, con la excepción del hibridoma deseado (células no fusionadas), mueran. Entonces, puede realizarse dilución limitante estándar para cribar y clonar una célula de hibridoma que produce el anticuerpo deseado.

Además del método anterior, en el que un animal no humano se inmuniza con un antígeno para preparar un hibridoma, linfocitos humanos tales como aquellos infectados por el virus EB pueden inmunizarse con un péptido, péptido que expresa células o sus lisados *in vitro*. Entonces, los linfocitos inmunizados se fusionan con células de mieloma derivadas de ser humano que son capaces de dividirse indefinidamente, tal como U266, dando un hibridoma que produce un anticuerpo humano deseado que es capaz de unirse al péptido (solicitud de patente japonesa publicada no examinada N.º Sho 63-17688).

Los hibridomas obtenidos se trasplantan posteriormente en la cavidad abdominal de un ratón y se extrae la ascitis. Los anticuerpos monoclonales obtenidos pueden purificarse, por ejemplo, por precipitación con sulfato de amonio, una columna de proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico DEAE o una columna de afinidad a la que se acopla el péptido de la presente invención. El anticuerpo de la presente invención puede usarse no solo para la purificación y detección del péptido de la presente invención, sino también como un candidato para agonistas y antagonistas del péptido de la presente invención. Alternativamente, una célula inmunitaria, tal como un linfocito inmunizado, que produce anticuerpos puede ser inmortalizada por un oncogén y usarse para preparar anticuerpos monoclonales.

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

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

Un anticuerpo puede modificarse por conjugación con una variedad de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). La presente invención proporciona tales anticuerpos modificados. El anticuerpo modificado puede obtenerse modificando químicamente un anticuerpo. Estos métodos de modificación son convencionales en el campo.

Alternativamente, un anticuerpo de la presente invención puede obtenerse como un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de un anticuerpo no humano y la región constante derivada del anticuerpo humano, o como un anticuerpo humanizado, que incluye la región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de un anticuerpo no humano, la región estructural (FR) y la región constante derivada de anticuerpo humano. Tales anticuerpos pueden prepararse según la tecnología conocida. La humanización puede realizarse sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1 536 (1988)). Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

También pueden usarse anticuerpos completamente humanos que incluyen regiones variables humanas, además de la región estructural humana y regiones constantes. Tales anticuerpos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas. Por ejemplo, los métodos *in vitro* implican el uso de genotecas recombinantes de fragmentos de anticuerpo humano presentados en bacteriófago (por ejemplo, Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)). Similarmente, pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 6.150.584, 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016.

Los anticuerpos obtenidos anteriormente pueden purificarse hasta homogeneidad. Por ejemplo, la separación y purificación del anticuerpo puede realizarse según los métodos de separación y purificación usados para proteínas

generales. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse y aislarse por el uso apropiadamente seleccionado y combinado de cromatografías en columna, tales como cromatografía de afinidad, filtro, ultrafiltración, precipitación por sales, diálisis, electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida e isoelectroenfoque (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero no están limitadas a lo anterior. Pueden usarse una columna de proteína A y una columna de proteína G como la columna de afinidad. Columnas de proteína A a modo de ejemplo que van a usarse incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharose F.F. (Pharmacia).

La cromatografía a modo de ejemplo, con la excepción de la afinidad, incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración de gel, cromatografía de fase de reversa, cromatografía de adsorción y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Los procedimientos cromatográficos pueden llevarse a cabo mediante cromatografía de fase líquida, tal como HPLC y FPLC.

Por ejemplo, puede usarse la medición de absorbancia, ensayo inmunoanalítico de adsorción (ELISA), ensayo enzimático (EIA), radioensayo (RIA) y/o inmunofluorescencia para medir la actividad de unión al antígeno del anticuerpo de la invención. En el ELISA, el anticuerpo de la presente invención se inmoviliza en una placa, un péptido de la invención se aplica a la placa, y entonces se aplica una muestra que contiene un anticuerpo deseado, tal como un sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpo o anticuerpos purificados. Entonces, se aplica un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario y se marca con una enzima tal como fosfatasa alcalina, y se incuba la placa. A continuación, después de lavar, se añade a la placa un sustrato de enzima, tal como fosfato de p-nitrofenilo, y se mide la absorbancia para evaluar la actividad de unión al antígeno de la muestra. Puede usarse un fragmento del péptido, tal como un fragmento del extremo C o extremo N como el antígeno para evaluar la actividad de unión del anticuerpo. Puede usarse BIAcore (Pharmacia) para evaluar la actividad del anticuerpo según la presente invención.

Los métodos anteriores permiten la detección o medición de un péptido de la invención, exponiendo un anticuerpo de la invención a una muestra que se supone contiene un péptido de la invención, y detectando o midiendo el inmunocomplejo formado por el anticuerpo y el péptido.

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

XII. Vectores y células hospedadoras

La presente invención también proporciona un vector y célula hospedadora en la que se introduce un nucleótido que codifica el péptido de la presente invención. Puede usarse un vector de la presente invención para mantener un nucleótido, especialmente un ADN, de la presente invención en la célula hospedadora, para expresar un péptido de la presente invención, o para administrar un nucleótido de la presente invención para terapia génica.

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

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

Con el objeto de expresar el vector en células de animales, tales como células CHO, COS o NIH3T3, el vector debe tener un promotor necesario para la expresión en tales células, por ejemplo, el promotor SV40 (Mulligan et al., Nature 277: 108 (1979)), el promotor MMLV-LTR, el promotor alfa EF1 (Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990)), el promotor de CMV y similares, y preferentemente un gen marcador para seleccionar transformantes (por ejemplo, un gen de resistencia a fármaco seleccionado por un fármaco (por ejemplo, neomicina, G418)). Ejemplos de vectores conocidos con estas características incluyen, por ejemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o pruebas de la presente invención, se describen métodos y materiales adecuados.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar a un experto en la técnica en la elaboración y uso de la misma. Los ejemplos no pretenden de ningún modo limitar de forma alguna el alcance de la invención.

Ejemplos

Materiales y métodos

Análisis de micromatrices de ADNc

Se generaron perfiles de expresión génica por análisis de micromatrices de ADNc, como se describió previamente (Nakamura T et al., Oncogene 2004;23:2385-400, Taniwaki M et al., Int J Oncol 2006;29:567-75). Los datos sin procesar del análisis de micromatrices están disponibles bajo solicitud al Profesor Y. Nakamura (Univ. Tokio, Inst. Med. Sci.). Las muestras de tejido de cánceres de pulmón y tejidos de pulmón normales no cancerosos adyacentes se obtuvieron de especímenes quirúrgicos, y todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado por escrito para participar en este estudio.

Ratones

Se compraron ratones hembra de seis semanas de edad diabéticos no obesos (NOD)/con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) de Charles River Laboratories, Japón. Los ratones se mantuvieron en el Centro de Recursos de Animales y Desarrollo de la Universidad de Kumamoto y se manipularon según las pautas para el cuidado de animales de la Universidad de Kumamoto.

Líneas celulares y expresión de HLA

Las líneas de células de cáncer de pulmón humano CDC45L y HLA-A*2402 positivas EBC-1 y Lu99 fueron amablemente proporcionadas por el Health Science Research Resources Bank (Tsukuba, Japón). Las células C1R-A2402, un transfectante de HLA-A*2402 de la línea de células linfoblastoides B humana C1R expresa una cantidad residual de molécula de clase I de HLA intrínseca (Karaki S, Kariyone A, Kato N, Kano K, Iwakura Y, Takiguchi M. HLA-B51 transgenic mice as recipients for production of polymorphic HLA-A, B-specific antibodies. Immunogenetics 1993;37:139-42)²⁶ fueron un generoso obsequio del Dr. Masafumi Takiguchi (Universidad de Kumamoto, Kumamoto, Japón). Se compraron la línea de células de cáncer pancreático humano CDC45L positivas PANC1 (HLA-A*0201+, HLA-A*2402-) y la línea de células T2 deficiente en TAP y HLA-A*0201 positivas de Riken Cell Bank. La expresión de HLA-A2 y HLA-A24 se examinó por citometría de flujo con un anticuerpo monoclonal anti- HLA-A2 (mAb), BB7.2 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA), y mAb anti-HLA-A24 (One Lambda, Inc.), respectivamente, con el fin de seleccionar los donantes de sangre HLA-A24 y HLA-A2 positivos para los ensayos. Estas células se mantuvieron *in vitro* en medio RPMI 1640 complementado con 10 % de FCS en una atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C.

Pacientes, muestras de sangre y tejidos tumorales.

El protocolo de investigación para recolectar y usar CMSP de donantes fue aprobado por el Comité de ética médica de la Universidad de Kumamoto. Las muestras de sangre o tejido canceroso y tejidos no cancerosos adyacentes se obtuvieron de pacientes en el hospital de la Universidad de Kumamoto durante procedimientos de diagnóstico rutinarios después de obtener el consentimiento informado por escrito. Las muestras de sangre también se obtuvieron de donantes sanos después de recibir su consentimiento informado por escrito. Todas las muestras fueron codificadas aleatoriamente para enmascarar sus identidades, y las muestras de sangre se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

PCR con transcripción inversa y análisis de transferencia Northern.

El análisis de PCR con transcripción inversa (RT-PCR) de las líneas celulares y tejidos normales y cancerosos se realizó como se ha descrito anteriormente (Nakatsura T et al., Biochem Biophys Res Commun 2001;281:936-44). Las secuencias de cebador de CDC45L fueron 5'-CTGGTGTTCACAGGCTGTCATGG-3' (SEQ ID NO: 19) (sentido) y 5'-CGCACACGGTTAGAAGAGGAG-3' (SEQ ID NO: 20) (antisentido). Después de la normalización mediante ARNm de beta-actina como control, los presentes inventores compararon la expresión de ARNm de CDC45L en los tejidos y líneas celulares. Se realizó un análisis de transferencia Northern como se describió

previamente usando una sonda de ADNc específica del gen CDC45L (correspondientes 1245 a 1867 pb) (Nakatsura T et al., Biochem Biophys Res Commun 2003;306:16-25).

Tinción inmunohistoquímica

Se realizó el examen inmunohistoquímico de CDC45L humano como se describió previamente con alguna modificación (Nakatsura T et al., Biochem Biophys Res Commun 2001;281:936-44). Brevemente, después de la desparafinación y rehidratación de secciones de tejido, se inactivó el peróxido endógeno con 0,3 % de peróxido de hidrógeno en metanol durante 15 min, y se redujo la unión no específica por incubación con el reactivo libre de suero de bloqueo de proteína (Dako) durante 10 min. Después de lavar con solución de tampón (0,1 % de Tween 20 y NaCl 0,5 M en tampón Tris-HCl 0,05 M), el anticuerpo primario (anticuerpo anti-CDC45L humano producido en conejos, dilución 1:100, HPA000614, purificado por afinidad, Sigma-Aldrich) diluido en una disolución A de inmunotinción Can Get Signal (R) (Toyobo Co., Osaka, Japón) se incubó con muestras durante la noche a 4 °C. Posteriormente, las secciones se aclararon cuidadosamente con disolución de tampón y se incubaron con un anticuerpo secundario (Labeled Polymer-HRP, anticuerpo anti-ratón y anti-conejo, Dako) a temperatura ambiente. Después de tres lavados con disolución de tampón, se realizó la reacción de tinción por incubación con una disolución de 3,3'-diaminobencidina (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako). Entonces, las rebanadas se contratiñeron ligeramente con hematoxilina, se deshidrataron en etanol y se aclararon en xileno. Se usaron secciones de los testículos que se sabía que expresaban CDC45L como controles positivos para el anticuerpo anti-CDC45L humano. Para controles negativos, los presentes inventores sustituyeron el anticuerpo primario con IgG de conejo normal.

Péptidos

Se seleccionaron péptidos derivados de CDC45L humano que llevan motivos de unión para moléculas codificadas por HLA-A*2402 usando el programa de software BIMAS (Bioinformatics and Molecular Analysis Section, Center for Information Technology, NIH, Bethesda, MD), y se sintetizaron 16 péptidos (10 nonámeros y 6 decámeros, pureza >95 %) (AnyGen, Gwangju, Corea) (Tabla 1). Los péptidos se disolvieron en sulfóxido de dimetilo a la concentración de 20 micro-g/ml y se guardaron a -80 °C. Se usaron dos péptidos de VIH, el péptido RYLRLDQQL restringido por HLA-A24 (SEQ ID NO: 21) (VIH-A24) y péptido SLYNTYATL restringido por HLA-A2 (SEQ ID NO: 22) (VIH-A2) como controles negativos (Komori H et al., Clin Cancer Res 2006;12:2689-97).

[Tabla 1]

Péptidos candidatos derivados de CDC45L humano que se predice que se unen a HLA-A24 (A*2402)

Péptido	Posición	Listado de restos de subsecuencia (SEQ ID NO:)	Puntuación de unión a HLA-A24*
CDC45L-A24-9-237-1	237-245	KYVTDVGVL (1)	600
CDC45L-A24-9-109-2	109-117	VYNDTQIKL (2)	396
CDC45L-A24-9-294-3	294-302	SYTAARFKL (3)	220
CDC45L-A24-9-556-4	556-564	KFLDALISL (4)	72
CDC45L-A24-9-328-5	328-336	KFQAMDISL (5)	60
CDC45L-A24-9-396-6	396-404	HFIQALDSL (6)	30
CDC45L-A24-9-370-7	370-378	KFLASDVVF (7)	30
CDC45L-A24-9-192-8	192-200	EYHGTSSAM (8)	25
CDC45L-A24-9-541-9	541-549	HFDLSVIEL (9)	22
CDC45L-A24-9-364-10	364-372	HFGFKHKFL (10)	20
CDC45L-A24-10-109-11	109-118	VYNDTQIKLL (11)	360
CDC45L-A24-10-556-12	556-565	KFLDALISLL (12)	86
CDC45L-A24-10-271-13	271-280	SFEYDLRLVL (13)	36
CDC45L-A24-10-313-14	313-322	EFLADMGLPL (14)	30
CDC45L-A24-10-21-15	21-30	LFVASDVDAL (15)	30

*Las puntuaciones de unión se calcularon usando el software BIMAS (http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform).

Generación de CTL humanos reactivos con CDC45L y ensayos de respuestas de CTL.

Se aislaron CMSP de donantes sanos japoneses HLA-A24 o HLA-A2 positivos y pacientes con cáncer de pulmón y se generaron las células dendríticas derivadas de monocitos periféricos (DC) como se describió previamente (Harao M et al., *Int J Cancer* 2008;123:2616-25, Naito K et al., *Int J Oncol* 2006;28:1481-9). Las DC se pulsaron con 20 micro-g/ml de los péptidos candidatos en presencia de 4 micro-g/ml de beta-2-microglobulina (Sigma-Aldrich) durante 2 h a 37 °C en AIM-V (Invitrogen) complementado con plasma autólogo inactivado por calor al 2 %. Entonces, las células se irradiaron (40 Gy) y se incubaron con los linfocitos T CD8⁺ aislados como se describió previamente (Imai K et al., *Clin Cancer Res* 2008;14:6487-95, Harao M et al., *Int J Cancer* 2008;123:2616-25). Se realizaron dos estimulaciones adicionales con blastos de PHA autólogos cargados con péptido en los días 7 y 14. Se generaron blastos de PHA como se describió previamente (Inoue M et al., *Immunol Lett* 2009;126:67-72), y estos blastos de PHA (5 X 10⁵) se pulsaron con 20 micro-g/ml de péptidos durante 3 h, se irradiaron (100 Gy) y se cultivaron con los 2X10⁶ linfocitos T CD8⁺ en presencia de 10 ng/ml de IL-7 recombinante humano (Wako, Osaka, Japón). Después de 2 días, los cultivos se complementaron con 20 UI/ml de IL-2 recombinante humana (PeproTec, Inc.).

Seis días después de la última estimulación, se investigaron las respuestas específicas de antígeno de los CTL inducidos. Se llevaron a cabo dos estimulaciones semanales adicionales con blastos de PHA autólogos cargados con péptido en el día 7 y 14. Se cultivaron células CD14⁺ CD8⁻ autólogas enriquecidas con linfocitos T CD4⁺ con PHA (2 micro-g/ml) e IL-2 recombinante humana (100 UI/ml) durante 2 días, y las células se lavaron con PBS y se cultivaron con IL-2 recombinante humana (100 UI/ml) durante tres días adicionales. Estos blastos de PHA (5 X 10⁵) se pulsaron con 50 micro-g/ml de péptidos durante 2 horas a 37 °C en AIM-V (Invitrogen) complementado con plasma autólogo inactivado por calor al 2 %. Entonces, las células se irradiaron (100 Gy) y se incubaron con los 2X10⁶ linfocitos T CD8⁺. Estos cultivos se establecieron en placas de 24 pocillos usando el medio complementado con 5 ng/ml de IL-7, IL-2 y IL-15 recombinante humana. Seis días después de la última estimulación, se investigaron las respuestas específicas de antígeno de los CTL inducidos por un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, ensayo de movilización de CD107a y ensayo de liberación de ⁵¹Cr como se describió previamente (Komori H et al. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2689-97) y más adelante.

Ensayo de movilización de CD107a

Para identificar la desgranulación de linfocitos T CD8⁺ estimulados con péptidos de epítipo, se analizó el CD107a expuesto en la superficie celular por citometría de flujo (Rubio V et al., *Nat Med* 2003;9:1377-82, Betts MR et al., *J Immunol Methods* 2003;281:65-78). Se realizó un ensayo de movilización de CD107a con un kit de detección de CD107a de inmunocito (MBL, Nagoya, Japón) según las instrucciones del fabricante. Los CTL inducidos se suspendieron a una concentración final de 2X10⁶ células/ml de AIM-V complementado con plasma autólogo inactivado por calor al 2 %, y se añadieron 150 micro-l de la suspensión celular a cada depósito de una microplaca de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadió el péptido derivado de CDC45L o péptido de VIH de control (1 micro-g/ml) como un estimulante y se añadieron a cada pocillo mAAb anti-CD107a humano marcado con FITC o IgG1 de ratón de control de isotipo marcado con FITC y monensina. Las células se cultivaron durante 5 h a 37 °C. Después del cultivo, las células se tiñeron con anti-CD8 humano conjugado con PE (Biolegend) y se analizaron por citometría de flujo (FACScan; BD Biosciences).

Generación de células inactivadas en CDC45L

Para inactivar la expresión de CDC45L en células de cáncer de pulmón, se añadieron ARN interferentes pequeños (ip) de CDC45L (ARNip de Cdc45 humano, sc-35044: un conjunto de tres ARNip de 20-25 nt específicos de diana; Santa Cruz) a una concentración final de 150 nM a células del 40-60 % confluentes. Se usó Lipofectamine (TM) 2000 (Invitrogen) para transfectar los ARNip en células, según las instrucciones del fabricante. Se usaron ARNip de GFP como control irrelevante. Las células tratadas se lavaron una vez con PBS, y las células adherentes se recolectaron 72 h después de la transfección y se usaron como las células diana para el ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Para investigar la capacidad del ARNip para suprimir la expresión de CDC45L, se realizó análisis de transferencia Western como se describió previamente (Nakatsura T et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:16-25). Se lavaron células de cáncer una vez con PBS 48 h después de la transfección, y las células adherentes se recolectaron y se lisaron para analizar los niveles de expresión de CDC45L para la comparación con aquellos de las células de control negativo. Se usó beta-actina como control interno. Se usó anticuerpo policlonal de conejo reactivo con CDC45L (sc-20685, Santa Cruz Biotechnology) como anticuerpo primario.

Respuestas de CTL humanos contra líneas de células de cáncer.

Se analizó la frecuencia de células que producen interferón (IFN)-gamma por 1X10⁵ CTL tras la estimulación con células Lu99 (1X10⁴/pocillo) o C1R-A2402 pulsadas con péptido y células T2 (1X10⁴/pocillo) por un ensayo ELISPOT (kit ELISPOT de IFN-gamma humano, BD Biosciences) como se describió previamente (Komori H et al., *Clin Cancer*

Res 2006;12:2689-97, Bourgault VI et al., Cancer Res 2004;64:8761-6). Los CTL se co-cultivaron con células de cáncer o C1R-A2402 pulsado con péptido y células T2 como células diana (5×10^3 /pocillo) a la relación de efectoras con respecto a diana indicada, y se realizó un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar como se describió previamente (Yokomine K et al., Int J Cancer 2009;126:2153-63, Monji M et al., Clin Cancer Res 2004;10:6047-57). Se realizó el

5 bloqueo de la clase I de HLA por el mAb anti-clase I de HLA humano, W6/32 (IgG2a, Santa Cruz Biotechnology), o la clase II de HLA por el mAb anti-HLA-DR humano (IgG2a, BD Biosciences) como se describió previamente (Komori H et al., Clin Cancer Res 2006;12:2689-97, Makita M et al., Clin Cancer Res 2002;8:2626-31).

Modelo de inmunoterapia de adoptiva

10 Se realizó inmunoterapia de adoptiva experimental como se describió previamente (Imai K et al., Clin Cancer Res 2008;14:6487-95, Komori H et al., Clin Cancer Res 2006; 12:2689-97). Brevemente, se inocularon por vía subcutánea células Lu99 (3×10^6 células/ratón) positivas para tanto CDC45L endógeno como HLA-A24 en los flancos derechos de ratones NOD/SCID. Cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 25 mm^2 en el día 7, las

15 líneas de CTL específicas de CDC45L inducidas a partir de los dos donantes sanos por estimulación *in vitro* con una mezcla de péptidos CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2), CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3) y CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) o las líneas de CTL inducidas por estimulación con el péptido de VIH restringido por HLA-A24 irrelevante se suspendieron en 100 micro-l de PBS y se inyectaron por vía intravenosa (4×10^6 células/ratón). La inyección intravenosa de CTL se repitió en el día 14. El tamaño del tumor se evaluó dos veces a la semana usando compases calibradores para medir dos diámetros perpendiculares.

Análisis estadístico.

20 Se usó la prueba de la t de Student bilateral para evaluar la significación estadística de diferencias en datos de ELISPOT y tamaños de los tumores entre los grupos de tratamiento. Se consideró que valores de p inferiores a 0,05 eran estadísticamente significativos. El análisis estadístico se realizó con un paquete de software estadístico comercial (StatView 5.0, Abacus Concepts, Calabasas, CA).

Resultados

25 Identificación de la expresión en exceso del gen CDC45L en cáncer de pulmón basándose en el análisis de micromatrices de ADNc.

Se usó una micromatriz de ADNc de amplio genoma que contenía 27.648 genes para examinar los perfiles de expresión génica de 18 tejidos de cáncer de pulmón y sus homólogos normales adyacentes. Los análisis de micromatrices de ADNc revelaron expresión marcadamente potenciada del gen CDC45L en tejidos de cáncer de

30 pulmón en los 12 pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas (relación de expresión relativa promedio: 163.087; intervalo: 81.204-369.309) y 4 de los 6 pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (relación de expresión relativa promedio: 15.170; intervalo: 0,08-40.131) (Tabla 2). Por tanto, se seleccionó CDC45L para ser caracterizado como un TAA novedoso de cáncer de pulmón. El nivel de expresión del gen CDC45L también se

35 potenció en la mayoría de varios otros tumores malignos, que incluyen cánceres de próstata, mama y vejiga, basándose en los análisis de micromatrices de ADNc (Tabla 2).

[Tabla 2]

Expresión en exceso del gen *CDC45L* en cáncer de pulmón y diversos tumores malignos investigados por análisis de micromatrices de ADNc.

Tejido canceroso	n	Tasa positiva* (%)	Relación de expresión relativa (media)
<u>Cáncer de pulmón de células pequeñas</u>	<u>12</u>	<u>100%</u>	<u>163.087</u>
Cáncer de próstata	3	100%	36.985
Cáncer de mama	8	75%	8.648
Cáncer de vejiga	13	69%	2.194
<u>Cáncer de pulmón de células no pequeñas</u>	<u>6</u>	<u>67%</u>	<u>15.170</u>
LMC	3	33%	8.606
Tumor de tejido blando	4	25%	9.258
Esófago	25	16%	2.378
Cáncer gástrico	3	0%	1

* Se consideró que la relación de expresión relativa (cáncer/tejido normal) > 5 era positiva.

Expresión de ARNm de CDC45L en tejidos normales, líneas de células de cáncer y tejidos de cáncer de pulmón.

Se analizó la expresión del gen CDC45L en tejidos normales al nivel de ARNm usando RT-PCR y un análisis de transferencia Northern. Un análisis de RT-PCR semicuantitativa de CDC45L en los tejidos normales reveló que se expresó débilmente únicamente en testículo y mama (Fig. 1A). Un análisis de transferencia Northern en tejidos normales usando ADNc de CDC45L como sonda reveló que no se expresó en veintidós órganos vitales, excepto en testículos (Fig. 1B), según los resultados del análisis de RT-PCR. A diferencia, la expresión del gen CDC45L se detectó en las nueve líneas de células de cáncer de pulmón usando un análisis de RT-PCR (Fig. 1C). Posteriormente, la expresión del gen CDC45L se analizó usando un análisis de RT-PCR en los tejidos de cáncer de pulmón. En 7 de los 8 pacientes con NSCLC, el ARNm de CDC45L se expresó fuertemente en tejidos de cáncer (Fig. 1D superior). Además, se analizó la expresión del gen CDC45L usando un análisis de RT-PCR en los tejidos de cáncer y sus homólogos normales adyacentes, que se extirparon quirúrgicamente. La expresión del gen CDC45L se detectó en los 4 tejidos de cáncer de pulmón, pero se detectó poca expresión en sus homólogos normales (Fig. 1D inferior). Además, los análisis de RT-PCR de diversas líneas de células de cáncer derivadas de cánceres gástrico, hepatobiliar, de mama, próstata y colorrectal revelaron que el gen CDC45L también se expresaba en muchas de estas líneas de células de cáncer (Fig. 1E).

Para investigar la expresión de CDC45L al nivel de proteína, se realizó el análisis inmunohistoquímico de tejidos de cáncer de pulmón y tejidos normales. Se estudiaron 26 muestras de tejidos de cáncer de pulmón, que consistían en 12 adenocarcinomas (7 de los 12 fueron carcinomas bronquioalveolares), 8 carcinomas de células escamosas y 6 carcinomas de células pequeñas. Las 26 muestras presentaron fuerte tinción nuclear de CDC45L y débil tinción citoplásmica (Fig. 1F). No se observó tinción ni tinción muy débil en tejidos de pulmón adyacentes normales (Fig. 1F). CDC45L se expresó en testículo, pero no se observó tinción o tinción muy débil en otros tipos de tejidos humanos adultos normales, que incluyen cerebro, corazón, hígado, riñón, estómago, intestino delgado, colon, páncreas, piel, bazo y timo (Fig. 1F y datos no mostrados). Conjuntamente, los niveles de expresión de proteína de CDC45L en cánceres de pulmón humanos fueron evidentemente muy superiores a aquellos en tejidos de adulto normales, con la excepción de testículo. Estos resultados son según los resultados de análisis de RT-PCR y de transferencia Northern (Fig. 1A, B y D).

Identificación de epítopes de CTL derivados de CDC45L y restringidos por HLA-A24 en donantes sanos.

Para identificar epítopes de CTL restringidos por HLA-A24 y derivados de CDC45L, se seleccionaron 16 péptidos candidatos que se predijo que tenían alta afinidad de unión a HLA-A24 según el software de predicción de unión a péptido HLA proporcionado por NIH BIMAS (Tabla 1). Para probar que el péptido podía inducir los CTL reactivos con péptido, se incubaron linfocitos T CD8⁺ seleccionados de las CMSP de donantes sanos con las DC derivadas de monocitos autólogos pulsadas con la mezcla de cuatro péptidos seleccionados de estos 16 péptidos CDC45L. Después de dos estimulaciones semanales adicionales con blastos de PHA autólogos cargados con péptido, se examinó la actividad citotóxica contra las células C1R-A*2402 pulsadas con péptido por un ensayo ELISPOT de IFN-gamma (Fig. 2). Los linfocitos T CD8⁺ seleccionados de las CMSP de dos donantes sanos HLA-A24 positivos se estimularon con DC derivadas de monocitos autólogos pulsadas con una mezcla de 4 de los 16 péptidos CDC45L. La frecuencia de linfocitos T CD8⁺ específicos para los péptidos derivados de CDC45L en las líneas de CTL resultantes se examinó por un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma (Fig. 3). Se estimularon controles de fondo con células C1R-A2402 pulsadas con el péptido VIH-A24 irrelevante. Las líneas de CTL generadas produjeron reproduciblemente una gran cantidad de IFN-gamma tras la estimulación con células C1R-A2402 pulsadas con los péptidos CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2),¹⁰⁹ VYNDTQIKL¹¹⁷, CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3),²⁹⁴ SYTAARFKL³⁰², CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4),⁵⁵⁶ KFLDALISL⁵⁶⁴, CDC45L-A24-9-370-7 (SEQ ID NO: 7),³⁷⁰ KFLASDVVF³⁷⁸ o CDC45L-A24-10-556-12 (SEQ ID NO: 12),⁵⁵⁶ KFLDALISLL⁵⁶⁵. Estos resultados sugieren que estos cinco péptidos derivados de CDC45L son inmunogénicos.

Para analizar además la capacidad estimulante de CTL de estos cinco péptidos inmunogénicos, se realizó un ensayo de movilización de CD107a para evaluar la secreción específica de antígeno del contenido de gránulos citolíticos por CTL (Rubio V et al., Nat Med 2003;9:1377-82, Betts MR et al. J Immunol Methods 2003;281:65-78). Se tiñó una proporción significativamente más alta de linfocitos T CD8⁺ por el mAb anti-CD107a cuando las líneas de CTL generadas por estimulación con uno de estos cinco péptidos inmunogénicos se re-estimularon con sus péptidos homólogos, en comparación con la re-estimulación con un péptido de VIH-A24 irrelevante (Fig. 4).

Establecimiento de líneas de CTL específicas para péptidos derivados de CDC45L en pacientes con cáncer de pulmón.

Se generaron CTL específicos de CDC45L a partir de las CMSP de pacientes con cáncer de pulmón positivas para HLA-A24 por estimulación con el péptido CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2), CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3), CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4), CDC45L-A24-9-370-7 (SEQ ID NO: 7) o CDC45L-A24-10-556-12 (SEQ ID NO: 12). Estas líneas de CTL produjeron una cantidad significativamente grande de IFN-gamma en respuesta a

péptidos derivados de CDC45L en ensayos ELISPOT de IFN-gamma (Fig. 5A). Además, estas líneas de CTL presentaron actividad citotóxica contra células C1R-A2402 pulsadas con los cinco péptidos derivados de CDC45L, pero no contra células C1R-A2402 pulsadas con el péptido VIH-A24 irrelevante, en ensayos de liberación de ⁵¹Cr (Fig. 5B). Estos resultados indican que estos CTL tuvieron una actividad citotóxica específica de péptido.

5 Procesamiento natural de epítopes de CTL de CDC45L en células de cáncer.

Se revisó la capacidad de estos CTL para destruir líneas de células de cáncer de pulmón humano que expresaron naturalmente tanto CDC45L como HLA-A24. Se usaron células Lu99 y EBC-1 (CDC45L+, HLA-A24+), células Lu99 y EBC-1 transfectadas con ARNip específico de CDC45L (CDC45L-, HLA-A24+), células Lu99 y EBC-1 transfectadas con ARNip de GFP de control (CDC45L+, HLA-A24+) (Fig. 5C) y células A549 (CDC45L+, HLA-A24-) como células diana. Como se muestra en la Fig. 5D, las líneas de CTL generadas a partir del donante sano 4 (panel inferior, izquierda) y el paciente 18 con cáncer de pulmón (panel inferior, derecha) por estimulación con péptidos CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2) y CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4), respectivamente, presentaron citotoxicidad contra células Lu99 y células Lu99 transfectadas con ARNip de GFP de control, pero no contra células Lu99 transfectadas con ARNip específico de CDC45L (paneles inferiores) y células A549 (panel inferior, izquierda). Similarmente, los CTL generados a partir del paciente 1 con cáncer de pulmón por estimulación con el péptido CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3) presentaron citotoxicidad para células EBC-1 y EBC-1 transfectadas con ARNip de GFP, pero no para células EBC-1 transfectadas con ARNip específico de CDC45L y células A549 (panel superior, izquierda). Por tanto, los CTL generados a partir de los pacientes 3 y 8 con cáncer de pulmón estimulados con y el péptido CDC45L-A24-9-370-7 (SEQ ID NO: 7) presentaron citotoxicidad para células EBC-1 y EBC-1 transfectadas con ARNip de GFP, pero no para células EBC-1 transfectadas con ARNip específicos de CDC45L y células A549 (panel superior, centro, derecha). Entre los cinco péptidos inmunogénicos derivados de CDC45L, tres, CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2), CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3) y CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4), provocaron CTL específicos de CDC45L que podrían lisar eficazmente células de cáncer de pulmón que expresaron naturalmente tanto CDC45L como HLA-A24. Estos resultados sugieren que estos tres péptidos derivados de CDC45L podrían procesarse naturalmente y presentarse en el contexto de moléculas HLA-A24 en células de cáncer.

Para confirmar que los CTL específicos para los tres péptidos derivados de CDC45L reconocen las células diana en un modo restringido por la clase I de HLA, se usó mAb específico para la clase I de HLA (W6/32) para bloquear el reconocimiento por CTL. La producción de IFN-gamma y la citotoxicidad se inhibieron significativamente por el mAb de bloqueo contra la clase I de HLA, pero no por el mAb anti-clase II de HLA de control (Fig. 6A y B). Estos resultados indican claramente que estos CTL inducidos reconocen células diana que expresan CDC45L endógeno en un modo restringido por la clase I de HLA.

El péptido CDC45L-9-556-4 (SEQ ID NO: 4), ⁵⁵⁶KFLDALISL⁵⁶⁴, puede inducir CTL restringidos por tanto HLA-A2 (A*0201) como HLA-A24 (A*2402)

Se predijo que el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4, también denominado en el presente documento CDC45L-A24-9-556-4), ⁵⁵⁶KFLDALISL⁵⁶⁴, tenía una alta afinidad de unión a no solo HLA-A24 (A*2402), sino también a HLA-A2 (A*0201), según el software de predicción de la unión HLA-péptido SYFPEITHI (Instituto de Inmunología, Universidad de Tubingen, Tubingen, Alemania, www.syfpeithi.de/). HLA-A*2402 es el alelo de clase I de HLA más frecuente en la población Japonesa, y HLA-A*0201 es uno de los alelos de HLA más comunes en diversos grupos étnicos, que incluyen asiáticos, africanos, afroamericanos y caucásicos (Browning M et al. Immunol Today 1996;17:165-70). Así, se planteó la hipótesis de que el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) fuera un epítipo de CTL común candidato restringido por tanto HLA-A2 como HLA-A24. Para determinar si el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) podía unirse a moléculas de HLA-A2, se realizó un ensayo de estabilización de HLA-A2 con células T2, como se describió previamente (Yokomine K et al., Int J Cancer 2009;126:2153-63). El péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) se unió a moléculas de HLA-A2 con una capacidad superior para estabilizar HLA-A2 en comparación con el péptido de VIH-A2, que se usó como control positivo (datos no mostrados). Así, se confirmó la unión real del péptido a HLA-A2.

A continuación, se generaron CTL específicos de CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) a partir de las CMSP de un donante sano positivo para HLA-A2 (A*0201) por estimulación con el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4). Las líneas de CTL generadas a partir del donante sano HLA-A2 positivo produjeron IFN-gamma específicamente en respuesta a la re-estimulación con células T2 pulsadas con el péptido (Fig. 7A). Además, las líneas de CTL generadas presentaron citotoxicidad contra células T2 pulsadas con el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4), pero no contra células T2 cargadas con el péptido de VIH-A2 irrelevante o células C1R-A2402 cargadas con el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) (Fig. 7B). Estos resultados indican que estos CTL mediaron en la citotoxicidad específica de péptido en un modo restringido por HLA-A2. Además, las líneas de CTL generadas podían lisar eficazmente células Panc1 que expresaron CDC45L endógeno y moléculas de HLA-A2 (A*0201), pero no HLA-A24, y la citotoxicidad se inhibió significativamente bloqueando el mAb contra la clase I de HLA (W6/32), pero no por el mAb anti-clase II de HLA de control, como se ha determinado por un ensayo de liberación de ⁵¹Cr (Fig. 7C).

Estos resultados indican claramente que el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) se procesó naturalmente a partir de la proteína CDC45L y se presentó no solo en el contexto de HLA-A24, sino también en el contexto de HLA-A2 para ser reconocido por los CTL inducidos por el péptido CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) (Fig. 5D, 6 y Fig. 7). Así, CDC45L-A2-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) es un epítipo de CTL común restringido por tanto HLA-A2 como HLA-A24, y este péptido se aplicará a inmunoterapia para más del 80 % de los pacientes japoneses con cáncer que expresa CDC45L.

Actividad antitumoral *in vivo* de CTL humanos reactivos con CDC45L en ratones NOD/SCID.

Para evaluar la eficacia terapéutica de la inoculación de CTL reactivos con CDC45L en ratones inmunodeprimidos implantados con células de cáncer de pulmón humano CDC45L positivas, se inocularon por vía subcutánea células Lu99 en ratones NOD/SCID. Después de 7 días, cuando los diámetros de tumor alcanzaron aproximadamente 5 X 5 mm, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con CTL humanos generados por la estimulación de linfocitos T CD8⁺ con DC derivadas de monocitos autólogos (día 0) y blastos de PHA autólogos (días 7 y 14) pulsados con una mezcla de péptidos CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2), CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3) y CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) o un péptido VIH-A24 irrelevante. Antes de la inoculación de CTL en ratones, se evaluó la actividad citotóxica específica de péptido de CTL (Fig. 8). Las líneas de CTL generadas a partir de dos donantes sanos que fueron HLA-A24 positivos produjeron IFN-gamma específicamente en respuesta a re-estimulación con células C1R-A2402 pulsadas con los péptidos, excepto por el péptido CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3) en el donante sano 5 (Fig. 8A). Además, la mezcla de péptidos CDC45L provocó CTL que podían lisar eficazmente células Lu99, y la citotoxicidad se inhibió significativamente bloqueando el mAb específico para la clase I de HLA en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr (Fig. 8B). Por otra parte, las líneas de CTL presentaron lisis específica contra C1R-A2402 pulsado con el péptido CDC45L-A24-9-109-2 (SEQ ID NO: 2), pero no contra C1R-A2402 pulsado con el péptido CDC45L-A24-9-294-3 (SEQ ID NO: 3), CDC45L-A24-9-556-4 (SEQ ID NO: 4) o el péptido VIH-A24 irrelevante en tanto el donante sano 4 como 5 (Fig. 8C).

Los tumores en los ratones inoculados con los CTL estimulados con CDC45L (n=5; media +/- desviación estándar [DE], 108 +/- 65 mm²) fueron significativamente más pequeños que aquellos de los ratones inoculados con los linfocitos T CD8⁺ inducidos con el péptido de VIH de control (n=5; media +/- DE, 271 +/- 94 mm²) o con PBS solo (n=5; media +/- DE, 297 +/- 44 mm²) en el día 42 después de la inoculación de células Lu99 (prueba de la t de Student bilateral, *P < 0,05, **P < 0,01; Fig. 8D). Los resultados indican claramente la eficacia de la terapia de transferencia adoptiva de CTL humanos específicos de CDC45L contra tumores humanos CDC45L positivos en ratones NOD/SCID.

En conclusión, se sugiere que el antígeno CDC45L es altamente inmunogénico y una diana prometedora para la inmunoterapia basada en péptido de cáncer de pulmón sin causar fenómenos autoinmunes.

Discusión

En el presente estudio, se identificó el TAA novedoso, ciclo de división celular tipo 45 (CDC45L), usando un análisis de micromatrices de ADNc de cáncer de pulmón. Los datos de micromatrices mostraron que CDC45L se expresó en exceso en cánceres de próstata, mama y de vejiga, además de en cáncer de pulmón. Según los datos obtenidos del análisis de micromatrices de ADNc de la expresión del gen CDC45L en tejidos de cáncer de pulmón, la expresión del gen CDC45L se detectó en los 4 tejidos de cáncer de pulmón, pero no en sus homólogos normales. Además, la expresión de CDC45L era apenas detectable en muchos órganos vitales, excepto en los testículos en los análisis de RT-PCR y de transferencia Northern en tejidos normales. Estos resultados sugieren que la dirección de CDC45L podría ser un enfoque inmunoterapéutico novedoso para estos cánceres, sin causar enfermedades autoinmunitarias.

También se encontró que los péptidos inmunogénicos derivados de CDC45L, CDC45L-A24-9-109-2, CDC45L-A24-9-204-3 y CDC45L-A24-9-556-4 podrían inducir CTL específicos de epítipo en ratones BALB/c inmunizados con péptidos emulsionados en adyuvante incompleto de Freund (datos no mostrados). Ratones BALB/c inmunizados con los péptidos derivados de CDC45L y restringidos por H2-Kd, CDC45L-A24-9-109-2 y CDC45L-A24-9-204-3 no presentaron cambios patológicos, tales como infiltración de linfocitos o destrucción de tejido, y no tuvieron signos de enfermedades autoinmunitarias, tales como pérdida de peso, diarrea y anomalías de la piel, durante un periodo de observación a largo plazo (datos no publicados). Estos resultados también indican que los péptidos derivados de CDC45L podrían inducir CTL reactivos con péptido *in vivo* sin causar enfermedades autoinmunitarias en ratones.

Es bien sabido que CDC45L tiene una función crítica en las etapas de inicio y prolongación de las etapas de replicación de ADN, por tanto, es difícil que se produzca la pérdida de CDC45L en células de cáncer. En un estudio previo, Pollok et al. mostraron que el nivel de proteína CDC45L era coherentemente más alto en células derivadas de cáncer humano en comparación con células humanas primarias, y la expresión de CDC45L está estrechamente asociada a poblaciones de células que proliferan (Polk S, et al. FEBS J 2007; 274: 3669-3684.). Estudios previos adicionales sugirieron que la regulación por incremento de CDC45L dependía del grado de displasia y el estado de los ganglios linfáticos (Li JN, et al. BMC Cancer 2008, 395: 1-8.). Además, Feng et al. informaron recientemente que la regulación por disminución de la expresión del gen CDC45L por el ARNip específico inhibió marcadamente el crecimiento de líneas de células de cáncer tales como células Hela y HepG2, sugiriendo que CDC45L era una diana útil para la terapia contra el cáncer (Feng D, et al. Cancer Res 2003; 63: 7356-7364.). Un informe reciente resumió

que la tasa de respuesta objetiva de la vacuna del cáncer en ensayos clínicos era baja (2,6 %) (Rosenberg S A, et al. Nat Med 2004;10: 909-15.). Un posible motivo es que se produce el escape inmunitario de células de cáncer atribuido a delección, mutación, o una regulación por disminución de los TAA, como consecuencia de la selección inmunitaria terapéuticamente conducida. Basándose en el punto de vista que las células tumorales no pueden perder antígenos que se requieren para la tumorigénesis, se considera CDC45L como un posible TAA candidato útil para la inmunoterapia contra el cáncer. En la presente invención, se identificaron cinco péptidos de epítipo de CDC45L restringidos por HLA-A24, CDC45L-A24-9-109-2, CDC45L-A24-9-294-3, CDC45L-A24-9-556-4, CDC45L-A24-9-370-7 y CDC45L-A24-10-556-12, que podrían generar CTL humanos restringidos por HLA-A24 de CMSP por la estimulación *in vitro* con los péptidos. Además, se encontró que los CTL reactivos con CDC45L también podrían generarse a partir de CMSP aisladas pacientes con cáncer de pulmón por estimulación con estos cinco péptidos. En cuatro péptidos de epítipo de CDC45L, CDC45L-A24-9-109-2, CDC45L-A24-9-294-3, CDC45L-A24-9-556-4 y CDC45L-A24-9-370-7, los CTL inducidos por péptido podían destruir no solo las células C1R-A*2402 pulsadas con el péptido homólogo, sino también las líneas de células de cáncer que expresan CDC45L en un modo restringido por HLA-A24. Estos datos sugieren que estos péptidos CDC45L son procesados naturalmente a partir de la proteína CDC45L en células de cáncer y presentados sobre la superficie celular en el contexto de moléculas HLA-A24 que van a ser reconocidas por los CTL. Se sabe que HLA-A24 (A*2402) es uno de los alelos de HLA más comunes en la población japonesa, con una frecuencia de antígeno estimada del 60 %, y también está presente en caucásicos, con una frecuencia de antígeno estimada del 10 %. También se ha sugerido que la identificación de los epítopes restringidos por HLA-A24 y epítopes de CTL derivados de CDC45L es útil para la inmunoterapia de muchos pacientes con cáncer de pulmón, a nivel mundial, especialmente en asiáticos (Date, Y., et al. Tissue Antigens, 1996; 47: 93-101).

En conclusión, los resultados desvelados en el presente documento sugieren que CDC45L es un TAA novedoso cuyos péptidos de epítipo podrían provocar CTL que pueden destruir células de cáncer que expresan tanto CDC45L como HLA-A24. Como CDC45L se expresa fuertemente en varios tipos de tumores malignos humanos que incluyen cánceres de pulmón, próstata, mama y vejiga, se sugiere, por tanto, que CDC45L es una diana prometedora de la inmunoterapia basada en péptidos para los tumores malignos descritos anteriormente, sin causar ningún fenómeno autoinmunitario.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona nuevos TAA, particularmente aquellos derivados de CDC45L, que pueden inducir respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas y tienen aplicabilidad para una amplia variedad de tipos de cáncer. Tales TAA pueden encontrar utilidad como vacunas de péptido contra enfermedades asociadas a CDC45L, por ejemplo, cáncer, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, leucemia mieloide crónica (LMC), tumor de tejido blando, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar y cáncer colorrectal.

Además, aunque la presente invención se describe en el presente documento en detalle y con referencia a realizaciones específicas de la misma, debe entenderse que la descripción anterior es a modo de ejemplo y de naturaleza explicativa y está prevista para ilustrar la presente invención y sus realizaciones preferidas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDOS CDC45L Y VACUNAS QUE INCLUYEN LOS MISMOS

<130> ONC-A0909P

<150> US 61/217.133

<151> 26-05-2009

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

	<210> 1	
	<211> 9	
	<212> PRT	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada	
10	<400> 1	
		Lys Tyr Val Thr Asp Val Gly Val Leu
		1 5
	<210> 2	
15	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada	
	<400> 2	
		Val Tyr Asn Asp Thr Gln Ile Lys Leu
		1 5
25	<210> 3	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada	
	<400> 3	
35		

ES 2 746 334 T3

Ser Tyr Thr Ala Ala Arg Phe Lys Leu
1 5

<210> 4

<211> 9

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 4

Lys Phe Leu Asp Ala Leu Ile Ser Leu
1 5

<210> 5

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 5

Lys Phe Gln Ala Met Asp Ile Ser Leu
1 5

25

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 6

35

ES 2 746 334 T3

His Phe Ile Gln Ala Leu Asp Ser Leu
1 5

<210> 7

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 7

Lys Phe Leu Ala Ser Asp Val Val Phe
1 5

<210> 8

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 8

Glu Tyr His Gly Thr Ser Ser Ala Met
1 5

25

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 9

35

ES 2 746 334 T3

His Phe Asp Leu Ser Val Ile Glu Leu
1 5

<210> 10

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

10

<400> 10

His Phe Gly Phe Lys His Lys Phe Leu
1 5

<210> 11

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 11

Val Tyr Asn Asp Thr Gln Ile Lys Leu Leu
1 5 10

25

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

35 <400> 12

ES 2 746 334 T3

Lys Phe Leu Asp Ala Leu Ile Ser Leu Leu
1 5 10

<210> 13

5

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 13

Ser Phe Glu Tyr Asp Leu Arg Leu Val Leu
1 5 10

15

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 14

25

Glu Phe Leu Ala Asp Met Gly Leu Pro Leu
1 5 10

<210> 15

<211> 10

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

35

ES 2 746 334 T3

<400> 15

Leu Phe Val Ala Ser Asp Val Asp Ala Leu
1 5 10

5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 16

Leu Phe Ser Arg Pro Ala Ser Leu Ser Leu
1 5 10

15

<210> 17

<211> 1938

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20

<400> 17

gatttggcgg	gagtcttgac	cgccgccggg	ctcttggtac	ctcagcgga	gcgccaggcg	60
tccggccgcc	gtggctatgt	tcgtgtccga	tttccgcaa	gagttctacg	aggtgggtcca	120
gagccagagg	gtccttctct	tcgtggcctc	ggacgtggat	gctctgtgtg	cgtgcaagat	180
ccttcaggcc	ttgttccagt	gtgaccacgt	gcaatatacg	ctggttccag	tttctgggtg	240

ES 2 746 334 T3

```

gcaagaactt gaaactgcat ttcttgagca taaagaacag tttcattatt ttatttctcat 300
aaactgtgga gctaattgtag acctattgga tattcttcaa cctgatgaag acactatatt 360
ctttgtgtgt gacacccata ggccagtcac tgctgtcaat gtatacaacg atacccagat 420
caaattactc attaaacaag atgatgacct tgaagttccc gcctatgaag acatcttcag 480
ggatgaagag gaggatgaag agcattcagg aaatgacagt gatgggtcag agccttctga 540
gaagcgcaca cggttagaag aggagatagt ggagcaaacc atgctggagga ggcagcggcg 600
agagtgggag gcccgagaga gagacatcct ctttgactac gagcagtatg aatatcatgg 660
gacatcgtca gccatggtga tgtttgagct ggcttggtat ctgtccaagg acctgaatga 720
catgctgtgg tgggccatcg ttggactaac agaccagtgg gtgcaagaca agatcactca 780
aatgaaatac gtgactgatg ttggtgtcct gcagcgcac gtttcccgcc acaaccaccg 840
gaacgaggat gaggagaaca cactctcctg ggactgcaca cggatctcct ttgagtatga 900
cctccgcctg gtgctctacc agcactggtc cctccatgac agcctgtgca acaccagcta 960
taccgcagcc aggttcaagc tgtggtctgt gcattggacag aagcggctcc aggagtctct 1020
tgcagacatg ggtcttcccc tgaagcaggt gaagcagaag ttccaggcca tggacatctc 1080
cttgaaggag aatttgcggy aaatgattga agagtctgca aataaatttg ggatgaagga 1140
catgcgcgtg cagactttca gcattcatct tgggttcaag cacaagtttc tggccagcga 1200
cgtggtcttt gccaccatgt ctttgatgga gagccccgag aaggatggct caggacaga 1260
tacttcatc caggctctgg acagctctc caggagtaac ctggacaagc tgtaccatgg 1320
cctggaactc gccagaagc agctgcgagc caccagcag accattgcca gctgcctttg 1380
caccaacctc gtcactctcc aggggccttt cctgtactgc tctctcatgg agggcactcc 1440
agatgtcatg ctgttctcta ggccggcatc cctaagcctg ctgagcaaac acctgctcaa 1500
gtcctttgtg tgttcgacaa agaaccggcg ctgcaaaactg ctgcccctgg tgatggctgc 1560
ccccctgagc atggagcatg gcacagtgc cgtggtgggc atccccccag agaccgacag 1620
ctcggacagg aagaactttt ttgggagggc gtttgagaag gcagcgaaa gcaccagctc 1680
ccgatgctg cacaaccatt ttgacctctc agtaattgag ctgaaagctg aggatcggag 1740
caagtttctg gacgcactta tttccctcct gtcctaggaa tttgattctt ccagaatgac 1800
cttcttattt atgtaactgg ctttcattta gattgtaagt tatggacatg atttgagatg 1860
tagaagccat tttttattaa ataaaatgct tattttaggc tccgtcccca aaaaaaaaaa 1920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1938

```

<210> 18

<211> 566

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 746 334 T3

Met	Phe	Val	Ser	Asp	Phe	Arg	Lys	Glu	Phe	Tyr	Glu	Val	Val	Gln	Ser	1	5	10	15
Gln	Arg	Val	Leu	Leu	Phe	Val	Ala	Ser	Asp	Val	Asp	Ala	Leu	Cys	Ala	20	25	30	
Cys	Lys	Ile	Leu	Gln	Ala	Leu	Phe	Gln	Cys	Asp	His	Val	Gln	Tyr	Thr	35	40	45	
Leu	Val	Pro	Val	Ser	Gly	Trp	Gln	Glu	Leu	Glu	Thr	Ala	Phe	Leu	Glu	50	55	60	
His	Lys	Glu	Gln	Phe	His	Tyr	Phe	Ile	Leu	Ile	Asn	Cys	Gly	Ala	Asn	65	70	75	80
Val	Asp	Leu	Leu	Asp	Ile	Leu	Gln	Pro	Asp	Glu	Asp	Thr	Ile	Phe	Phe	85	90	95	
Val	Cys	Asp	Thr	His	Arg	Pro	Val	Asn	Val	Val	Asn	Val	Tyr	Asn	Asp	100	105	110	
Thr	Gln	Ile	Lys	Leu	Leu	Ile	Lys	Gln	Asp	Asp	Asp	Leu	Glu	Val	Pro	115	120	125	
Ala	Tyr	Glu	Asp	Ile	Phe	Arg	Asp	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	His	Ser	130	135	140	
Gly	Asn	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Glu	Pro	Ser	Glu	Lys	Arg	Thr	Arg	Leu	145	150	155	160
Glu	Glu	Glu	Ile	Val	Glu	Gln	Thr	Met	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Glu	165	170	175	
Trp	Glu	Ala	Arg	Arg	Arg	Asp	Ile	Leu	Phe	Asp	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Glu	180	185	190	
Tyr	His	Gly	Thr	Ser	Ser	Ala	Met	Val	Met	Phe	Glu	Leu	Ala	Trp	Met	195	200	205	
Leu	Ser	Lys	Asp	Leu	Asn	Asp	Met	Leu	Trp	Trp	Ala	Ile	Val	Gly	Leu	210	215	220	
Thr	Asp	Gln	Trp	Val	Gln	Asp	Lys	Ile	Thr	Gln	Met	Lys	Tyr	Val	Thr	225	230	235	240

ES 2 746 334 T3

Asp	Val	Gly	Val	Leu	Gln	Arg	His	Val	Ser	Arg	His	Asn	His	Arg	Asn	245	250	255
Glu	Asp	Glu	Glu	Asn	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Cys	Thr	Arg	Ile	Ser	Phe	260	265	270
Glu	Tyr	Asp	Leu	Arg	Leu	Val	Leu	Tyr	Gln	His	Trp	Ser	Leu	His	Asp	275	280	285
Ser	Leu	Cys	Asn	Thr	Ser	Tyr	Thr	Ala	Ala	Arg	Phe	Lys	Leu	Trp	Ser	290	295	300
Val	His	Gly	Gln	Lys	Arg	Leu	Gln	Glu	Phe	Leu	Ala	Asp	Met	Gly	Leu	305	310	315
Pro	Leu	Lys	Gln	Val	Lys	Gln	Lys	Phe	Gln	Ala	Met	Asp	Ile	Ser	Leu	325	330	335
Lys	Glu	Asn	Leu	Arg	Glu	Met	Ile	Glu	Glu	Ser	Ala	Asn	Lys	Phe	Gly	340	345	350
Met	Lys	Asp	Met	Arg	Val	Gln	Thr	Phe	Ser	Ile	His	Phe	Gly	Phe	Lys	355	360	365
His	Lys	Phe	Leu	Ala	Ser	Asp	Val	Val	Phe	Ala	Thr	Met	Ser	Leu	Met	370	375	380
Glu	Ser	Pro	Glu	Lys	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	His	Phe	Ile	Gln	Ala	385	390	395
Leu	Asp	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Asn	Leu	Asp	Lys	Leu	Tyr	His	Gly	Leu	405	410	415
Glu	Leu	Ala	Lys	Lys	Gln	Leu	Arg	Ala	Thr	Gln	Gln	Thr	Ile	Ala	Ser	420	425	430
Cys	Leu	Cys	Thr	Asn	Leu	Val	Ile	Ser	Gln	Gly	Pro	Phe	Leu	Tyr	Cys	435	440	445
Ser	Leu	Met	Glu	Gly	Thr	Pro	Asp	Val	Met	Leu	Phe	Ser	Arg	Pro	Ala	450	455	460
Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Ser	Lys	His	Leu	Leu	Lys	Ser	Phe	Val	Cys	Ser	465	470	475
Thr	Lys	Asn	Arg	Arg	Cys	Lys	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Met	Ala	Ala	Pro	485	490	495

ES 2 746 334 T3

Leu Ser Met Glu His Gly Thr Val Thr Val Val Gly Ile Pro Pro Glu
500 505 510

Thr Asp Ser Ser Asp Arg Lys Asn Phe Phe Gly Arg Ala Phe Glu Lys
515 520 525

Ala Ala Glu Ser Thr Ser Ser Arg Met Leu His Asn His Phe Asp Leu
530 535 540

Ser Val Ile Glu Leu Lys Ala Glu Asp Arg Ser Lys Phe Leu Asp Ala
545 550 555 560

Leu Ile Ser Leu Leu Ser
565

<210> 19

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 19

ctggtgtgac acaggctgac atgg 24

<210> 20

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia artificial

<400> 20

cgcacacggt tagaagagga g 21

25 <210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 746 334 T3

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 21

5

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu
1 5

<210> 22

<211> 9

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

15

<400> 22

Ser Leu Tyr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu
1 5

20

<210> 23

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 23

gtctaccagg cattcgcttc at 22

30

<210> 24

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

	<223> Secuencia artificial	
	<400> 24	
5	tcagctggac cacagccgca gcgt	24
	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<400> 25	
15	tcagaaatcc ttctcttga c	21
	<210> 26	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
25	<400> 26	
	ctagcctctg gaatccttc tctt	24

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos y que tienen inducibilidad de linfocitos T citotóxicos (CTL), en el que dicho péptido es un fragmento inmunológicamente activo de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o un péptido modificado del mismo, y en el que dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) SEQ ID NO: 4; y
 - (b) SEQ ID NO: 4, en la que 1 o 2 aminoácidos están sustituidos.
2. El péptido aislado de la reivindicación 1, en el que dicho péptido tiene una o ambas de las siguientes características:
 - (a) el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en tirosina, metionina y triptófano; y
 - (b) el aminoácido del extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, isoleucina, triptófano y metionina.
3. El péptido aislado de la reivindicación 1, en el que dicho péptido tiene una o ambas de las siguientes características:
 - (a) el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO : 4 se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina y metionina; y
 - (b) el aminoácido del extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO : 4 se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina.
4. El péptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho péptido es un nonapéptido o decapeptido.
5. El péptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho péptido consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) SEQ ID NOs: 4; y
 - (b) SEQ ID NO: 4, en la que 1 o 2 aminoácidos están sustituidos.
6. Un polinucleótido aislado que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una composición para inducir una CTL, en la que la composición comprende uno o más del (de los) péptido(s) expuesto(s) en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o uno o más del (de los) polinucleótido(s) expuesto(s) en la reivindicación 6.
8. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de cánceres, y/o la prevención de la reaparición posoperatoria de los mismos, en la que la composición farmacéutica comprende uno o más (de los) péptido(s) expuesto(s) en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o uno o más del (de los) polinucleótido(s) expuesto(s) en la reivindicación 6.
9. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, que se formula para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A2.
10. Un método *in vitro* o *ex vivo* de inducción de una célula presentadora de antígenos (APC) con inducibilidad de CTL, en el que el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) poner en contacto una APC con el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 *in vitro* o *ex vivo*, y
 - (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en una APC *in vitro* o *ex vivo*.
11. Un método *in vitro* o *ex vivo* de inducción de una CTL, en el que el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) co-cultivar un linfocitos T CD8 positivo con una APC, que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
 - (b) co-cultivar un linfocitos T CD8 positivo con un exosoma, que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y

(c) introducir un polinucleótido que codifica una subunidad de receptor de linfocitos T (TCR) capaz de unirse al péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un linfocito T.

12. Una APC aislada que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

5 13. Un CTL aislado que dirige los péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

14. Una composición para su uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto, en la que la composición comprende uno o más péptido(s) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o uno o más polinucleótido(s) que codifica(n) el péptido.

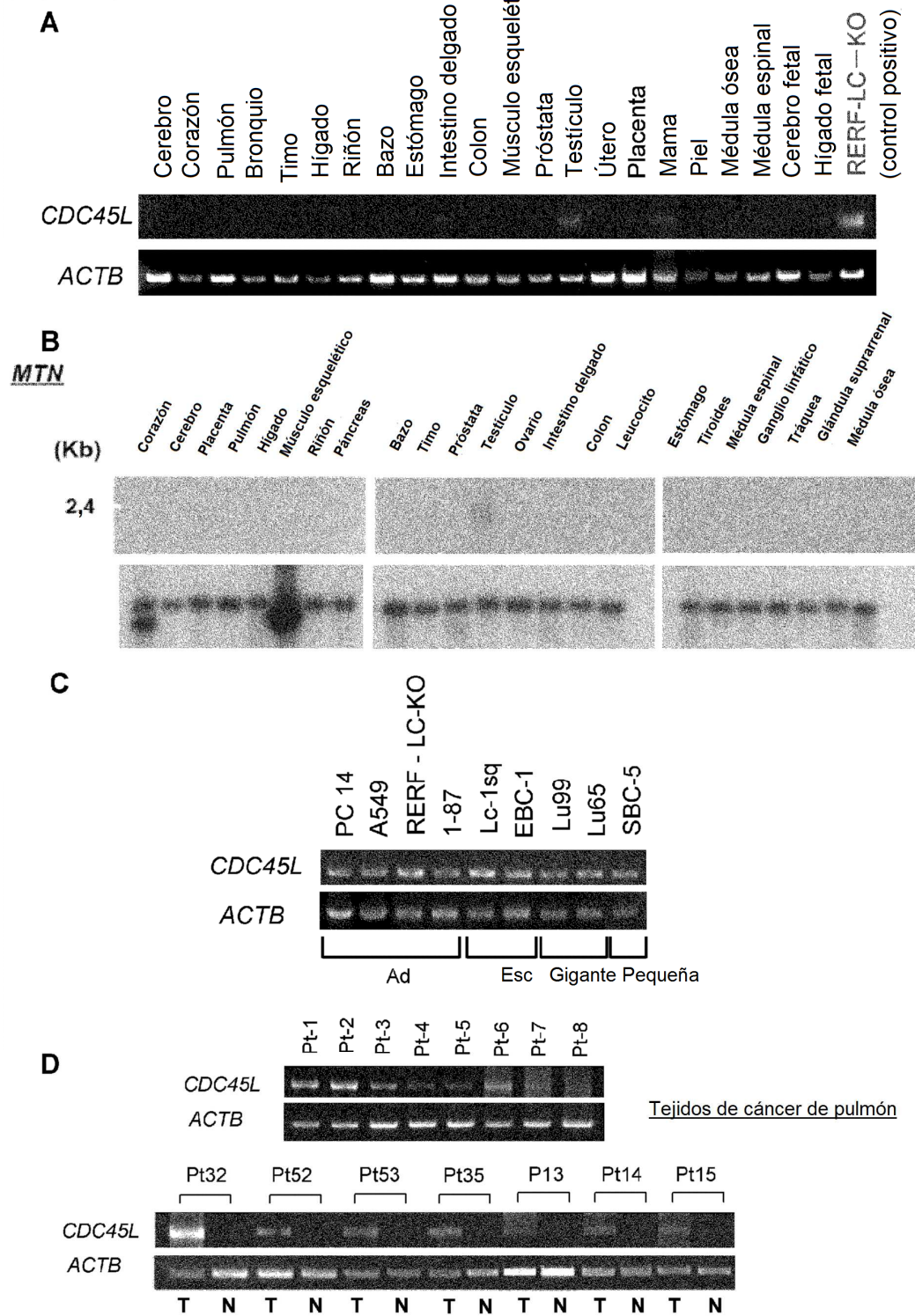
15. Un anticuerpo que se une específicamente al péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

10 16. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

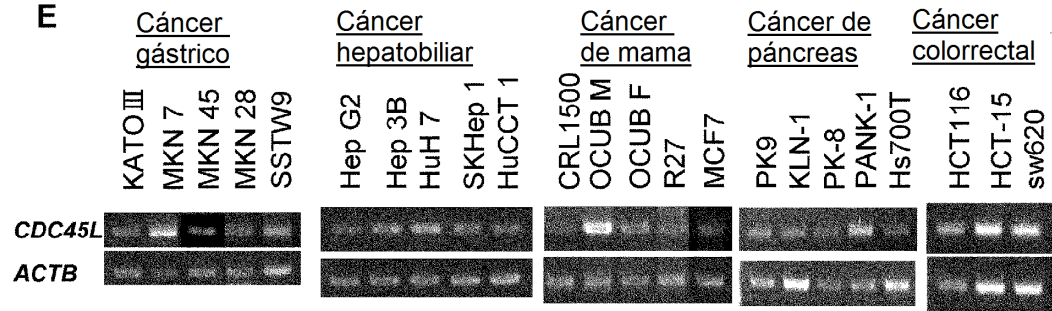
17. Una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión según la reivindicación 16.

18. Un kit de diagnóstico que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el polinucleótido de la reivindicación 6 o el anticuerpo de la reivindicación 15.

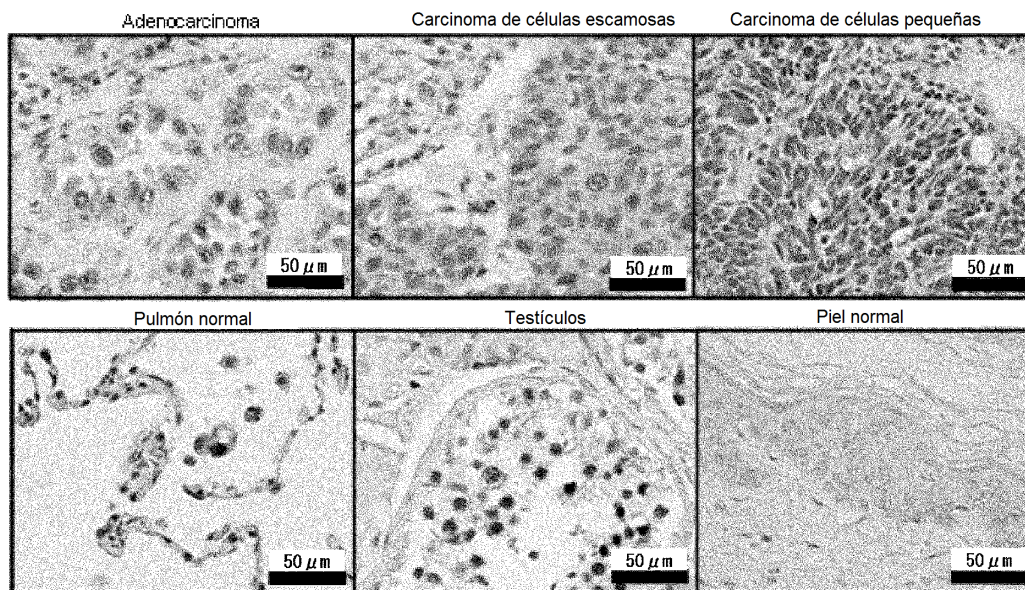
[Fig. 1a-d]



[Fig. 1e-f]

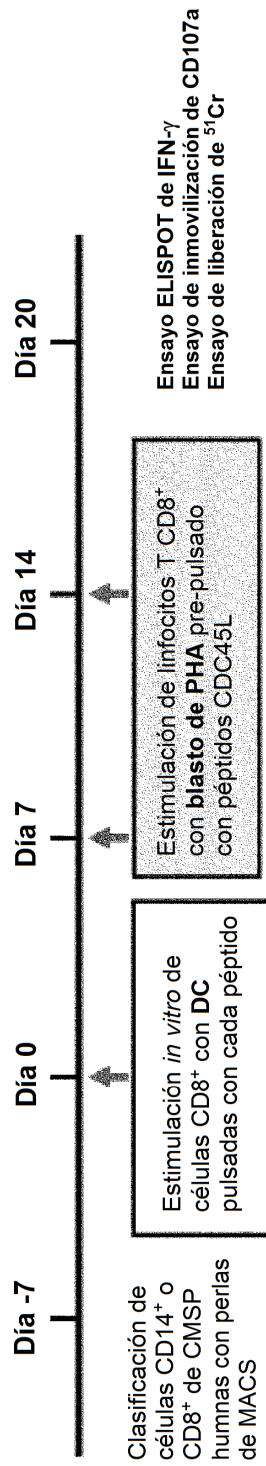


F



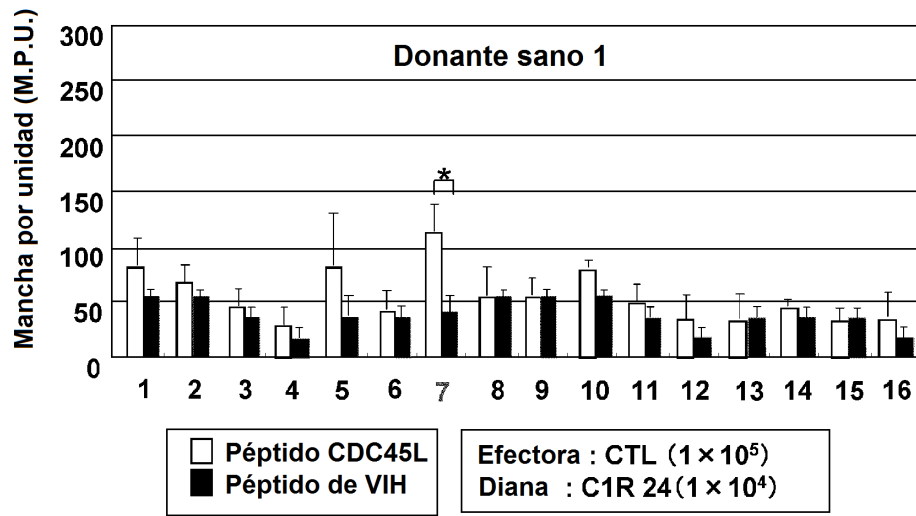
[Fig. 2]

Un protocolo para la inducción de CTL específicos de CDC45L de CMSP de donantes sanos *HLA-A*2402* positivos y pacientes con cáncer de pulmón.

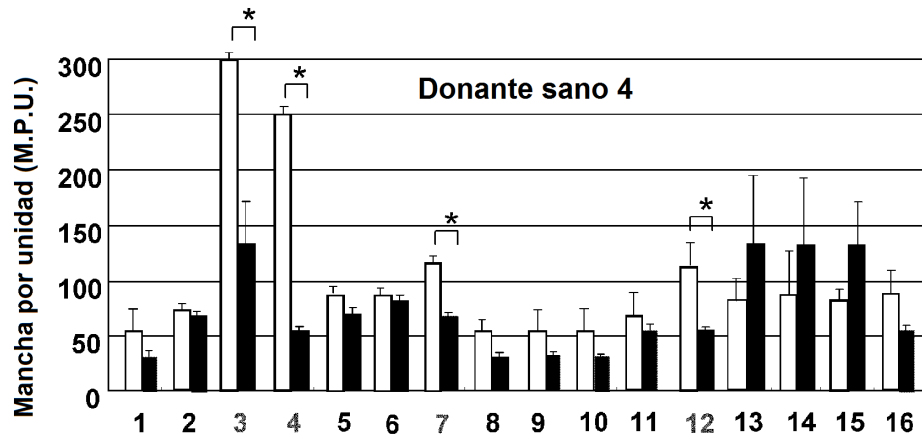


[Fig. 3]

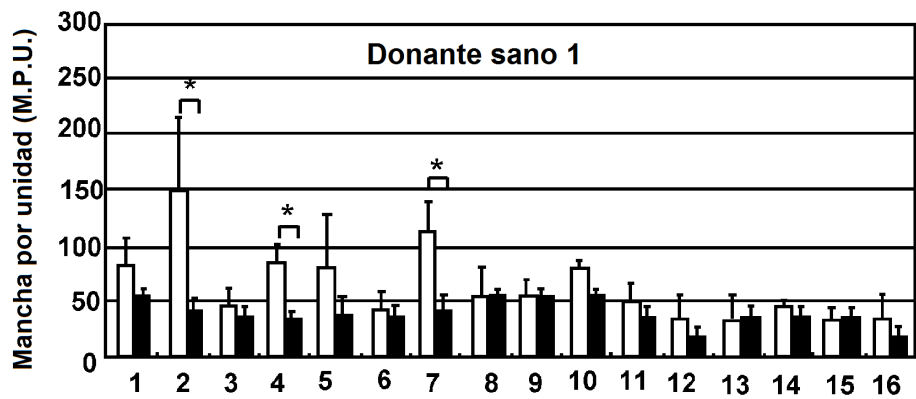
A



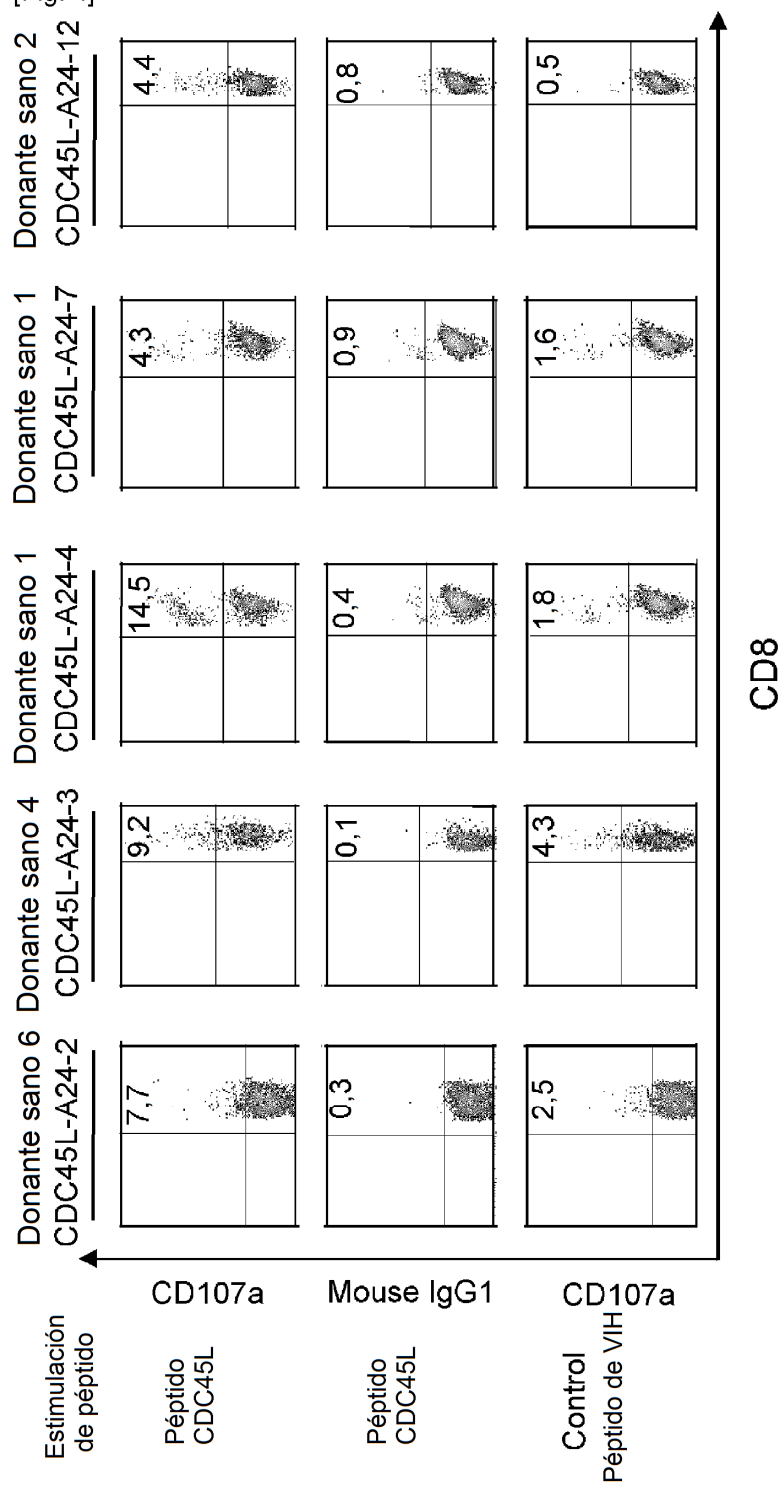
B



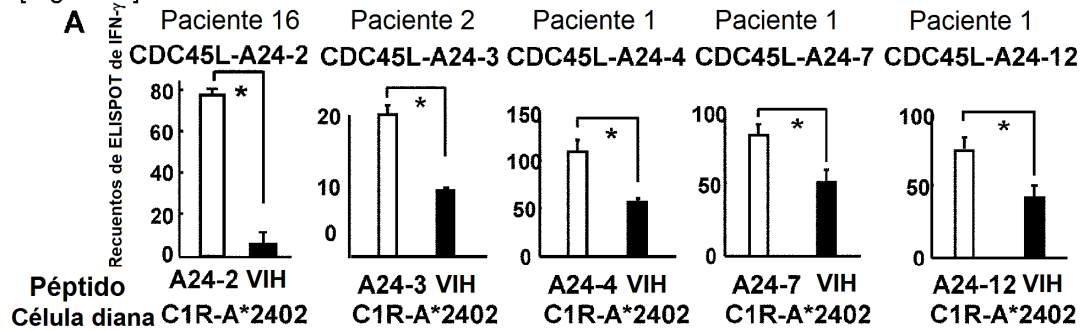
C



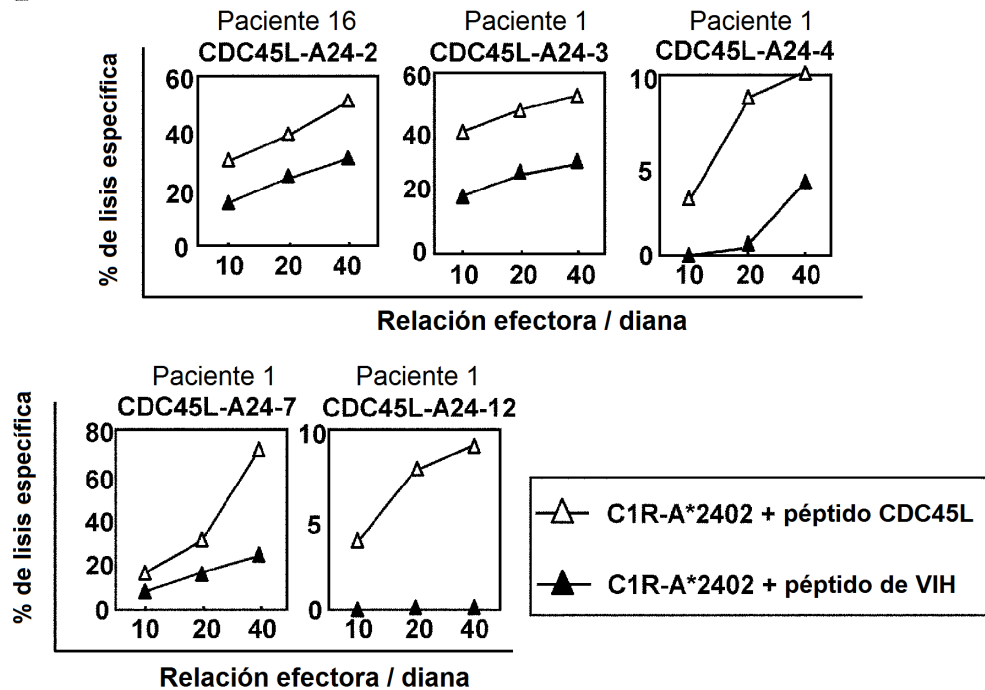
[Fig. 4]



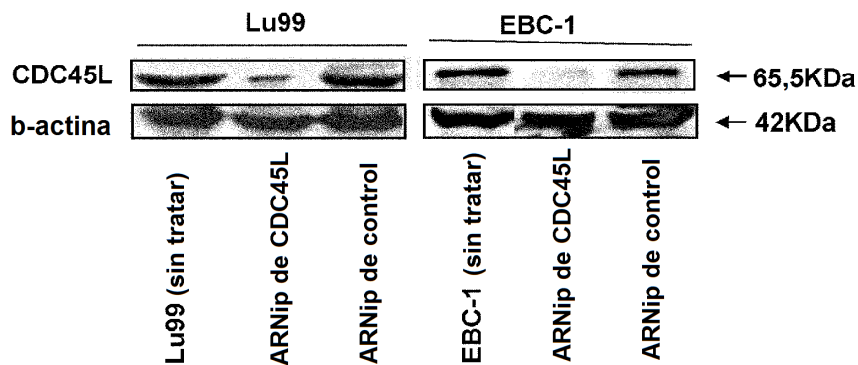
[Fig. 5a-c]



B

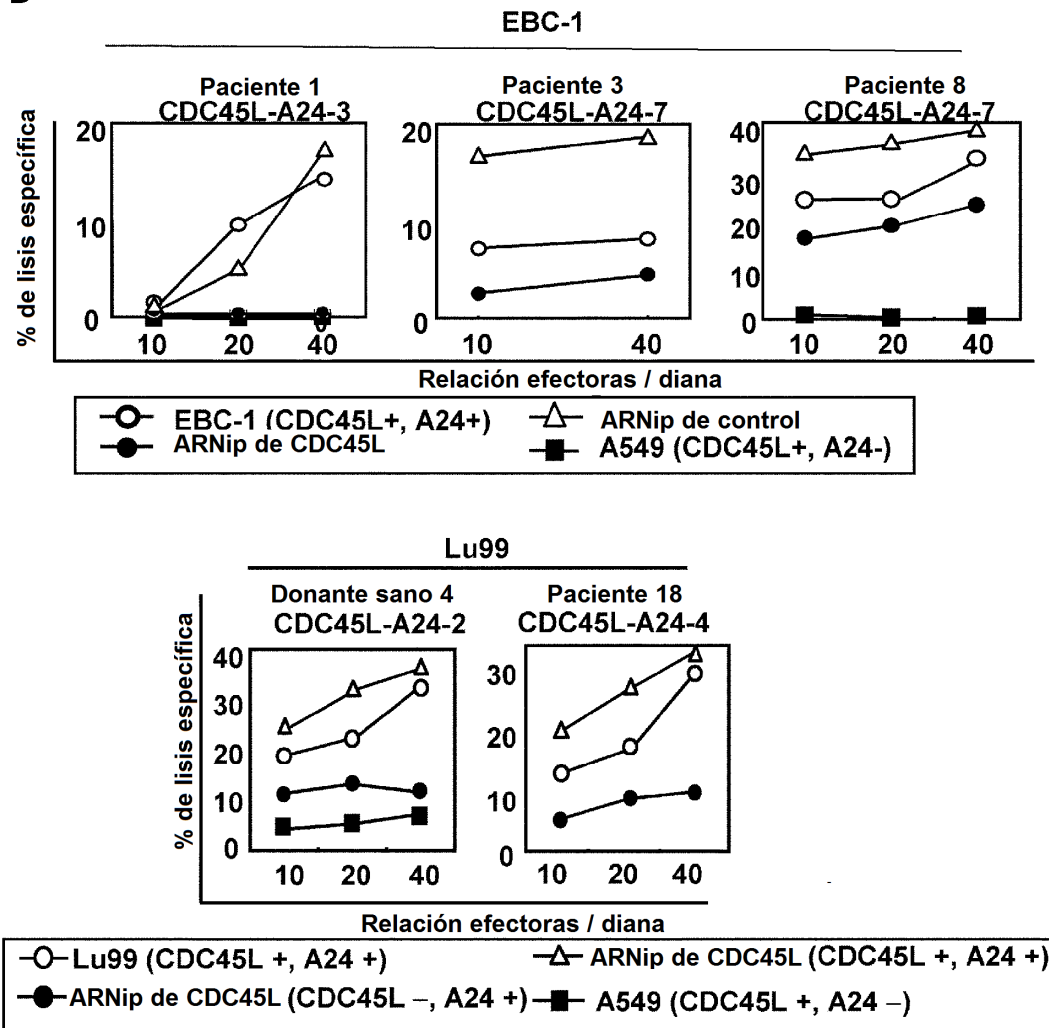


C

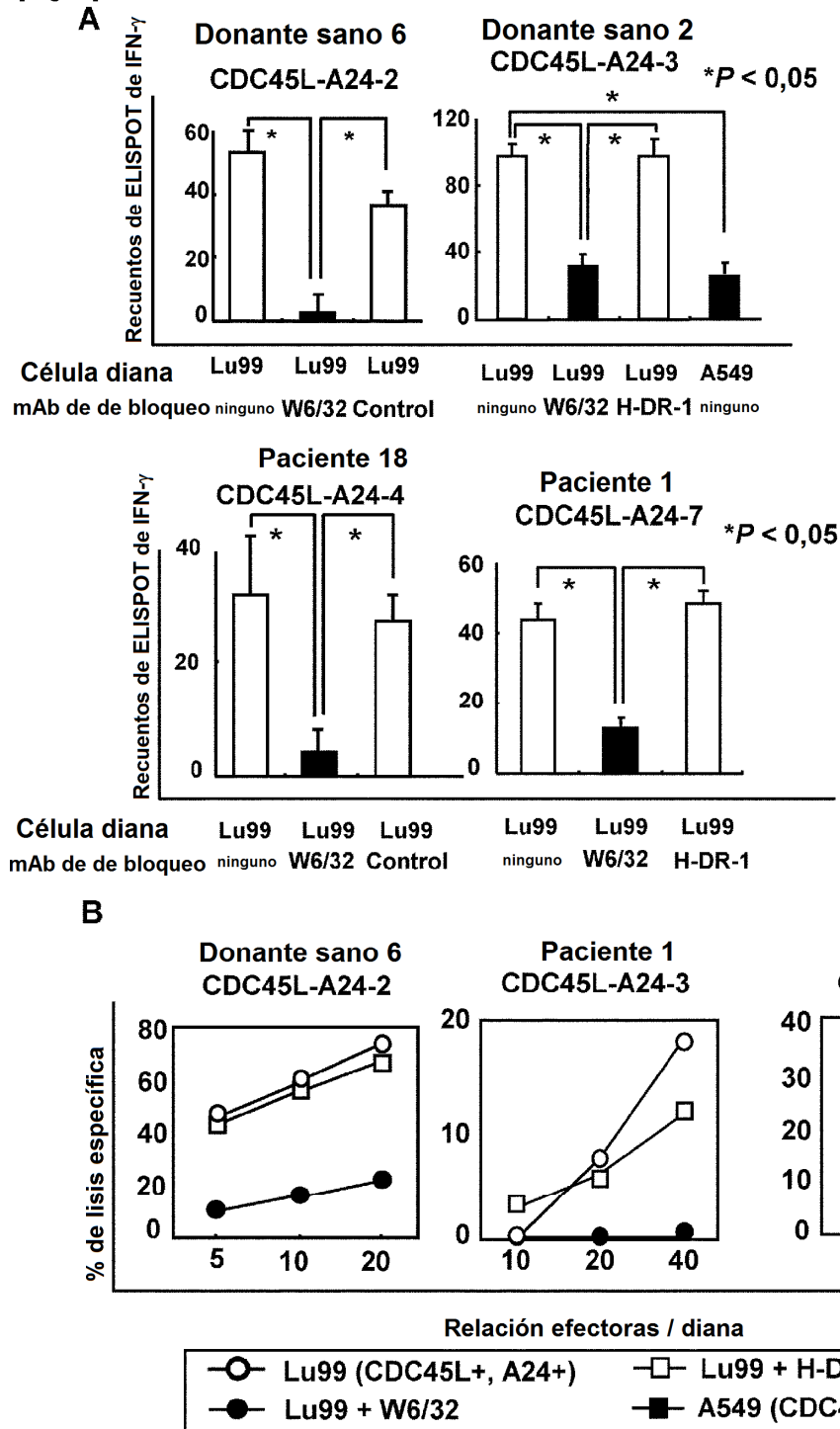


[Fig. 5d]

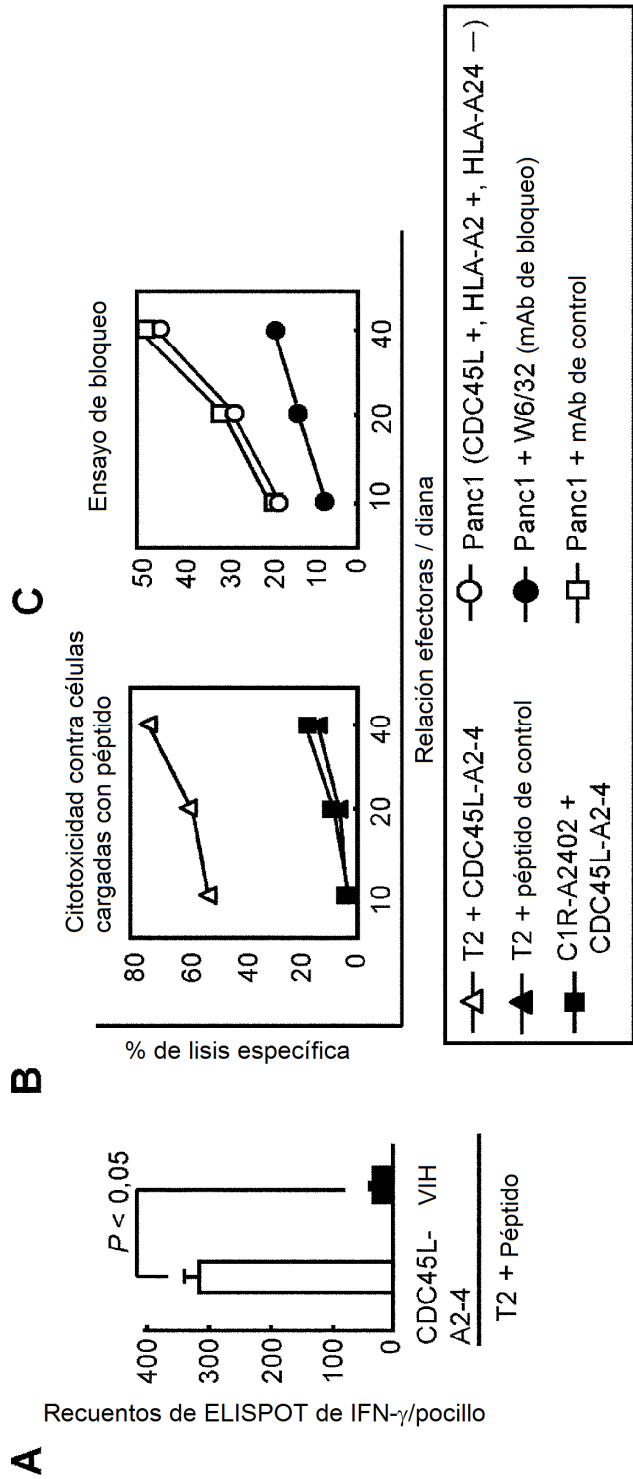
D



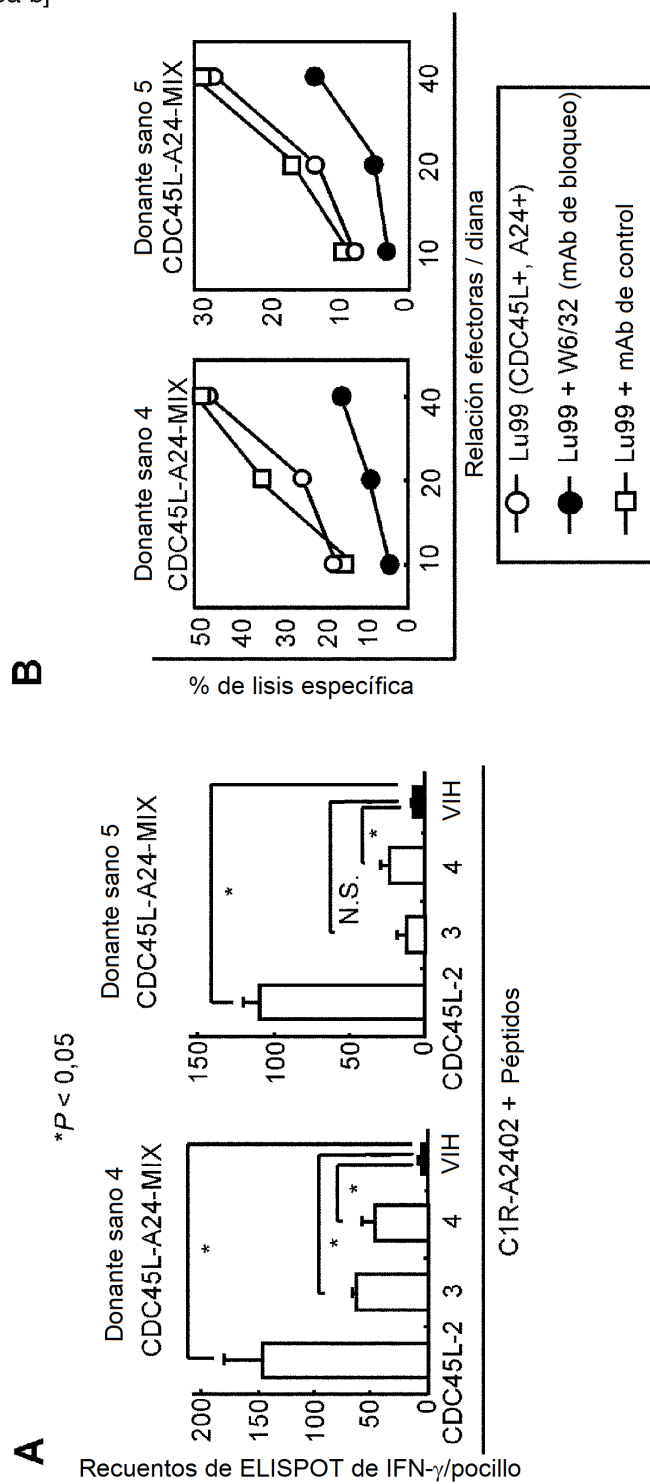
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8a-b]



[Fig. 8c-d]

