(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 773 699**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/06	(2006.01)	*C07K 16/40*	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)	*C12N 9/12*	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)	*G01N 33/50*	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)		
C07K 16/18	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		
G01N 33/574	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
C07K 14/47	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2012** **E 17198358 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019** **EP 3296317**

(54) Título: **Péptidos TOPK y vacunas que los incluyen**

(30) Prioridad:

28.10.2011 US 201161552817 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.07.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 773 699 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 TOPK y vacunas que los incluyen

Campo técnico

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

PRIORIDAD

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N.º 61/552.817, presentada el 28 de octubre de 2011.

Técnica anterior

Se ha mostrado que los linfocitos T citotóxicos CD8 positivos (CTL) reconocen péptidos de epítope derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) en la molécula de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y entonces destruyen las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia del antígeno del melanoma (MAGE) como primer ejemplo de TAA, se han descubierto muchos otros TAA mediante enfoques inmunológicos (NPL 1, 2), y algunos de los TAA están ahora en el proceso de desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas.

TAA favorables son indispensable para la proliferación y supervivencia de células cancerosas. El uso de tales TAA como dianas para inmunoterapia puede minimizar el riesgo bien descrito de escape inmunitario de células cancerosas atribuible a la deleción, mutación y/o regulación por disminución de TAA como consecuencia de selección inmunitaria terapéuticamente conducida. Por consiguiente, la identificación de nuevos TAA capaces de inducir respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas garantiza el desarrollo adicional. Así, está en curso la aplicación clínica de las estrategias de vacunación de péptidos en diversos tipos de cáncer (NPL 3-10). Hasta la fecha, ha habido varios informes de ensayos clínicos que usan estos péptidos derivados de TAA. Desafortunadamente, hasta la fecha, estos ensayos de vacuna para el cáncer solo han dado una baja tasa de respuesta objetiva (NPL 11-13). Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad en la materia de nuevos TAA adecuados para uso como dianas inmunoterapéuticas.

TOPK (proteína cinasa originada de células T-LAK) es una serina/treonina cinasa que es miembro de la familia MAPKK relacionada con MAPK cinasa (MAPKK) 3/6. Esta cinasa fosforila MAPK p38 y participa en la regulación del punto de control del ciclo celular (NPL 14, 15). El análisis de la expresión génica de TOPK usando muestras clínicas indicó que TOPK se expresa en exceso en algún cáncer maligno, tal como cáncer de mama, colangiocarcinoma, carcinoma hepatocelular, leucemia, cáncer colorrectal y melanoma (NPL 16-19). Estudios recientes que indican que la actividad de cinasa desempeña una función importante en la carcinogénesis de mama han renovado el interés de investigación en cinasas asociadas al cáncer tales como TOPK. Para este fin, el análisis de transferencia Northern ha revelado que el transcrito de TOPK se expresa altamente en células de cáncer de mama, pero es difícilmente detectable en tejidos humanos normales, excepto testículos. Además, se ha mostrado que la inactivación de la expresión de expresión de TOPK endógena por ARNip en líneas de células de cáncer de mama atenúa la citocinesia y conduce a apoptosis de las células cancerosas (NPL 20).

El documento US2011/229504 A1 describe péptidos derivados de molécula de la clase I de HLA de células tumorales humanas y su uso en composiciones de vacuna para provocar respuestas inmunitarias antitumorales, particularmente respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL).

Lista de citas

Bibliografía no de patente

[NPL 1] Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80

[NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9

[NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55

[NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42

[NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9

[NPL 6] van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14

[NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8

[NPL 8] Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72

[NPL 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66

[NPL 10] Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94

[NPL 11] Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80

[NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42

[NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15

[NPL 14] Abe Y et al., J Bio Chem. 2000 July 14: 21525-21531

[NPL 15] Ayllon V y O'connor R., Oncogene. 2007 May 24;26(24):3451-61

[NPL 16] He F et al., Hum Pathol. 2010 Mar;41(3):415-24

[NPL 17] Li G et al., Ann Hematol. 2006 Sep;85(9):583-90

[NPL 18] Minoo P et al., Int J Oncol. 2010 Sep;37(3):707-18

[NPL 19] Zykova TA et al., Clin Cancer Res. 2006 Dec 1;12(23):6884-93

[NPL 20] Park JH et al., Cancer Res. 2006 Sep 15;66(18):9186-95

Sumario de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de novedosos péptidos que pueden servir de dianas adecuadas de inmunoterapia. Debido a que los TAA son generalmente percibidos por el sistema inmunitario como "propios" y, por tanto, frecuentemente no tienen inmunogenicidad innata, el descubrimiento de dianas apropiadas es de extrema importancia. Mediante la presente invención, se demuestra que TOPK (SEQ ID NO: 86 codificada por el gen de Nº de acceso de GenBank NM_018492 (SEQ ID NO: 85)) se expresa específicamente en exceso en células cancerosas, en particular leucemia mieloide aguda (LMA), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y tumor de tejido blando, pero no se limitan a éstos. Así, la presente invención se centra en TOPK como un candidato a diana apropiado de inmunoterapia contra el cáncer/tumor.

Para este fin, la presente invención se refiere a, al menos en parte, la identificación de de péptidos específicos de epítope entre los productos génicos de TOPK que poseen la capacidad de inducir linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para TOPK. Como se trata en mayor detalle más adelante, se estimularon células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de un donante sano usando candidatos a péptidos de unión a HLA (antígeno leucocitario humano)-A*2402 o HLA-A*0201 derivados de TOPK. Entonces se establecieron líneas de CTL con citotoxicidad específica contra las células diana HLA-A24 o HLA-A2 positivas pulsadas con cada uno de los candidatos a péptido. Los resultados en el presente documento demuestran que estos péptidos son péptidos de epítope restringidos a HLA-A24 o HLA-A2 que pueden inducir respuestas inmunitarias potentes y específicas contra células que expresan TOPK. Estos resultados indican además que TOPK es fuertemente inmunogénico y que los epítopes del mismo son dianas eficaces para inmunoterapia contra tumor.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar péptidos aislados que tengan una capacidad para unirse al antígeno HLA e incluyan la secuencia de TOPK (SEQ ID NO: 86) o un fragmento inmunogénicamente activo de la misma. Se espera que estos péptidos tengan inducibilidad de CTL y, así, puedan usarse para inducir un CTL *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* o para ser directamente administrados a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias *in vivo* contra cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando.

Péptidos preferidos son nonapéptidos y decapéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28.

La presente invención también contempla péptidos modificados que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos, insertados y/o añadidos, siempre que los péptidos modificados resultantes retengan la inducibilidad de CTL requerida del péptido sin modificar original.

La presente invención engloba además polinucleótidos aislados que codifican uno cualquiera de los péptidos de la presente invención. Estos polinucleótidos pueden usarse para inducir o preparar células presentadoras de antígenos (APC) que tienen inducibilidad de CTL. Al igual que los péptidos descritos anteriormente de la presente invención, tales APC pueden administrarse a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres.

Cuando se administran a un sujeto, los péptidos de la presente invención se presentan preferentemente sobre la superficie de APC para inducir CTL que se dirigen a los péptidos respectivos. Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes o composiciones que induzcan un CTL, incluyendo tales composiciones o agentes uno o más péptidos de la presente invención, o uno o más polinucleótidos que codifican tales péptidos. Tales agentes o composiciones pueden usarse para el tratamiento y/o la profilaxis de un cáncer primario, una metástasis o reaparición posoperatoria de los mismos. Ejemplos de cánceres elegidos como diana contemplados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando.

La presente invención contempla además composiciones o agentes farmacéuticos que incluyen uno o más péptidos o uno o más polinucleótidos de la presente invención formulados para el tratamiento y/o la profilaxis de un cáncer primario, metástasis o cáncer de reaparición posoperatoria como se observa anteriormente. En lugar de o además de los presentes péptidos o polinucleótidos, los presentes agentes farmacéuticos o composiciones pueden incluir como principios activos APC y/o exosomas que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención.

Los péptidos o polinucleótidos de la presente invención pueden usarse para inducir APC que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención, por ejemplo, poniendo en contacto APC derivadas de un sujeto con el péptido de la presente invención o introduciendo un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención en APC. Tales APC tienen alta inducibilidad de CTL contra péptidos diana y son útiles para la inmunoterapia contra el cáncer. Por consiguiente, la presente invención engloba los métodos para inducir APC con inducibilidad de CTL, además de las APC obtenidas por los métodos.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar métodos *in vitro* para inducir CTL, incluyendo tales métodos la etapa de co-cultivar linfocitos T CD8-positivos con APC que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención, la etapa de co-cultivar linfocitos T CD8-positivos con exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención, o la etapa de introducir un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos de la subunidad de receptor de linfocitos T (TCR) en la que el TCR formado por los polipéptidos de subunidad puede unirse a un péptido de la presente invención. Los CTL obtenidos por tales métodos encuentran uso en el tratamiento y/o la prevención de cánceres, más particularmente LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando. Por consiguiente, la presente invención engloba los métodos para inducir CTL, además de los CTL obtenidos por los métodos. Otro objeto más de la presente invención es proporcionar APC aisladas que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención. La presente invención proporciona además CTL aislados que eligen como diana péptidos de la presente invención. Estos APC y CTL pueden usarse para inmunoterapia contra el cáncer.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar composiciones para su uso en inducir una respuesta inmunitaria contra un cáncer en un sujeto en necesidad de la misma, en la que las composiciones comprenden un péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido.

La aplicabilidad de la presente invención se extiende a cualquiera de varias enfermedades que se refieren a o que surgen de la expresión en exceso de TOPK, tales como cánceres que expresan TOPK, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando.

Objetos y características de la invención serán más completamente evidentes cuando la siguiente descripción detallada se lea conjuntamente con las figuras y ejemplos adjuntos. Debe entenderse que tanto el sumario anterior de la presente invención como la siguiente descripción detallada son de realizaciones ejemplificadas, y no restrictivos de la presente invención u otras realizaciones alternativas de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

Diversos aspectos y aplicaciones de la presente invención 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.

[fig. 1] La Figura 1 está compuesta por una serie de fotografías, (a) - (e), que representan los resultados del ensayo de inmunotransferencia por puntos asociada a la enzima interferón (IFN)-gamma (ELISPOT) en CTL que se indujeron con péptidos derivados de TOPK. Los CTL en el pocillo número N.º 8 inducidos con TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2) (a), en N.º 3 inducidos con TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (b), en N.º 3 inducidos con TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6) (c), en N.º 2 inducidos con TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (d) y en N.º 4 inducidos con TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (e) mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadrado sobre el pocillo de estas imágenes indica que las células del pocillo correspondiente se expandieron para establecer líneas de CTL. A diferencia, como es típico de datos negativos, no se observó

producción de IFN-gamma específica de los CTL estimulados con TOPK-A24-9-289 (SEQ ID NO: 1) (f). En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido.

[fig. 2-1] La Figura 2 está compuesta por una serie de fotografías, (a) - (o), que representan los resultados del ensayo de inmunotransferencia por puntos asociada a la enzima interferón (IFN)-gamma (ELISPOT) en CTL que se indujeron con péptidos derivados de TOPK. Los CTL en el pocillo número N.º 7 inducidos con TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a), en N.º 4 inducidos con TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45) (b), en N.º 2 inducidos con TOPK-A02-9-183 (SEQ ID NO: 47) (c), en N.º 8 inducidos con TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50) (d), en N.º 4 inducidos con TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51) (e), en N.º 3 inducidos con TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53) (f), en N.º 3 inducidos con TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54) (g), en N.º 5 inducidos con TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62) (h), en N.º 3 inducidos con TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63) (i), en N.º 8 inducidos con TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64) (j), en N.º 1 inducidos con TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66) (k) y en N.º 1 inducidos con TOPK-A02-10-272 (SEQ ID NO: 71) (1) mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadrado sobre el pocillo de estas imágenes indica que las células del pocillo correspondiente se expandieron para establecer líneas de CTL. A diferencia, como es típico de datos negativos, no se observó producción de IFN-gamma específica de los CTL estimulados con TOPK-A02-9-55 (SEQ ID NO: 41) (o). En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido.

[fig. 2-2] La Figura 2 está compuesta por una serie de fotografías, (a) - (o), que representan los resultados del ensayo de inmunotransferencia por puntos asociada a la enzima interferón (IFN)-gamma (ELISPOT) en CTL que se indujeron con péptidos derivados de TOPK. Los CTL en N.º 4 inducidos con TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) (m) y en N.º 4 inducidos con TOPK-A02-10-142 (SEQ ID NO: 76) (n) mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadrado sobre el pocillo de estas imágenes indica que las células del pocillo correspondiente se expandieron para establecer líneas de CTL. A diferencia, como es típico de datos negativos, no se observó producción de IFN-gamma específica de los CTL estimulados con TOPK-A02-9-55 (SEQ ID NO: 41) (o). En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido.

[fig. 3] La Figura 3 está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (a) - (e), que representan la producción de IFN-gamma de las líneas de CTL estimuladas con TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2) (a), TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (b), TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6) (c), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (d) y TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (e). La cantidad de IFN-gamma que los CTL produjeron se midió por enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) de IFN-gamma. Los resultados demuestran que las líneas de CTL establecidas por estimulación con cada péptido muestran potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ningún péptido. La relación R/S indica la relación del número de células respondedoras (línea de CTL) y células estimuladoras.

[fig. 4] La Figura 4 está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (a) - (c), que representan la producción de IFN-gamma de los clones de CTL establecidos por dilución limitante de las líneas de CTL estimuladas con TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (a), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (b) y TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (c). Los resultados demuestran que los clones de CTL establecidos por estimulación con cada péptido muestran potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido. La relación R/S indica la relación del número de células respondedoras (clon de CTL) y células estimuladoras.

[fig. 5-1] La Figura 5-1 está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (a) - (f), que representan la producción de IFN-gamma de las líneas de CTL estimuladas con TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a), TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45) (b), TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50) (c), TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51) (d), TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53) (e), y TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54) (f). La cantidad de IFN-gamma que los CTL produjeron se midió por enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) de IFN-gamma. Los resultados demuestran que líneas de CTL establecidas por estimulación con cada péptido muestran potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido. La relación R/S indica la relación del número de células respondedoras (línea de CTL) y células estimuladoras.

[fig. 5-2] La Figura 5-2 está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (g) - (k), que representan la producción de IFN-gamma de las líneas de CTL estimuladas con TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62) (g), TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63) (h), TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64) (i), TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66) (j) y TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) (k). La cantidad de IFN-gamma que los CTL produjeron se midió por enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) de IFN-gamma. Los resultados demuestran que líneas de CTL establecidas por estimulación con cada péptido muestran potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de

IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido. La relación R/S indica la relación del número de células respondedoras (línea de CTL) y células estimuladoras.

[fig. 6] La Figura 6 está compuesta por un par de gráficos de líneas, (a) y (b), que representan la producción de IFN-gamma de los clones de CTL establecidos por dilución limitante de las líneas de CTL estimuladas con TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a) y TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53) (b). Los resultados demuestran que los clones de CTL establecidos por estimulación con cada péptido muestran potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido. La relación R/S indica la relación del número de células respondedoras (clon de CTL) y células estimuladoras.

[fig. 7] La Figura 7 es un gráfico de líneas que representa la actividad de CTL específica de clones de CTL contra las células diana que expresan TOPK y HLA-A*2402. Se prepararon células COS7 transfectadas con HLA-A*2402 o el gen TOPK de longitud completa como controles. El clon de CTL establecido con TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) mostró actividad de CTL específica contra células COS7 transfectadas con tanto TOPK como HLA-A*2402 (rombo). Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica significativa frente a células diana que expresan o bien HLA-A*2402 (triángulo) o bien TOPK (círculo).

[fig. 8] La Figura 8 es un gráfico de líneas que representa la actividad de CTL específica de líneas de CTL contra las células diana que expresan TOPK y HLA-A*0201. Se prepararon células COS7 transfectadas con HLA-A*0201 o el gen TOPK de longitud completa como controles. La línea de CTL establecida con TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) mostró actividad de CTL específica contra células COS7 transfectadas con tanto TOPK como HLA-A*0201 (rombo). Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica significativa frente a células diana que expresan o bien HLA-A*0201 (triángulo) o bien TOPK (círculo).

Descripción de realizaciones

Además del sumario anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar:

[1] Un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en (a) o (b) a continuación:

(a) un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28

(b) un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28, en la que 1 o 2 aminoácido(s) están sustituidos, insertados y/o añadidos, en la que el péptido tiene inducibilidad de CTL.

[2] El péptido aislado de [1], en el que el péptido tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 está sustituido para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, metionina y triptófano, y

(b) el aminoácido del extremo C de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 está sustituido para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano y metionina.

[3] Un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28.

[4] El péptido aislado de una cualquiera de [1] a [2], en el que dicho péptido es un nonapéptido o un decapéptido.

[5] Un polinucleótido aislado que codifica el péptido aislado de una cualquiera de [1] a [4].

[6] Una composición para inducir a CTL, en la que la composición comprende uno o más péptido(s) de una cualquiera de [1] a [4], o uno o más polinucleótido(s) de [5].

[7] Una composición farmacéutica que comprende:

(a) uno o más péptido(s) de una cualquiera de [1] a [4],

(b) uno o más polinucleótido(s) de [5],

(c) una o más APC(s) que presentan un complejo del péptido de una cualquiera de [1] a [4] y un antígeno HLA sobre su superficie;

(d) uno o más exosomas que presentan un complejo del péptido de una cualquiera de [1] a [4] y un antígeno HLA sobre su superficie o

(e) uno o más CTL que pueden reconocer una célula que presenta un complejo del péptido de una cualquiera de [1] a [4] y un antígeno HLA sobre su superficie,

en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en la que la composición farmacéutica se formula para el tratamiento y/o la profilaxis de cáncer, la prevención de una reaparición posoperatoria del mismo, y/o la inducción de una respuesta inmunitaria contra cáncer.

[8] La composición farmacéutica de [7], en la que dicha composición farmacéutica se formula para administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24.

[9] Un método *in vitro* para inducir una célula presentadora de antígenos (APC) con inducibilidad de CTL, comprendiendo dicho método la etapa seleccionada del grupo que consiste en:

(a) poner en contacto una APC con un péptido de una cualquiera de [1] a [4] *in vitro*, y

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

[10] Un método *in vitro* para inducir un CTL, comprendiendo dicho método una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

(a) co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de [1] a [4],

(b) co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de [1] a [4], y

(c) introducir en un linfocito T CD8 positivo un polinucleótido/polinucleótidos que codifica polipéptidos de subunidad del receptor de linfocitos T (TCR), en el que el TCR formado por dichos polipéptidos de subunidad de TCR es capaz de unirse a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de [1] a [4] sobre una superficie celular.

[11] Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de [1] a [4].

[12] La APC de [11], que se induce por el método de [9].

[13] Un CTL aislado que elige como diana el péptido de una cualquiera de [1] a [4].

[14] El CTL de [], que se induce por el método de [10].

[15] Una composición para su uso en inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto en necesidad de la misma, en la que la composición comprende el péptido de una cualquiera de [1] a [4] o un polinucleótido que codifica el péptido.

[16] Un anticuerpo contra el péptida de una cualquiera de [1] a [4].

[17] Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de una cualquiera de [1] a [4].

[18] Una célula hospedadora transformada o transfectada con el vector de [17].

[19] Un kit de diagnóstico que comprende un péptido de una cualquiera de [1] a [4], el polinucleótido de [5] o el péptida de [16].

[20] Un método de cribado de un péptido que tiene una capacidad para inducir un CTL que tiene actividad citotóxica específica contra una célula que presenta un fragmento derivado de TOPK, en el que el método comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia candidata que consiste en una secuencia de aminoácidos modificada sustituyendo, insertando y/o añadiendo uno, o dos restos de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos original, en la que la secuencia de aminoácidos original está seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28;

(ii) seleccionar una secuencia candidata que no tiene homología significativa sustancial con los péptidos derivados de cualquier producto génico humano conocido distinto de TOPK;

(iii) poner en contacto un péptido que consiste en la secuencia candidata seleccionada en la etapa (ii) con una célula presentadora de antígenos;

(iv) poner en contacto la célula presentadora de antígenos de la etapa (iii) con un linfocito T CD8 positivo; y

(v) identificar el péptido cuya inducibilidad de CTL es la misma a o superior a la de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos original.

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. Sin embargo, antes de describir los presentes materiales y métodos, debe entenderse que estas descripciones son simplemente ilustrativas y no pretenden estar limitadas. Debe también entenderse que la presente invención no se limita a los tamaños, formas, dimensiones, materiales, metodologías, protocolos, etc. particulares descritos en el presente documento, ya que éstos pueden variar según experimentación rutinaria y optimización. Además, la terminología usada en la descripción es con el fin de describir las versiones o realizaciones particulares solo, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención que estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas.

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 materia a la que la presente invención pertenece. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes.

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 "aislado" y "purificado", usados en relación con una sustancia (por ejemplo, péptido, anticuerpo, polinucleótido, etc.), indican que la sustancia está sustancialmente libre de al menos una sustancia que puede incluso incluirse en la fuente natural. Así, un péptido aislado o purificado se refiere a péptidos que están sustancialmente libres de material celular tales como hidrato de carbono, lípido, u otras proteínas contaminantes de la fuente de célula o tejido del que deriva el péptido, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente.

El término "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un péptido en las que el péptido se separa de componentes celulares de las células de las que se aísla o produce recombinantemente. Así, un péptido que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de polipéptido que tiene menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en el presente documento una "proteína contaminante"). Cuando el péptido se produce recombinantemente, también está preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, que incluye preparaciones de péptido con medio de cultivo inferior a aproximadamente el 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de péptido. Cuando el péptido se produce por síntesis química, está preferentemente sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, que incluye preparaciones de péptido con precursores químicos u otros productos químicos implicados en la síntesis del péptido inferior a aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) del volumen de la preparación de péptido. Puede mostrarse que una preparación de péptido particular contiene un péptido aislado o purificado, por ejemplo, por la aparición de una única banda tras la electroforesis en dodecilsulfato de sodio (SDS)-gel de poliacrilamida de la preparación de proteína y tinción con azul de Coomassie Brilliant o similares del gel. En una realización preferida, se aíslan o purifican péptidos y polinucleótidos de la presente invención.

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 son uno o más resto(s) modificado(s), o resto(s) que no existen de forma natural, tales como un mimético químico artificial de aminoácido(s) que existe(n) de forma natural correspondiente(s), además de a polímeros de aminoácidos que existen de forma natural.

El término "oligopéptido", algunas veces usado en la presente memoria descriptiva, se usa para referirse a péptidos que tienen 20 restos de aminoácidos o menos, normalmente 15 restos de aminoácidos o menos, de longitud y normalmente están compuestos por entre aproximadamente 8 y aproximadamente 11 restos de aminoácidos, frecuentemente 9 o 10 restos de aminoácidos. Los últimos se denominan en el presente documento "nonapéptido" y "decapéptido", respectivamente.

El término "aminoácido", como se usa en el presente documento, se refiere a aminoácidos que existen de forma natural y sintéticos, además de a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácido que funcionan similarmente a los aminoácidos que existen de forma natural. El aminoácido puede ser o bien L-aminoácidos o bien D-aminoácidos. Los aminoácidos que existen de forma natural son aquellos codificados por el código genético, además de aquellos

modificados después de la traducción en 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 carbono alfa unido a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) como aminoácido que existe de forma natural, pero tienen uno grupo R modificado o esqueletos modificados (por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metionina metil-sulfonio). La expresión "mimético de aminoácido" se refiere a compuestos químicos que tienen diferentes estructuras, pero funciones similares a los aminoácidos generales.

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

Los términos "gen", "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en el presente documento y, a menos que se indique específicamente de otro modo, son referidos por sus códigos de una letra comúnmente aceptados.

Los términos "agente" y "composición" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un producto que incluye componentes especificados en cantidades especificadas, además de cualquier producto que resulte, directamente o indirectamente, de la combinación de los componentes especificados en las cantidades especificadas. Tales términos, cuando se usan en relación con el adjetivo "farmacéutico" (como en "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica") pretenden englobar un producto que incluye el (los) principio(s) activo(s), y el (los) componente(s) inerte(s) que constituyan el vehículo, además de cualquier producto que resulte, directamente o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de dos cualesquiera 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, los términos "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica" se refieren a cualquier producto preparado por mezcla de una molécula o compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

El término "principio activo" en el presente documento se refiere a una sustancia en un agente o composición que es biológicamente o fisiológicamente activo. Particularmente, en el contexto de un agente farmacéutico o composición, el término "principio activo" se refiere a una sustancia de componente que muestra un efecto farmacológico objetivo. Por ejemplo, en caso de agentes farmacéuticos o composiciones para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, principios activos en los agentes o composiciones pueden conducir a al menos una acción biológica o fisiológica sobre células cancerosas y/o tejidos directamente o indirectamente. Preferentemente, tal acción puede incluir reducir o inhibir el crecimiento de células cancerosas, deñar o destruir células cancerosas y/o tejidos, etc. Normalmente, el efecto indirecto de los principios activos es inducciones de CTL que reconocen o que destruyen células cancerosas. Antes de ser formulado, el "principio activo" también puede denominarse "sustancia activa", "principio activo" o "producto técnico".

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo fisiológicamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa un material, composición, sustancia o vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, que incluye, pero no se limita a, una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación.

Algunos agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención encuentran uso particular como vacunas. En el contexto de la presente invención, la expresión "vacuna" (también denominada una "composición inmunogénica") se refiere a un agente o composición que tiene la función de mejorar, potenciar y/o inducir inmunidad antitumoral tras la inoculación en animales.

A menos que se defina de otro modo, el término "cáncer" se refiere a cánceres o tumores que expresan en exceso el gen TOPK, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, leucemia mieloide aguda (LMA), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y tumor de tejido blando.

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 sub-grupo de linfocitos T que son capaces de reconocer células no propias (por ejemplo, células tumorales/cancerosas, células infectadas por virus) e inducir la muerte de tales células.

A menos que se defina de otro modo, el término "HLA-A24" se refiere al tipo de HLA-A24 que contiene subtipos, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, HLA-A*2401, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2404, HLA-A*2407, HLA-A*2408, HLA-A*2420, HLA-A*2425 y HLA-A*2488.

A menos que se defina de otro modo, el término "HLA-A2", como se usa en el presente documento, se refiere representativamente a los subtipos, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 y HLA-A*0250.

A menos que se defina 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 micromatriz, chip, marcador, etc. No se pretende que el término "kit" se limite a una combinación particular de reactivos y/o materiales.

Como se usa en el presente documento, en el contexto de un sujeto o paciente, la expresión "el antígeno HLA del sujeto (o paciente) es HLA A24 o HLA-A2" se refiere a que el sujeto o paciente posee homocigóticamente o heterocigóticamente el gen de antígeno HLA A24 o HLA-A2 como una molécula de clase I del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad), y el antígeno HLA A24 o HLA-A2 se expresa en células del sujeto o paciente como un antígeno HLA.

Hasta el punto de que los métodos y composiciones de la presente invención encuentran utilidad en el contexto del "tratamiento" del cáncer, un tratamiento se considera "eficaz" si conduce a beneficio clínico, tal como una reducción en la expresión del gen TOPK, disminución en el tamaño, prevalencia o potencial metastásico del cáncer en un sujeto, retardando la progresión del cáncer, alivio de un síntoma clínico del cáncer, prolongación del tiempo de supervivencia, supresión de la reaparición posoperatoria, etc. Cuando el tratamiento se aplica profilácticamente, "eficaz" significa que retarda o previene que se formen cánceres o previene o alivia un síntoma clínico del cáncer. La eficacia se determina en asociación con cualquier método conocido de diagnóstico o tratamiento del tipo de tumor particular.

Hasta el punto que los métodos y composiciones de la presente invención encuentran utilidad en el contexto de la "prevención" y "profilaxis" del cáncer, tales términos se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier actividad que reduce la carga de mortalidad o morbilidad de la enfermedad. La prevención y profilaxis pueden producirse "a niveles de prevención primaria, secundaria y terciaria". Aunque la prevención primaria y la profilaxis evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles de prevención secundaria y terciaria y la profilaxis engloban actividades que pretenden la prevención y profilaxis de la progresión de una enfermedad y la emergencia de síntomas, además de reducir el impacto negativo de una enfermedad ya establecida restaurando la función y reduciendo las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y profilaxis pueden 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 del cáncer y/o la prevención de la reaparición posoperatoria del mismo incluyen cualquiera de las siguientes etapas, tales como la extirpación quirúrgica de las células cancerosas, la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la involución o regresión de un tumor, la inducción de remisión y supresión de la manifestación del cáncer, la regresión tumoral y la reducción o inhibición de metástasis. El tratamiento y/o profilaxis eficaz del cáncer disminuye la mortalidad y mejora el pronóstico de individuos que tienen cáncer, disminuye los niveles de marcadores tumorales en la sangre, y alivia síntomas detectables que acompañan al cáncer. Por ejemplo, la reducción o mejora de síntomas constituye tratar eficazmente y/o la profilaxis incluye 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 las mismas que son específicamente reactivos con una proteína designada o péptido de la misma. Un anticuerpo puede incluir anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos fusionados con otras proteínas o radiomarcas, y fragmentos de anticuerpos. Además, un anticuerpo en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multi-específicos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, mientras que presentan la actividad biológica deseada. Un "anticuerpo" indica todos los casos (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 materia a la que pertenece la presente invención.

II. Péptidos:

Péptidos como se describen en detalle a continuación pueden denominarse "péptido(s) TOPK" o "polipéptido(s) TOPK".

Para demostrar que los péptidos derivados de TOPK funcionan como un antígeno reconocido por CTL, se analizaron péptidos derivados de TOPK (SEQ ID NO: 86) para determinar si eran epítopes de antígeno restringidos por HLA-A24 o HLA-A2 que son alelos de 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).

Los candidatos a péptidos de unión a HLA-A24 derivados de TOPK identificados basándose en sus afinidades de unión a HLA-A24 incluyen:

TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2), TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3), TOPK-A24-9-237 (SEQ ID NO: 4), TOPK-A24-9-155 (SEQ ID NO: 5), TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6), TOPK-A24-9-174 (SEQ ID NO: 7), TOPK-A24-9-73 (SEQ ID NO: 8), TOPK-A24-9-235 (SEQ ID NO: 9), TOPK-A24-9-19 (SEQ ID NO: 10), TOPK-A24-9-205 (SEQ ID NO: 11), TOPK-A24-9-77 (SEQ ID NO: 12), TOPK-A24-9-270 (SEQ ID NO: 13), TOPK-A24-9-58 (SEQ ID NO: 14), TOPK-A24-9-81 (SEQ ID NO: 15), TOPK-A24-9-278 (SEQ ID NO: 16), TOPK-A24-9-183 (SEQ ID NO: 17), TOPK-A24-9-227 (SEQ ID NO: 18), TOPK-A24-9-13 (SEQ ID NO: 19), TOPK-A24-9-146 (SEQ ID NO: 20), TOPK-A24-9-140 (SEQ ID NO: 21), TOPK-A24-9-103 (SEQ ID NO: 22), TOPK-A24-9-105 (SEQ ID NO: 23), TOPK-A24-9-118 (SEQ ID NO: 24), TOPK-A24-10-31 (SEQ ID NO: 25), TOPK-A24-10-155 (SEQ ID NO: 26), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27), TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28), TOPK-A24-10-130 (SEQ ID NO: 29), TOPK-A24-10-47 (SEQ ID NO: 30), TOPK-A24-10-73 (SEQ ID NO: 31), TOPK-A24-10-102 (SEQ ID NO: 32), TOPK-A24-10-39 (SEQ ID NO: 33), TOPK-A24-10-4 (SEQ ID NO: 34), TOPK-A24-10-77 (SEQ ID NO: 35), TOPK-A24-10-241 (SEQ ID NO: 36), TOPK-A24-10-12 (SEQ ID NO: 37), TOPK-A24-10-148 (SEQ ID NO: 38), TOPK-A24-10-145 (SEQ ID NO: 39) y TOPK-A24-10-114 (SEQ ID NO: 40).

De los anteriores, los siguientes péptidos produjeron el establecimiento satisfactorio de CTL después de la estimulación *in vitro* de linfocitos T por células dendríticas (DC) cargadas con estos péptidos: TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2), TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3), TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) y TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28).

Candidatos de péptidos a unión a HLA-A2 derivados de TOPK identificados basándose en sus afinidades de unión a HLA-A2 incluyen:

TOPK-A2-9-240 (SEQ ID NO: 42), TOPK-A2-9-34 (SEQ ID NO: 43), TOPK-A2-9-236 (SEQ ID NO: 44), TOPK-A2-9-19 (SEQ ID NO: 45), TOPK-A2-9-134 (SEQ ID NO: 46), TOPK-A2-9-183 (SEQ ID NO: 47), TOPK-A2-9-81 (SEQ ID NO: 48), TOPK-A2-9-149 (SEQ ID NO: 49), TOPK-A2-9-235 (SEQ ID NO: 50), TOPK-A2-9-12 (SEQ ID NO: 51), TOPK-A2-9-227 (SEQ ID NO: 52), TOPK-A2-9-285 (SEQ ID NO: 53), TOPK-A2-9-47 (SEQ ID NO: 54), TOPK-A2-9-310 (SEQ ID NO: 55), TOPK-A2-9-132 (SEQ ID NO: 56), TOPK-A2-9-242 (SEQ ID NO: 57), TOPK-A2-9-156 (SEQ ID NO: 58), TOPK-A2-9-138 (SEQ ID NO: 59), TOPK-A2-9-142 (SEQ ID NO: 60), TOPK-A2-10-190 (SEQ ID NO: 61), TOPK-A2-10-236 (SEQ ID NO: 62), TOPK-A2-10-231 (SEQ ID NO: 63), TOPK-A2-10-47 (SEQ ID NO: 64), TOPK-A2-10-234 (SEQ ID NO: 65), TOPK-A2-10-239 (SEQ ID NO: 66), TOPK-A2-10-290 (SEQ ID NO: 67), TOPK-A2-10-37 (SEQ ID NO: 68), TOPK-A2-10-20 (SEQ ID NO: 69), TOPK-A2-10-241 (SEQ ID NO: 70), TOPK-A2-10-272 (SEQ ID NO: 71), TOPK-A2-10-88 (SEQ ID NO: 72), TOPK-A2-10-81 (SEQ ID NO: 73), TOPK-A2-10-313 (SEQ ID NO: 74), TOPK-A2-10-54 (SEQ ID NO: 75), TOPK-A2-10-142 (SEQ ID NO: 76), TOPK-A2-10-35 (SEQ ID NO: 77), TOPK-A2-10-110 (SEQ ID NO: 78), TOPK-A2-10-223 (SEQ ID NO: 79), TOPK-A2-10-274 (SEQ ID NO: 80), TOPK-A2-10-173 (SEQ ID NO: 81), TOPK-A2-10-141 (SEQ ID NO: 82), TOPK-A2-10-292 (SEQ ID NO: 83) y TOPK-A2-10-180 (SEQ ID NO: 84).

De los anteriores, los siguientes péptidos produjeron el establecimiento satisfactorio de CTL después de la estimulación *in vitro* de linfocitos T por células dendríticas (DC) cargadas con estos péptidos: TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42), TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45), TOPK-A02-9-183 (SEQ ID NO: 47), TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50), TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51), TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53), TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54), TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62), TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63), TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64), TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66), TOPK-A02-10-272 (SEQ ID NO: 71), TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) y TOPK-A02-10-142 (SEQ ID NO: 76).

Los CTL establecidos indicados anteriormente mostraron potente actividad de CTL específica frente a células diana pulsadas con péptidos respectivos. Estos resultados demuestran que TOPK es un antígeno reconocido por un CTL y que los péptidos son péptidos de epítope de TOPK restringidos por HLA-A24 o HLA-A2; por tanto, tales péptidos pueden ser eficaces como antígenos diana para citotoxicidad por CTL.

Como el gen TOPK se expresa en exceso en células cancerosas y tejidos, que incluyen, por ejemplo, aquellos de LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando, y no se expresa en la mayoría de los órganos normales, representa una buena diana para inmunoterapia. Así, la presente invención proporciona nonapéptidos (péptidos compuestos de nueve restos de aminoácidos) y decapéptidos (péptidos compuestos de diez restos de aminoácidos) correspondientes a epítopes reconocidos por CTL de TOPK. Los nonapéptidos y decapéptidos de la presente invención incluyen aquellos péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28.

Generalmente, programas de software ahora disponibles, por ejemplo, en internet, tales como aquellos descritos en Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1): 163-75 y Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, pueden usarse para calcular las afinidades de unión entre diversos péptidos y antígenos HLA por ordenador. La afinidad de unión con antígenos HLA puede medirse como se describe, por ejemplo, en Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1): 163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007; 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. 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 utilizarse fácilmente tales programas de software para seleccionar aquellos fragmentos derivados de TOPK que tienen alta afinidad de unión con antígenos HLA que usan tales programas de software. Por consiguiente, la presente invención engloba péptidos compuestos de cualquier fragmento derivado de TOPK, que se determinaría que se unen con antígenos HLA por tales programas conocidos. Además, tales péptidos pueden incluir el péptido compuesto de la secuencia de longitud completa de TOPK.

Los péptidos de la presente invención, particularmente los nonapéptidos y decapéptidos de la presente invención, pueden flanquearse con restos de aminoácidos adicionales, mientras que el péptido resultante retiene su inducibilidad de CTL. Los restos de aminoácidos adicionales particulares pueden estar compuestos de cualquier tipo de aminoácidos, mientras que no alteren la inducibilidad de CTL del péptido original. Así, la presente invención engloba péptidos que tienen inducibilidad de CTL, que incluyen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28. Tales péptidos tienen menos de 15 aminoácidos.

Se conoce generalmente que la modificación de uno, dos o más aminoácidos en un péptido no influirá en la función del péptido, y en algunos casos incluso potenciará la función deseada de la proteína original. En realidad, se ha mostrado que péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos de una secuencia de aminoácidos, en la que 1, 2 o varios restos de aminoácidos se han modificado (es decir, sustituido, añadido, delecionado y/o insertado) 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 seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28, en la que uno o dos aminoácidos se añaden, insertan y/o sustituyen. En otras palabras, los péptidos de la presente invención tienen tanto inducibilidad de CTL como una secuencia de aminoácidos en la que uno o dos aminoácido(s) están sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28, siempre que los péptidos modificados retengan la inducibilidad de CTL del péptido original.

Aquellos expertos en la materia reconocerán que modificaciones individuales (es decir, inserciones, adiciones y/o sustituciones) a una secuencia de aminoácidos que alteran un único aminoácido o un pequeño porcentaje de la secuencia de aminoácidos global tienden a producir la conservación de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original. Como tal, 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. Tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Ejemplos de características de cadenas laterales de aminoácidos que son deseables de 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 funcionales o características en común: una 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 de 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 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).

Se considera que tales péptidos conservativamente modificados también son péptidos de la presente invención. Sin embargo, los péptidos de la presente invención no están restringidos a éstos y pueden incluir modificaciones no conservativas, mientras que el péptido modificado resultante retenga la inducibilidad de CTL del péptido no modificado original. Además, los péptidos modificados no deben excluir péptidos inducibles por CTL derivados de variantes polimórficas, homólogos entre especies, y alelos de TOPK.

Pueden insertarse, sustituirse y/o añadirse restos de aminoácidos a los péptidos de la presente invención. Para retener la inducibilidad de CTL requerida, se modifica preferentemente (es decir, inserta, añade y/o sustituye) solo un pequeño número (es decir, 1 o 2) aminoácidos. En el presente documento, el término "varios" significa 5 o menos aminoácidos, por ejemplo, 4 o 3 o menos.

Cuando se usa en el contexto de la inmunoterapia, los péptidos de la presente invención deben presentarse sobre la superficie de una célula o exosoma, preferentemente como un complejo con un antígeno HLA. Por tanto, es preferible seleccionar péptidos que no solo inducen CTL, sino que también poseen alta afinidad de unión por el antígeno HLA. Para este fin, los péptidos pueden modificarse por sustitución, inserción, deleción y/o adición de los restos de aminoácidos para dar un péptido modificado que tiene 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 invención.

Por ejemplo, péptidos que poseen alta afinidad de unión a HLA-A24 tienden a tener el segundo aminoácido del extremo N sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano. Asimismo, péptidos en los que el aminoácido del extremo C está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina tienden a tener alta afinidad de unión a HLA-A24. Por consiguiente, puede desearse sustituir el segundo aminoácido del extremo N con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y/o el aminoácido en el extremo C con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina con el fin de aumentar la afinidad de unión a HLA-A24. Así, los péptidos de menos de 15 aminoácidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28, en los que el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y/o en los que el extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina, están englobadas por la presente invención. Por tanto, la presente invención engloba los péptidos de menos de 15 aminoácidos que incluyen una secuencia de aminoácidos en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28, teniendo tales péptidos una o ambas de la siguiente característica de (a) el segundo aminoácido del extremo N es fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano; y (b) el aminoácido del extremo C es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina. En realizaciones preferidas, los péptidos de la presente invención incluyen una secuencia de aminoácidos en la que el segundo aminoácido del extremo N está sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y/o el aminoácido del extremo C está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28).

Asimismo, los péptidos que muestran alta Afinidad de unión a HLA-A2 tienden a tener el segundo aminoácido del extremo N sustituido con leucina o metionina y/o el aminoácido en el extremo C sustituido con valina o leucina. Alternativamente, puede desearse sustituir el segundo aminoácido del extremo N con leucina o metionina, y/o el aminoácido en el extremo C con valina o leucina 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: 42 a 84 (especialmente SEQ ID NO: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 y 76), en el que el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con leucina o metionina, y/o en el que el extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con valina o leucina, están englobados por la presente divulgación. Por tanto, la presente divulgación engloba los péptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 42 a 84 (especialmente SEQ ID NO: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 y 76), teniendo péptidos una o ambas de la siguiente característica de (a) el segundo aminoácido del extremo N es leucina o metionina; y (b) el aminoácido del extremo C es valina o leucina. En realizaciones preferidas, los péptidos de la presente invención incluyen una secuencia de aminoácidos en la que el segundo aminoácido del extremo N está sustituido con leucina o metionina, y/o el aminoácido del extremo C está sustituido con valina o leucina en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 42 a 84 (especialmente SEQ ID NO: 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72 y 76).

Pueden introducirse sustituciones no solo en los aminoácidos terminales, sino también en la posición de posible reconocimiento de péptidos de receptores de linfocitos T (TCR). Varios estudios han demostrado que un péptido con sustituciones de aminoácidos puede ser igual a o mejor que el original, por ejemplo CAP1, $p53_{(264-272)}$, $Her\text{-}2/neu_{(369-377)}$ o $gp100_{(209-217)}$ (Zaremba et al., Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al., J Immunol. (2002);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 1 o 2 aminoácidos, también pueden añadirse al extremo N y/o C de los presentes péptidos. Tales péptidos modificados que tienen inducibilidad de CTL también están incluidos en la presente invención.

Por ejemplo, la presente invención proporciona un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud, que tiene inducibilidad de CTL y comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, y 6,

(ii) una secuencia de aminoácidos en la que 1 o 2 aminoácido(s) están sustituidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, y 6, en la que el péptido tiene una capacidad para inducir un linfocito T citotóxico,

(iii) la secuencia de aminoácidos de (ii), en la que, en el contexto de HLA-A24, la secuencia de aminoácidos tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de dichas SEQ ID NO está sustituido para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, mentionina y triptófano, y

(b) el aminoácido del extremo C de dichas SEQ ID NO está sustituido para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano y metionina.

Además, la presente invención también proporciona un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12 u 11 aminoácidos de longitud, que tiene inducibilidad de CTL y comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i') una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 27 y 28,

(ii') una secuencia de aminoácidos en la que 1 o 2 aminoácido(s) están modificados en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27 y 28, en la que el péptido tiene una capacidad para inducir un linfocito T citotóxico,

(iii') la secuencia de aminoácidos de (ii'), en la que, en el contexto de HLA-A24, la secuencia de aminoácidos tiene una o ambas de las siguientes características:

(a') el segundo aminoácido del extremo N de dicha SEQ ID NO está sustituido para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, metionina y triptófano, y

(b') el aminoácido del extremo C de dicha SEQ ID NO está sustituido para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano y mentionina.

Estos péptidos se unen al antígenos HLA en APC para presentarse sobre las APC como complejo con un antígeno HLA cuando aquellos péptidos se ponen en contacto APC. Alternativamente, aquellos péptidos se introducen en APC y son procesados a fragmentos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre (i)-(iii) y (i')-(iii') en APC que van a presentarse sobre las APC como complejos con antígenos HLA, cuando aquellos péptidos se ponen en contacto con APC. Por consiguiente, se inducen CTL específicos para tales péptidos.

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, puede ser deseable realizar 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 péptido idéntico o que tenga 1 o 2 diferencias de aminoácidos en comparación con el péptido objetivo en la naturaleza, 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 T citolíticos (CTL) cuando se presenta en células presentadoras de antígenos (APC). Además, la "inducibilidad de CTL" incluye la capacidad del péptido de inducir la activación de CTL, proliferación de CTL, promover la lisis de células diana por CTL 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 de APC con un péptido de prueba, mezclando ACP con linfocitos T CD8 positivos para inducir CTL 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, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response). Alternativamente, pueden radiomarcarse células diana con ^{51}Cr y similares, y la actividad citotóxica de CTL puede calcularse a partir de la radiactividad liberada de las

células diana. Alternativamente, la inducibilidad de CTL puede examinarse 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 decapéptidos seleccionados de entre las secuencias de aminoácidos indicadas por SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 mostraron inducibilidad de CTL particularmente alta, además de alta afinidad de unión a un antígeno HLA. Así, estos péptidos se ejemplifican como realizaciones preferidas de la presente invención.

Además, los resultados del análisis de homología demostraron que tales péptidos no tienen homología significativa con péptidos derivados de cualquier otro producto de gen humano. Por consiguiente, se reduce la posibilidad de respuestas inmunitarias no conocidas o no deseadas que surgen cuando se usan para inmunoterapia. Por tanto, también a partir de este aspecto, estos péptidos son útiles para provocar inmunidad contra TOPK en pacientes con cáncer. Así, los péptidos de la presente invención incluyen péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28.

Como se observa anteriormente, los péptidos de la presente invención tienen una capacidad para inducir un CTL específico para TOPK. Por ejemplo, los péptidos de menos de 15 aminoácidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28, o péptidos modificados de los mismos tienen una capacidad para inducir un CTL que puede mostrar actividad citotóxica específica contra una célula que presenta un péptido derivado de TOPK mediante HLA-A24 (por ejemplo, células que expresan TOPK y HLA-A24). Ejemplos de tales células incluyen células cancerosas HLA-24 positivas.

Además de las modificaciones anteriormente descritas, los péptidos de la presente invención también pueden unirse a otros péptidos, mientras que el péptido unido resultante retenga la inducibilidad de CTL requerida del péptido original, y más preferentemente también retenga la capacidad de unión a HLA requerida. Ejemplos de "otros" péptidos adecuados incluyen: los péptidos de la presente invención o los péptidos inducibles por CTL derivados de otros TAA. El péptido de la presente invención puede estar unido a "otro" péptido mediante un conector directamente o indirectamente. 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. Sutmuller 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 posteriormente o simultáneamente péptidos de antígeno asociados a tumor distintos de TOPK para aumentar la respuesta inmunitaria mediante la clase I y/o clase II de HLA. Está bien establecido que las células cancerosas pueden expresar más de un gen asociado a tumor. Así, está dentro del alcance de la experimentación rutinaria para un experto habitual en la materia determinar si un sujeto particular expresa genes asociados a tumor adicionales, y entonces incluir los péptidos de unión a la clase I de HLA y/o los péptidos de unión a la clase II de HLA derivados de tales productos génicos en las composiciones farmacéuticas o vacunas de la presente invención.

Algunos de los pépticos de unión a la clase I de HLA y la clase II de HLA son conocidos para aquellos expertos habituales en la materia (por ejemplo, véase Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995), y pueden usarse en la presente invención de una manera similar a los desvelados en el presente documento. Así, un experto habitual en la materia puede preparar fácilmente polipéptidos que incluyen uno o más péptidos TOPK y uno o más de los péptidos distintos de TOPK, o ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos, usando procedimientos convencionales de biología molecular.

Los péptidos unidos anteriormente descritos se denominan en el presente documento "politopes", es decir, grupos de dos o más péptidos posiblemente inmunogénicos o estimulantes de la 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, mientras que el péptido unido resultante retenga la inducibilidad de CTL requerida del péptido original. Ejemplos de sustancias adecuadas 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 péptido.

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 ser adaptado a los presentes péptidos. La estabilidad de un péptido puede ensayarse de 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, insertados o añadidos por 1 o 2 restos de aminoácidos, pueden cribarse o seleccionarse aquellos que tienen la misma actividad o más alta en comparación con los péptidos originales. La presente invención, por tanto, también proporciona un método de cribado de un péptido que tiene una capacidad para inducir un CTL que tiene actividad citotóxica específica contra una célula que presenta un fragmento derivado de TOPK, en la que el método comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia candidata que consiste en una secuencia de aminoácidos modificada sustituyendo, insertando y/o añadiendo uno o dos restos de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos original, en la que la secuencia de aminoácidos original está seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28;

(ii) seleccionar una secuencia candidata que no tiene homología significativa sustancial (o identidad de secuencia) con los péptidos derivados de cualquier producto génico humano conocido distinto de TOPK;

(iii) poner en contacto un péptido que consiste en la secuencia candidata seleccionada en la etapa (ii) con una célula presentadora de antígenos;

(iv) poner en contacto la célula presentadora de antígenos de la etapa (iii) con un linfocito T CD8 positivo; y

(v) identificar el péptido cuya inducibilidad de CTL es la misma a o superior a la de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos original.

En el presente documento, la actividad que va a ensayarse puede incluir actividad de unión a MHC, inducibilidad de APC o de CTL y actividad citotóxica. Preferentemente, la actividad del péptido que va a ensayarse es inducibilidad de CTL.

III. Preparación de péptidos TOPK:

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 para 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 la incorporación de uno o más D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácidos que pueden usarse, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero de los péptidos.

Los péptidos de la presente invención pueden obtenerse mediante síntesis química basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Ejemplos de métodos de síntesis de péptidos convencionales que pueden ser adaptados 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. 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 un polinucleótido que codifica cualquiera de los péptidos anteriormente mencionados de la presente invención. Éstos incluyen polinucleótidos derivados del gen TOPK que se produce naturalmente (por ejemplo, Nº de acceso de GenBank NM_018492 (SEQ ID NO: 85)), 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 materia 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 implícitamente descrita en cada secuencia desvelada.

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

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.

Pueden usarse tanto técnicas de síntesis recombinante como química para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, puede producirse un polinucleótido por inserción en un vector apropiado, que puede expresarse cuando se transfecta en una célula competente. Alternativamente, puede amplificarse un polinucleótido usando técnicas de PCR o expresión en hospedadores adecuados (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: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5.

V. Exosomas

La presente invención proporciona además vesículas intracelulares, llamadas, exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de la presente invención y antígenos HLA sobre su superficie. Los exosomas 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, de un modo similar a los péptidos de la presente invención.

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 predominantes y, por tanto, serían apropiados para el tratamiento de pacientes japoneses. El uso del tipo HLA-A24 que se expresa altamente entre los japoneses y caucásicos es favorable para obtener resultados eficaces, y subtipos tales como HLA-A*2402, HLA-A*0201 y HLA-A*0206 también encuentran uso. Normalmente, en la clínica, se investiga de antemano el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento, que permite la selección apropiada de péptidos que tienen altos niveles de afinidad de unión al antígeno particular, o que tienen inducibilidad de CTL por la presentación del antígeno. Además, con el fin de obtener péptidos que tienen tanto alta afinidad de unión como inducibilidad de CTL, pueden realizarse sustitución, inserción, deleción y/o adición de 1, 2 o

varios aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido parcial TOPK que existen de forma natural.

Cuando el exosoma de la presente invención posee el tipo HLA-A24 como antígeno, los péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 tienen utilidad particular.

En realizaciones típicas, el exosoma de la presente invención presenta un complejo de un péptido de menos de 15 aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 (o péptido modificado del mismo) y HLA-A24 sobre su superficie.

VI. Células presentadoras de antígenos (APC)

La presente invención también proporciona células presentadoras de antígenos (APC) aisladas que presentan complejos formados entre antígenos HLA y los péptidos de la presente invención sobre 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, exosomas o CTL de la presente invención.

Las APC no se limitan a un tipo particular de células. Ejemplos de APC incluyen, pero no se limitan a, células dendríticas (DC), células de Langerhans, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T activados, que son conocidas por presentar antígenos proteináceos sobre su superficie celular de manera que sean reconocidos por los linfocitos. Como las DC son APC representativas que tienen la actividad de inducción de CTL más fuerte de entre las APC, las DC pueden usarse preferentemente 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. En el presente documento, la expresión "inducir una APC" incluye poner en contacto (estimular) una célula presentadora de antígenos con los péptidos de la presente invención, o introducir un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención en una célula presentadora de antígenos para hacer que la APC presente un complejo formado entre un antígeno HLA y un péptido de la presente invención sobre su superficie. Por ejemplo, las APC de la presente invención pueden obtenerse recogiendo APC de un sujeto después de administrar uno o más péptidos de la presente invención al sujeto. Alternativamente, las APC de la presente invención pueden obtenerse poniendo en contacto APC, que han sido recogidas 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: recoger APC de un primer sujeto,

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

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

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 formularse y administrarse como una vacuna para tratar y/o prevenir cáncer, tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, CPCP, tumor de tejido blando y tumor testicular, pero no se limitan a éstos.

En el contexto de la presente invención, pueden utilizarse uno o más péptidos de la presente invención para la fabricación de una composición farmacéutica para inducir una célula presentadora de antígenos. Un método o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica para inducir una célula presentadora de antígenos se proporciona en el presente documento y preferentemente incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona el péptido de la presente invención para su uso en inducir una célula presentadora de antígenos.

Según un aspecto de la presente invención, las APC de la presente invención tienen inducibilidad de CTL. En el contexto de las APC, la expresión " inducibilidad de CTL" se refiere a la capacidad de una APC para inducir un CTL cuando se pone en contacto con un linfocito T CD8 positivo. Además, "inducibilidad de CTL" incluye la capacidad de una APC para inducir activación de CTL, proliferación de CTL, promover la lisis de una célula diana por un CTL, y aumentar la producción de IFN-gamma por un CTL. En particular, las APC de la presente invención tienen una capacidad para inducir CTL específicos para TOPK.

Tales APC que tienen 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 APC *in vitro*, además del método mencionado anteriormente. El polinucleótido introducido puede 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, y 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. Transfiriendo el gen que codifica el péptido de la presente invención a APC, el gen experimenta transcripción, traducción, y similares, en la célula, y entonces la proteína obtenida es procesada por la clase I o clase II de MHC, y avanza a través de una vía de presentación para presentar los péptidos de la presente invención. Alternativamente, las APC de la presente invención pueden prepararse por un método que induce la etapa de poner en contacto APC con el péptido de la presente invención.

En realizaciones típicas, la APC de la presente invención presenta un complejo de un péptido de menos de 15 aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 (o péptido modificado de la misma) y HLA-A24 sobre 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, de un modo similar a los péptidos en sí. Así, la presente invención proporciona CTL aislados que son específicamente inducidos o activados por uno cualquiera de los péptidos de la presente invención.

Tales CTL pueden obtenerse (1) administrando el (los) péptido(s) de la presente invención a un sujeto, (2) poniendo en contacto (estimulando) las APC derivadas del sujeto, y células TCD8 positivas, o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con el (los) péptido(s) de la presente invención, (3) poniendo en contacto los linfocitos T CD8-positivos o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con las APC o exosomas que presentan un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención sobre su superficie o (4) introduciendo un polinucleótido/polinucleótidos que codifican subunidades de receptores de linfocitos T (TCR) que pueden formar un TCR que tiene una capacidad para unirse a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención sobre una superficie celular. Tales APC o exosomas para el método de (3) pueden prepararse por los métodos descritos anteriormente. 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, APC 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 TOPK, tales como células de cáncer, o células que son transfectadas con el gen TOPK; y células que presentan un péptido de la presente invención sobre la superficie celular debido a estimulación por el péptido también pueden servir de dianas del ataque por CTL activado.

En algunas realizaciones, los CTL de la presente invención pueden reconocer células que presentan complejos de un antígeno HLA-A24 o HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre su superficie. En el contexto de CTL, la expresión "reconocen una célula" se refiere a la unión de un complejo de un antígeno HLA-A24 y el péptido de la presente invención sobre la superficie celular mediante su TCR y que muestra actividad citotóxica específica contra la célula. En el presente documento, "actividad citotóxica específica" se refiere a que muestra actividad citotóxica contra la célula que presenta un complejo de un antígeno HLA-A24 y el péptido de la presente invención, pero no otras células. Por consiguiente, los CTL que muestran actividad citotóxica específica contra una célula que presenta el péptido de la presente invención están incluidos en la presente invención.

En realizaciones típicas, el CTL de la presente invención puede reconocer una célula que presenta un péptido de menos de 15 aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 (o péptido modificado de la misma) mediante un HLA-A24. En realizaciones preferidas, tal CTL de la presente invención puede reconocer una célula que expresa TOPK y un HLA-A24 (por ejemplo, célula cancerosa HLA-A24 positiva).

VIII. Receptor de linfocitos T (TCR):

La presente invención también proporciona una composición que incluye uno o más polinucleótidos que codifican polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de linfocitos T (TCR), y métodos de uso de la misma. Tales subunidades de TCR tienen la capacidad de formar TCR que confieren especificidad a los linfocitos T frente a las células tumorales que expresan TOPK. Usando métodos conocidos en la materia, puede identificarse el polinucleótido que codifica cada una de las cadenas alfa y beta como las subunidades de TCR del CTL inducido con los péptidos de la presente invención (documento WO2007/032255 y Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Por ejemplo, se prefiere el método de PCR para analizar el TCR. Los cebadores de PCR para el análisis pueden ser, por ejemplo, cebadores 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (SEQ ID NO: 87) como cebador del lado 5' y cebadores 3-

TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID NO: 88) específicos para la región C de la cadena alfa de TCR, cebadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (SEQ ID NO: 89) específicos para la región C1 de la cadena beta de TCR o cebadores 3-TRbeta-C2 (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3') (SEQ ID NO: 90) específicos para la región C2 de la cadena beta de TCR como cebadores del lado 3', pero no se limitan a éstos. Los TCR derivados pueden unirse a células diana que presentan el péptido TOPK con alta avidez, y opcionalmente median en la eficiente destrucción de células diana que presentan el péptido TOPK de la presente invención *in vivo* e *in vitro*.

El polinucleótido/polinucleótidos que codifican las subunidades de TCR (es decir, el polinucleótido que codifica ambas de las subunidades de TCR o los polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR) pueden incorporarse en vectores adecuados, por ejemplo, vectores retrovirales. Estos vectores son muy conocidos en la técnica. Los polinucleótidos o los vectores que los incluyen pueden transferirse útilmente a un linfocito T (por ejemplo, linfocito T CD8 positivo), por ejemplo, un linfocito T de un paciente. Ventajosamente, la presente invención proporciona una composición disponible para venta que permite la rápida modificación de los propios linfocitos T de un paciente (o aquellos de otro mamífero) para producir rápidamente y fácilmente linfocitos T modificados que tienen excelentes propiedades de destrucción de células cancerosas.

TCR específicos contra los péptidos de la presente invención deben ser capaces de reconocer específicamente un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA, dando una actividad de linfocitos T específica contra la célula diana que presenta un complejo del péptido de la presente invención y un antígeno HLA cuando el TCR se expresa sobre la superficie del linfocito T. La actividad requerida puede confirmarse por cualquier método conocido de tal forma que los CTL preparados introduciendo el (los) polipéptido(s) que codifica(n) tales subunidades de TCR puedan reconocer específicamente tales células diana. Ejemplos preferidos de tal método incluyen, por ejemplo, análisis de tetrámeros usando moléculas de HLA y los péptidos de la presente invención, y ensayo de ELISPOT. Por ensayo de ELISPOT, puede confirmarse que los CTL preparados por los métodos descritos anteriormente pueden reconocer específicamente las células diana, y que las señales generadas por tal reconocimiento pueden transmitirse intracelularmente. Además, puede confirmarse por un método conocido que los CTL preparados por el método descrito anteriormente tienen actividad citotóxica específica contra las células diana. Ejemplos de tales métodos incluyen, por ejemplo, ensayo de liberación de cromo usando células que expresan ambos de TOPK y HLA-A24.

En un aspecto, la presente invención proporciona CTL que se preparan por transducción con el polipéptido/polipéptidos que codifican los polipéptidos de subunidad de TCR (es decir, el polinucleótido que codifica ambos de las subunidades de TCR o polinucleótidos que codifica cada una de las subunidades de TCR), en la que el TCR formado por tales subunidades de TCR puede unirse a un complejo del péptido TOPK que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 y un antígeno HLA-A24 sobre la superficie celular.

Los CTL transducidos son capaces de albergar células cancerosas *in vivo*, y pueden expandirse por métodos de cultivo muy 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 cualquiera o ambos del tratamiento y la prevención del cáncer en un paciente en necesidad de terapia o protección (véase el documento WO2006/031221).

IX. Agentes o composiciones farmacéuticas:

Como la expresión de TOPK es específicamente elevada en cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan necesariamente a, LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando en comparación con tejido normal, los péptidos o polinucleótidos de la presente invención pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer y así sirven para tratar y/o prevenir el cáncer y/o para prevenir una reaparición metastásica o posoperatoria del mismo. Así, la presente invención proporciona composiciones o agentes farmacéuticos formulados para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/o para la prevención de una reaparición posoperatoria del mismo, incluyendo tales composiciones o agentes uno o más de los péptidos, o polinucleótidos, de la presente invención como uno o más principios activos. Alternativamente, los péptidos de la presente invención pueden expresarse sobre la superficie de cualquiera de los exosomas o células anteriores, tales como APC, para el uso como composiciones o agentes farmacéuticos. Además, los CTL anteriormente mencionados que se dirigen a uno cualquiera de los péptidos de la presente invención también pueden usarse como principio activo de las presentes composiciones o agentes farmacéuticos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona agentes o composiciones que incluyen al menos un principio activo seleccionado de entre:

(a) uno o más péptidos de la presente invención;

(b) uno o más polinucleótidos que codifican un péptido tal de la presente invención en una forma expresable;

(c) una o más APC o exosomas de la presente invención; y

(d) uno o más CTL de la presente invención.

Las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención también encuentran uso como una vacuna. En el contexto de la presente invención, la expresión "vacuna" (también denominada una "composición inmunogénica") se refiere a un agente o composición que tiene la función de mejorar, potenciar y/o inducir inmunidad antitumoral tras la inoculación en un animal. En otras palabras, la presente invención proporciona los agentes o composiciones farmacéuticas para inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto.

Las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden usarse para tratar y/o prevenir cáncer y/o prevenir una reaparición posoperatoria o metastásica del mismo en sujetos o pacientes. Ejemplos de tales sujetos incluyen seres humanos, además de otros mamíferos que incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, cobayas, conejos, gatos, perros, ovejas, cabras, cerdos, ganado vacuno, caballos, monos, babuinos y chimpancés, animales particularmente comercialmente importantes o animales domesticados. En algunas realizaciones, los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24.

En otra realización, la presente invención también proporciona el uso de un principio activo en la fabricación de una composición o agente farmacéutico para tratar y/ o prevenir cáncer o tumor, y/o prevenir una reaparición posoperatoria del mismo, dicho principio activo seleccionado de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un polinucleótido que codifica un péptido tal de la presente invención en una forma expresable;

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

(d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y

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

Alternativamente, la presente invención proporciona además un principio activo para su uso en cualquiera o ambos del tratamiento y la prevención de cánceres o tumores, y/o la prevención de una reaparición posoperatoria de los mismos, dicho principio activo seleccionado de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un polinucleótido que codifica un péptido tal de la presente invención en una forma expresable;

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

(d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y

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

Alternativamente, la presente invención proporciona además un método o proceso para la fabricación de una composición o agente farmacéutico para tratar y/o prevenir un cáncer o tumor, y/o prevenir una reaparición posoperatoria del mismo, en el que el método o proceso incluye la etapa de formular una vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable con un principio activo seleccionado de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un polinucleótido que codifica un péptido tal de la presente invención en una forma expresable;

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

(d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y

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

En otra realización, la presente invención también proporciona un método o proceso para la fabricación de una composición o agente farmacéutico para tratar y/o prevenir un cáncer o tumor, y/o prevenir una reaparición posoperatoria del mismo, en el que el método o proceso incluye las etapas de mezclar un principio activo con un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, en el que el principio activo está seleccionado de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un polinucleótido que codifica un péptido tal de la presente invención en una forma expresable;

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

(d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y

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

Según la presente invención, péptidos de menos de 15 aminoácidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 pueden inducir eficazmente respuesta inmunitaria potente y específica contra el cáncer que expresa HLA-A24 y TOPK en un sujeto. Por tanto, las composiciones o agentes farmacéuticos que incluyen cualquiera de péptidos con la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 y péptidos modificados de la misma son particularmente aptos para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A24. Lo mismo se aplica a composiciones o agentes farmacéuticos que contienen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de la presente invención).

Cánceres que van a ser tratados por las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención incluyen todos los tipos de cánceres en los que participa TOPK, que incluyen, pero no se limitan a, LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando.

Las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención 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, y similares. Ejemplos de tales "otros" péptidos que tienen la capacidad de inducir CTL contra células cancerosas incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos del cáncer (por ejemplo, TAA identificados).

Si es necesario, las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como un principio activo adicional, siempre que las sustancias no inhiban el efecto antitumoral del principio, por ejemplo, cualquiera de los péptidos, de la presente invención. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir sustancias antiinflamatorias, analgésicos, quimioterapéuticos y similares. Además de incluir otras sustancias terapéuticas en el propio medicamento, los medicamentos de la presente invención también pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente con una o varias otras composiciones farmacológicas. Las cantidades de medicamento y composición farmacológica dependen, por ejemplo, de qué tipo de composición (composiciones) farmacológica(s) o se use, la enfermedad que esté tratándose, y el programa y vías de administración.

Aquellos expertos en la materia reconocerán que, además de los componentes particularmente mencionados en el presente documento, las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden incluir otras sustancias convencionales en la técnica que tienen en cuenta el tipo de formulación en cuestión (por ejemplo, cargas, aglutinantes, diluyentes, excipientes, etc.).

En una realización de la presente invención, las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden ser incluidas en artículos de fabricación y kits 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 composiciones o agentes farmacéuticos 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 composición o agente que se usa para el tratamiento o la 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 una composición o agente farmacéutico 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 o agentes farmacéuticos pueden envasarse, 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 o composiciones farmacéuticas que contienen péptidos como principio activo

Los péptidos de la presente invención pueden administrarse directamente como una composición o agente farmacéutico, o si fuera necesario, pueden 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 incluyen, pero no se limitan a, agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón fosfato, líquido de cultivo y similares. Además, las composiciones o

agentes farmacéuticos pueden contener, según sea necesario, estabilizadores, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares. Las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden usarse para fines contra el cáncer.

Los péptidos de la presente invención pueden prepararse como una combinación compuesta de dos o más péptidos de la presente invención, para inducir CTL *in vivo*. La combinación de péptidos 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. Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes. Al administrar los péptidos de la presente invención, los péptidos son presentados a una alta densidad por los antígenos HLA 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 extraen 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 sobre su superficie celular. Estas APC pueden volver a ser administradas al sujeto para inducir CTL en los sujetos, y como resultado, puede aumentarse la agresividad hacia el endotelio asociado a tumor.

Las composiciones o agentes farmacéuticos para el tratamiento y/o la prevención de cáncer que contienen cualquier péptido de la presente invención como principio activo también pueden incluir un adyuvante conocido por establecer eficazmente inmunidad celular. Alternativamente, las composiciones o agentes farmacéuticos pueden administrarse con otros principios activos, o administrarse por formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a un compuesto que potencia la respuesta inmunitaria contra la proteína cuando se administra junto (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Adyuvantes contemplados en el presente documento incluyen aquellos 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, IFA (adyuvante incompleto de Freund), CFA (adyuvante completo de Freund), ISCOMatrix, GM-CSF, CpG, emulsión O/W y similares.

Además, pueden usarse convenientemente formulaciones de liposomas, formulaciones granulares en las que el péptido está unido a perlas de diámetro de algunos micrómetros, y formulaciones en las que un lípido está unido al péptido.

En otra realización de la presente invención, los péptidos de la presente invención también 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 (ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, etc.) y sales con un ácido inorgánico (ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, etc.). Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y propiedades del compuesto y que se obtienen mediante reacción con ácidos o bases inorgánicos u orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

En algunas realizaciones, las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención puede además incluir un componente que sensibiliza a los CTL. Se han identificado lípidos como sustancias 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).

Ejemplos de métodos adecuados de administración incluyen, pero no se limitan necesariamente a, vía oral, inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraósea, peritoneal e intravenosa, o similares, y administración sistémica o administración local en los alrededores de los sitios dirigidos (es decir, inyección directa). 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 1000 mg, por ejemplo, 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 10 mg, por ejemplo, 0,5 mg a 5 mg, y puede administrarse una vez en unos cuantos días a unos cuantos meses. Un experto en la materia puede determinar fácilmente dosificaciones adecuadas y óptimas.

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

Las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención también pueden contener ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la presente invención 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 ilustrativa, 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 homologa). Véanse, 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 el 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 Guerin). 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.

La administración de un polinucleótido en un paciente puede ser ya sea directa, cuyo caso el paciente se expone directamente a un vector transportador de polinucleótido, o indirecta, en cuyo caso 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*.

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

Al igual que la administración de péptidos, la administración de polinucleótidos pueden realizarse por vía oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraósea y/o peritoneal, o similares, y mediante 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, 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 10 mg, por ejemplo, 0,5 mg a 5 mg, y puede administrarse una vez cada unos cuantos días a una vez cada unos cuantos meses. Un experto en la materia puede determinar fácilmente dosificaciones adecuadas y óptimas.

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

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

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

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

Los métodos *in vitro* de la presente invención incluyen la etapa de poner en contacto APC con los péptidos de la presente invención *in vitro*.

Las APC no se limitan a un tipo particular de células. Ejemplos de APC incluyen, pero no se limitan a, DC, células de Langerhans, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T activados, que son conocidas por presentar antígenos proteináceos sobre 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 un péptido cualquiera de la presente invención por sí mismo o en combinación con otros péptidos de la presente invención o péptidos inducibles por CTL derivados de TAA distintos de TOPK.

La expresión "forma expresable" se describió anteriormente en la sección "IX. Composiciones o agentes farmacéuticos (2) Composiciones o agentes farmacéuticos que contienen polinucleótidos como principio activo".

Alternativamente, los métodos *in vitro* de la presente invención pueden incluir la etapa de introducir un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención en una APC para inducir una APC con inducibilidad de CTL.

Alternativamente, los métodos *in vitro* de la presente invención pueden incluir la etapa de preparación de una célula presentadora de antígenos (APC) que puede inducir específicamente actividad de CTL contra TOPK, mediante una de las siguientes etapas:

(a) poner en contacto una APC con un péptido de la presente invención *in vitro*; y

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

Alternativamente, los métodos *in vitro* de la presente invención pueden servir para inducir una APC que tiene inducibilidad de CTL, incluyendo tales métodos una etapa seleccionada de entre:

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

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

En una realización preferida, la presente invención proporciona el método de inducir o preparar una APC que tiene inducibilidad de CTL, incluyendo tal método una de las siguientes etapas:

(a) poner en contacto una APC que expresa HLA-A24 con un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 o péptido modificado de la misma *in vitro*; y

(b) introducir un polinucleótido que codifica un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 o péptido modificado de la misma en una APC que expresa HLA-A24.

Las APC inducidas por el método anterior presentan tales péptidos mediante HLA-A24 sobre su superficie, y pueden inducir CTL que tienen actividad citotóxica específica frente a células que expresan HLA-A24 y TOPK.

Los métodos de la presente invención se llevan a cabo *in vitro*. Las APC usadas para la inducción de APC que tienen inducibilidad de CTL pueden ser preferentemente APC que expresan el antígeno HLA-A24. Tales APC pueden prepararse por los métodos muy conocidos en las técnicas de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24. Las APC inducidas por el método de la presente invención pueden ser APC que presentan un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA-A24 en su superficie. Cuando las APC inducidas por el método de la presente invención se administran a un sujeto con el fin de inducir respuestas inmunitarias contra el cáncer en el sujeto, el sujeto es preferentemente el mismo del que derivaron las APC. Sin embargo, el sujeto puede ser uno diferente del donante de APC mientras que el sujeto tenga el mismo HLA con el donante de APC.

En otra realización, la presente invención proporciona agentes o composiciones para su uso en inducir una APC que tiene inducibilidad de CTL, y tales agentes o composiciones incluyen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

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

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

(2) Métodos de inducción de CTL

La presente invención también proporciona métodos *in vitro* de inducción de CTL, los métodos de inducción de CTL incluyen una etapa seleccionada de entre:

a: co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con una célula presentadora de antígenos que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención;

b: co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención; y

c: introducir un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos que son capaces de formar un TCR que es capaz de reconocer un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA en un linfocito T CD8 positivo.

Las APC que van a co-cultivarse con las células TCD8 positivas en la etapa c anterior pueden también prepararse transfiriendo 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, engloba cualquier APC que presente eficazmente sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención.

Opcionalmente, puede utilizarse un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención en lugar de las APC anteriormente mencionadas. Concretamente, la presente invención puede incluir la etapa de co-cultivar exosomas que presentan sobre 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". APC y exosomas adecuados para el método *in vitro* de la presente invención presentan un complejo del péptido de la presente invención y HLA-A24 sobre su superficie. Por ejemplo, una APC o exosoma que presenta un complejo de un HLA-A24 y un péptido de menos de 15 aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28 (o péptido modificado de la misma) sobre su superficie puede utilizarse preferentemente para inducir un CTL que tiene actividad citotóxica específica contra una célula que expresa HLA-A24 y TOPK.

Además, el CTL de la presente invención puede inducirse introduciendo en un linfocito T CD8 positivo un polinucleótido/polinucleótidos que codifican las subunidades de TCR, en las que el TCR formado por tales subunidades de TCR es capaz de unirse a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la invención sobre una superficie celular. Tal transducción puede realizarse como se ha descrito anteriormente en la sección "VIII. Receptor de linfocitos T (TCR)".

Los métodos de la presente invención se llevan a cabo *in vitro*. Preferiblemente, los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo *in vitro* o *ex vivo*. Pueden prepararse linfocitos T CD8 positivos usados para la inducción de CTL por métodos muy conocidos en la materia a partir de CMSP obtenidas de un sujeto. En realizaciones preferidas, el donante para linfocitos T CD8 positivos puede ser un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24. Los CTL inducidos por los métodos de la presente invención pueden ser CTL que pueden reconocer células que presentan un complejo del péptido de la presente invención y antígeno HLA sobre su superficie. Tales CTL pueden mostrar actividad citotóxica específica frente a células que presentan el péptido de la presente invención sobre su superficie y, por tanto, pueden mostrar actividad citotóxica específica frente a células que expresan TOPK (por ejemplo, células cancerosas). Cuando los CTL inducidos por el método de la presente invención se administran a un sujeto con el fin de inducir respuestas inmunitarias contra el cáncer en el sujeto, el sujeto es preferentemente el mismo del que derivan los linfocitos T CD8. Sin embargo, el sujeto puede ser uno diferente del donante de linfocitos T CD8 positivo mientras que el sujeto tenga el mismo tipo de HLA con el donante de linfocitos T CD8 positivos.

Además, la presente invención proporciona un método o proceso para la fabricación de una composición o agente farmacéutico 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.

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

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

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

(3) Métodos de inducción de la respuesta inmunitaria

Además, la presente divulgación proporciona métodos de inducción de una respuesta inmunitaria contra enfermedades relacionadas con TOPK. Enfermedades contempladas incluyen cáncer, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando.

Los métodos pueden incluir la etapa de administrar agente(s) o composición (composiciones) que contienen cualquiera de los péptidos de la presente invención o polinucleótidos que los codifican. Alternativamente, el método también incluye la etapa de administrar exosomas o APC que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención. Para detalles, véase el punto de "IX. Agentes o composiciones farmacéuticas", particularmente la parte que describe el uso de composiciones farmacéuticas de la presente invención como vacunas. Además, los exosomas y APC que pueden emplearse para los presentes métodos de inducción de respuesta inmunitaria se

describen en detalle en los puntos de "V. Exosomas", "VI. Células presentadoras de antígenos (APC)", y (1) y (2) de "X. Métodos de uso de los péptidos, exosomas, APC y CTL", arriba.

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

En el contexto de la presente invención, un cáncer que expresa en exceso TOPK puede tratarse con estos principios activos. Ejemplos de tales cáncer incluyen, pero no se limitan a, LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando. Por consiguiente, antes de la administración de las vacunas o composiciones o agentes farmacéuticos que incluyen los principios activos anteriormente mencionados, es preferible confirmar si se potencia el nivel de expresión de TOPK en el sujeto que va a tratarse. Así, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer que expresa (en exceso) TOPK en un paciente en necesidad del mismo, incluyendo tal método las etapas de:

i) determinar el nivel de expresión de TOPK en muestra(s) biológica(s) obtenida(s) de un sujeto con el cáncer que va a tratarse;

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

iii) administrar al menos un componente seleccionado de entre (a) a (d) descritas anteriormente a un sujeto con cáncer que expresan en exceso TOPK en comparación con el control normal.

La presente divulgación proporciona además un método de identificación de un sujeto que va a tratarse con el polipéptido TOPK de la presente invención, incluyendo tal método la etapa de determinar un nivel de expresión de TOPK en muestra(s) biológica(s) derivada(s) del sujeto, 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 TOPK de la presente invención. Los métodos para tratar cáncer se describirán en más detalle más adelante.

Cualquier célula o tejido derivado de sujeto puede usarse para la determinación de la expresión de TOPK mientras que incluye el producto de transcripción o traducción objetivo de TOPK. Ejemplos de muestras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, tejidos y fluidos corporales, tales como sangre, esputo y orina. Preferentemente, la muestra de células o tisular 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 que es canceroso. Además, si fuera necesario, la célula puede purificarse a partir de los tejidos y fluidos corporales obtenidos, y entonces se usa como la muestra derivada de sujeto.

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

Puede determinarse el nivel de expresión de TOPK en la muestra biológica obtenida de un sujeto. El nivel de expresión puede determinarse al nivel de productos de transcripción (ácido nucleico), usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARNm de TOPK puede cuantificarse usando sondas por métodos de hibridación (por ejemplo, hibridación Northern). La detección puede llevarse a cabo sobre un chip o una matriz. Es preferible el uso de una matriz para detectar el nivel de expresión de TOPK. Aquellos expertos en la materia pueden preparar tales sondas utilizando la información de secuencias de TOPK. Por ejemplo, puede usarse el ADNc de TOPK como sondas. Si fuera necesario, las sondas pueden marcarse con una marca adecuada, tales como colorantes, sustancias fluorescentes e isótopos, y el nivel de expresión del gen puede detectarse como la intensidad de las marcas hibridadas.

Además, puede cuantificarse el producto de transcripción de TOPK 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 TOPK. 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 grados centígrados más baja que el punto de fusión térmico (Tm) para una secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La Tm 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 Tm, 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 grados centígrados para sondas o cebadores cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 grados centígrados para sondas o cebadores más largos. También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de sustancias desestabilizantes, tales como formamida.

Una sonda o cebador de la presente divulgación normalmente es un oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido normalmente incluye una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 o 25, la secuencia de nucleótidos de hebra codificante consecutiva de un ácido nucleico que incluye una secuencia de TOPK, o una secuencia de nucleótidos de hebra no codificante de un ácido nucleico que incluye una secuencia de TOPK, o de un mutante que existe de forma natural de estas secuencias. En particular, por ejemplo, en una realización preferida, puede usarse un oligonucleótido que tiene 5-50 de longitud como cebador para amplificar los genes, que va a detectarse. Más preferentemente, el ARNm o ADNc de un gen TOPK puede detectarse con sonda de oligonucleótidos o cebador de un tamaño específico, generalmente 15-30 b de longitud. El tamaño puede oscilar de al menos 10 nucleótidos, al menos 12 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos y las sondas y cebadores pueden oscilar en tamaño de 5-10 nucleótidos, 10-15 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-25 nucleótidos y 25-30 nucleótidos. En realizaciones preferidas, la longitud de la sonda de oligonucleótidos o cebador puede seleccionarse de 15-25. Procedimientos de ensayo, dispositivos o reactivos para la detección del gen usando tal sonda de oligonucleótidos o cebador son muy conocidos (por ejemplo, micromatriz de oligonucleótidos o PCR). En estos ensayos, sondas o cebadores también pueden incluir secuencias de marca o conectoras. Además, pueden modificarse sondas o cebadores con marca detectable o ligando de afinidad que va a capturarse. Alternativamente, en los procedimientos de detección basados en hibridación, también puede usarse un polinucleótido que tiene algunos centenares de bases (por ejemplo, aproximadamente 100-200) a algunos millares de bases (por ejemplo, aproximadamente 1000-2000) de longitud para una sonda (por ejemplo, ensayo de transferencia Northern o análisis de micromatrices de ADNc).

Alternativamente, el producto de traducción puede ser detectado para el diagnóstico de la presente divulgación. Por ejemplo, puede determinarse la cantidad de proteína TOPK (SEQ ID NO: 86) 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 TOPK. Tales anticuerpos contra los péptidos de la presente invención se proporcionan también 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 para preparar tales anticuerpos y equivalentes de los mismos.

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

Puede determinarse si el nivel de expresión de un gen diana, por ejemplo, el gen TOPK, 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/sujetos cuyo(s) 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 TOPK 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 divulgación, puede compararse el nivel de expresión del gen TOPK en una muestra biológica con niveles de control múltiples, que se determinan 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 TOPK 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 +/- 2 D.E. o media +/- 3 D.E. como valor estándar.

En el contexto de la presente divulgación, un nivel de control determinado de una muestra biológica que se sabe que no es cancerosa se denomina un "nivel de control normal". Por otra parte, si el nivel de control se determina a partir de una muestra biológica cancerosa, se denomina un "nivel de control canceroso". La diferencia entre un nivel de expresión de muestra y un nivel de control puede normalizarse al nivel de expresión de ácidos nucleicos de control, por ejemplo, genes de mantenimiento, cuyos niveles de expresión son conocidos por no diferenciarse 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 P1 ribosómica.

Cuando el nivel de expresión del gen TOPK 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 divulgación 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 del cáncer, método tal que incluye las etapas de:

a) determinar el nivel de expresión de TOPK en muestra(s) biológica(s) obtenida(s) de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que va a tratarse;

b) comparar el nivel de expresión de TOPK 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 TOPK aumenta en comparación con el nivel de control normal; y

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

Alternativamente, un método tal puede incluir las etapas de:

a) determinar el nivel de expresión de TOPK en muestra(s) biológica(s) obtenida(s) de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que va a tratarse;

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

c) diagnosticar el sujeto como que tiene el cáncer que va a tratarse, si el nivel de expresión de TOPK es similar o equivalente al nivel de control canceroso; y

d) seleccionar al sujeto para el tratamiento del 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 está o se sospecha de está padeciendo o en riesgo de desarrollar un cáncer que puede tratarse con el polipéptido TOPK de la presente invención, que puede también ser útil en cualquiera o ambos de la evaluación y/o monitorización de la eficacia o aplicabilidad de una inmunoterapia contra el cáncer. Preferentemente, el cáncer incluye, pero no se limita a, LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando. Más particularmente, el kit incluye preferentemente al menos un reactivo para detectar la expresión del gen TOPK en una célula derivada de sujeto, reactivo que puede seleccionarse del grupo de:

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

(b) un reactivo para detectar la proteína TOPK o el fragmento inmunológico del mismo; y

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

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

Por otra parte, ejemplos de reactivos adecuados para detectar la proteína TOPK o el fragmento inmunológico de la misma pueden incluir anticuerpos para la proteína TOPK 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 TOPK 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 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. Además, puede incluirse en el kit más de un reactivo para detectar la proteína TOPK.

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 TOPK o anticuerpo contra un péptido TOPK, un medio y recipiente para cultivar células, reactivos de control positivo y negativo, y un anticuerpo secundario para detectar un anticuerpo contra un péptido TOPK. 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 incluyen botellas, frascos y tubos de ensayo. Los recipientes pueden ser formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

En una realización de la presente invención, cuando el reactivo es una sonda contra el ARNm de TOPK, 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 TOPK 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 TOPK. La muestra de control positivo puede prepararse recolectando muestras TOPK positivas y posteriormente ensayando sus niveles de TOPK. Alternativamente, puede añadirse una proteína TOPK purificada o polinucleótido a las células que no expresan TOPK para formar la muestra positiva o la muestra estándar de TOPK. TOPK purificada puede ser una proteína recombinante. El nivel de TOPK 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 un péptido de la presente invención. El cáncer puede ser diagnosticado detectando un anticuerpo en una muestra (por ejemplo, sangre, tejidos) usando un péptido (polipéptido) de la presente invención. El método de preparación de los péptidos son como se describieron anteriormente.

Los métodos de diagnóstico de cáncer de la presente divulgación pueden realizarse determinando la diferencia entre la cantidad de anticuerpo anti-TOPK 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 (TOPK) del gen y se determina que la cantidad del anticuerpo anti-TOPK 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 el método de detección de 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. Con el uso del complejo puede hacerse el diagnóstico, por ejemplo, cuantificando los CTL específicos de péptido de antígeno en los linfocitos de sangre periférica derivados del sujeto que se sospecha que padece cáncer.

La presente divulgación 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. Los péptidos restringidos por HLA-A24 o HLA-A2 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 ser evaluada se induce poniendo en contacto un inmunogén con células inmunocompetentes *in vitro* o *in vivo*. Las células inmunocompetentes para evaluar una respuesta inmunológica pueden seleccionarse de entre sangre periférica, linfocito de sangre periférica (LSP) y célula mononuclear de sangre periférica (CMSP). Métodos de recogida o aislamiento de tales células inmunocompetentes son muy conocidos en las técnicas. Cualquier agente que pueda producir la producción de CTL específicos de antígeno que reconocen y se unen al (a los) epítope(s) de péptido pueden emplearse como reactivo. No necesita usarse el reactivo de péptido como inmunogén. 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. Células inmunocompetentes que van a ponerse 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: 94-96, 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 compuesto del 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, Bertoni 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, se analizan muestras de CMSP de pacientes obtenidas 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 epítope del péptido que reconocen las moléculas específicas de alelo presentes en ese paciente para análisis. La inmunogenicidad de la vacuna indicarse por la presencia de los CTL específicos de epítope 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 ser útiles como reactivos para diagnosticar 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 divulgación proporciona un método de diagnóstico o detección de un trastorno caracterizado por la expresión de un polipéptido inmunogénico TOPK. Estos métodos implican determinar la expresión de un péptido que se une a HLA de TOPK, o un complejo de un péptido que se une a HLA de TOPK 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. 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 TOPK en una muestra biológica, tal como una biopsia de tumor, por protocolos de amplificación por PCR estándar usando cebadores de TOPK. 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 TOPK puede encontrarse en el documento WO2003/27322.

Preferentemente, los métodos de diagnóstico preferidos implican poner en contacto una muestra biológica aislada de un sujeto con un agente específico para el péptido que se une a HLA de TOPK para detectar la presencia del péptido que se une a HLA de TOPK 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 que se une a HLA de TOPK 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 óptimas 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.

El método de diagnóstico de la presente invención puede 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 TOPK 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). 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 hacerse por un método que permite 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 tetrámeros, 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 medicine 6. 631-637 (2002)).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de diagnóstico o evaluación de una respuesta inmunológica de un sujeto administrado al menos uno de los péptidos TOPK de la presente invención, incluyendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto un inmunogén con células inmunocompetentes bajo condición adecuada para la inducción de CTL específico para el inmunogén;

(b) detectar o determinar el nivel de inducción del CTL inducido en la etapa (a); y

(c) correlacionar la respuesta inmunológica del sujeto con el nivel de inducción de CTL.

En el contexto de la presente divulgación, el inmunogén incluye preferentemente al menos uno de (a) un péptido TOPK seleccionado de entre las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 40 y 42 a 84, péptidos que tienen tales secuencias de aminoácidos, y péptidos en los que tales secuencias de aminoácidos se han modificado con sustitución (sustituciones) de 1, 2 o más aminoácidos. Mientras tanto, condiciones adecuadas de inducción de CTL específico de inmunogén son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden cultivarse células inmunocompetentes *in vitro* bajo la presencia de inmunogén (inmunogenes) para inducir CTL específico de inmunogén. Con el fin de inducir CTL específicos de inmunogén, puede añadirse cualquier factor estimulante al cultivo celular. Por ejemplo, IL-2 es factores estimulantes preferibles para la inducción de CTL.

La etapa de monitorizar o evaluar la respuesta inmunológica de un sujeto que va a tratarse con terapia del cáncer con péptidos puede realizarse antes, durante y/o después del tratamiento. En general, durante el protocolo de la terapia del cáncer, se administran péptidos inmunogénicos repetidamente a un sujeto que va a tratarse. Por ejemplo, pueden administrarse péptidos inmunogénicos cada semana durante 3-10 semanas. Por consiguiente, la respuesta inmunológica del sujeto puede evaluarse o monitorizarse durante el protocolo de la terapia del cáncer. Alternativamente, la etapa de evaluación o monitorización de la respuesta inmunológica a la terapia del cáncer puede ser al final del protocolo de terapia.

La inducción potenciada de CTL específico de inmunogén en comparación con un control indica que el sujeto que va a evaluarse o diagnosticarse respondió inmunológicamente al inmunogén (a los inmunogenes) que ha/han sido administrado/s. Controles adecuados para evaluar la respuesta inmunológica pueden incluir, por ejemplo, un nivel de inducción de CTL cuando las células inmunocompetentes se ponen en contacto con no péptido, o péptido(s) de control que tienen secuencias de aminoácidos distintas de cualquier péptido TOPK (por ejemplo, secuencia de aminoácidos aleatoria). La respuesta inmunológica del sujeto puede ser evaluada en un modo específico de secuencia, comparando con una respuesta inmunológica entre cada inmunogén administrado al sujeto. En particular, incluso cuando una mezcla de algunos tipos de péptidos TOPK se administra al sujeto, la respuesta inmunológica podría variar dependiendo de los péptidos. En ese caso, por comparación de la respuesta inmunológica entre cada péptido, pueden identificarse péptidos a los que el sujeto muestra mayor respuesta.

XII. Anticuerpos:

La presente invención proporciona además anticuerpos que se unen a péptidos de la presente invención. Anticuerpos preferidos se unen específicamente a péptidos de la presente invención y no se unirán (o se unirán débilmente) a otros péptidos. Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse a péptidos de la invención, además de a los homólogos de los mismos. Los anticuerpos contra péptidos de la invención pueden encontrar uso en ensayos de diagnóstico y pronóstico del cáncer, además de metodologías de obtención de imagen. Similarmente, tales anticuerpos pueden encontrar uso en el tratamiento, diagnóstico y/o pronóstico de otros cánceres, hasta el punto que TOPK también se expresa o expresa 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 la expresión de TOPK participa, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se

limitan a, LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando.

La presente divulgación también proporciona diversos ensayos inmunológicos para la detección y/o cuantificación de la proteína TOPK (SEQ ID NO: 86) o fragmentos de la misma, que incluyen polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 40 y 42 a 84. Tales ensayos pueden incluir uno o más anticuerpos anti-TOPK capaces de reconocer y unirse a la proteína TOPK o fragmentos de la misma, según convenga. En el contexto de la presente invención, anticuerpos anti-TOPK que se unen al polipéptido TOPK reconocen preferentemente el polipéptido que tiene secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28, preferentemente hasta la exclusión de otros péptidos. La especificidad de unión del anticuerpo puede confirmarse por medio de una prueba de inhibición. Es decir, cuando la unión entre un anticuerpo que va a analizarse y la longitud completa del polipéptido TOPK se inhibe en presencia de cualquier polipéptido de fragmento que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28, se considera que el anticuerpo se une específicamente al fragmento. En el contexto de la presente divulgación, 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 inmunocromatográfica, enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), enzimoinmunoanálisis de fluorescencia (ELIFA), y similares.

Ensayos inmunológicos de la divulgación relacionados, pero no de anticuerpo, también pueden incluir ensayos de inmunogenicidad de linfocitos T (inhibidores o estimulantes), además de ensayos de unión de MHC. Además, la presente divulgación contempla métodos inmunológicos de obtención de imágenes capaces de detectar cánceres que expresan TOPK, ejemplo de los cuales incluyen, pero no se limitan a, métodos de obtención de imágenes radioescintigráficas usando anticuerpos marcados de la presente divulgación. Tales ensayos encuentran uso clínico en la detección, monitorización y pronóstico de TOPK que expresan cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, LMA, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, CPCP y tumor de tejido blando.

La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen a los péptidos de la invención. Un anticuerpo de la invención puede usarse en cualquier forma, por ejemplo como un anticuerpo monoclonal o policlonal, y puede incluir además 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 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 divulgación, péptidos completos y parciales de una proteína pueden servir de antígenos de inmunización. Ejemplos de péptidos parciales adecuados pueden 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 TOPK. Un anticuerpo de la presente invención puede reconocer péptidos de fragmentos de TOPK que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27 y 28. 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 inmunogén. 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 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, aunque preferentemente se tiene en cuenta la compatibilidad con las células parentales usadas para la fusión celular. En general, pueden usarse 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 para su uso en el contexto de la presente invención, 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 y Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981)).

Pueden seleccionarse hibridomas resultantes obtenidos por fusión celular 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 pueden fusionarse 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 pueden entonces ser posteriormente trasplantados 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. Un anticuerpo de la presente invención puede usarse no solo para la purificación y detección de un péptido de la presente invención, sino también como un candidato para agonistas y antagonistas de un 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 y Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1990)). Por ejemplo, un ADN que codifica un anticuerpo puede clonarse a partir de una célula inmunitaria, tal como un hibridoma o un linfocito inmunizado que produce el anticuerpo, insertarse en un vector apropiado e introducirse en células hospedadoras para preparar un anticuerpo recombinante. La presente invención también proporciona anticuerpos recombinantes preparados como se ha descrito anteriormente.

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 monocatenario (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 y Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun y Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol

121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird y 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 1536 (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).

Ejemplos de técnicas de cromatografía adecuadas, con la excepción de la afinidad, incluyen, 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 liquida, tal como HPLC y FPLC.

Por ejemplo, puede usarse la medición de absorbancia, enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (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 que 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.

XIII. Vectores y células hospedadoras

La presente invención también proporciona vectores que codifican un péptido de la presente invención y células hospedadoras en las que se introduce un nucleótido que codifica un péptido de la presente invención. Un vector de la presente invención encuentra utilidad como vehículo de nucleótidos, especialmente un ADN, de la presente invención en célula hospedadora, para expresar un péptido de la presente invención, o administrar un nucleótido de la presente invención para terapia génica.

Cuando se selecciona *E. coli* como la 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 un "ori" adecuado para amplificación en *E. coli* y un gen marcador adecuado 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 derivado de retrovirus (por ejemplo, pZIpneo), 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 fin 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.

En lo sucesivo, la presente invención se describe en más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, aunque los siguientes materiales, métodos y ejemplos pueden servir para ayudar a un experto habitual en la preparación y el uso de ciertas realizaciones de la presente invención, solo está previsto ilustrar aspectos de la presente invención y así de ninguna forma limitar el alcance de la presente invención. Como un experto habitual en la materia reconocerá fácilmente, pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención.

Ejemplos

Materiales y métodos

Líneas celulares

Se compró TISI, línea celular linfoblastoide B HLA-A*2402-positiva de IHWG Cell y Gene Bank (Seattle, WA). Se compraron T2, línea celular linfoblastoide B HLA-A*0201-positiva y COS7, línea celular de riñón de mono verde africano de ATCC.

Selección de candidatos a péptidos derivados de TOPK

Se predijo que los péptidos 9-meros y 10-meros derivados de TOPK (Nº de acceso de GenBank NM_018492; por ejemplo, SEQ ID NO: 85) se unían a cualquiera o ambas de la molécula de HLA-A*2402 y HLA-A*0201 usando el servidor de predicción de uniones "NetMHC3.0" (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus et al., Tissue Antigens. 2003 Nov, 62(5):378-84; Nielsen et al., Protein Sci. 2003 May, 12(5):1007-17, Bioinformatics. 2004 Jun 12:20(9): 1388-97). Estos péptidos se sintetizaron por Biosynthesis (Lewisville, Texas) según un método de síntesis en fase sólida estándar y se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa. La pureza (>90 %) y la identidad de los péptidos se determinaron por HPLC analítica y análisis de espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en sulfóxido de dimetilo a 20 mg/ml y se guardaron a -80 ºC.

Inducción de CTL *in vitro*

Se usaron células dendríticas derivadas de monocito (DC) como las células presentadoras de antígenos para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) a péptidos presentados sobre el antígeno leucocitario humano (HLA).

Las DC se generaron *in vitro* como se describe en cualquier parte (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8). Específicamente, se separaron células mononucleares de sangre periférica aisladas de un voluntario normal (HLA-A*2402 positivo o HLA-A*0201 positivo) por disolución de Ficoll-Paque Plus (Pharmacia) por adherencia a una placa de cultivo de tejido de plástico (Becton Dickinson) de manera que se enriquecieran como la fracción de monocitos. La población enriquecida en monocitos se cultivó en presencia de 1000 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (R&D Systems) y 1000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D Systems) en medio AIM-V (Invitrogen) que contenía 2 % de suero autólogo inactivado por calor (AS). Después de 7 días de cultivo, las DC inducidas por citocina se pulsaron con 20 micro-g/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en presencia de 3 micro-g/ml de beta-2-microglobulina durante 3 h a 37 ºC en medio AIM-V. Pareció que las células generadas expresaban moléculas asociadas a DC, tales como CD80, CD83, CD86 y clase II de HLA, sobre sus superficies celulares (datos no mostrados). Estas DC pulsadas con péptido se inactivaron entonces por irradiación con rayos X (20 Gy) y se mezclaron a una relación 1:20 con linfocitos T $CD8^+$ autólogos, obtenidos por selección positiva con el kit CD8 Positive Isolation (Dynal). Estos cultivos se dispusieron en placas de 48 pocillos (Corning); cada pocillo contuvo 1,5 X 10^4 DC pulsadas con péptido, 3 X 10^5 linfocitos T $CD8^+$ y 10 ng/ml de IL-7 (R&D Systems) en 0,5 ml de medio AIM-V/2 % de AS. Tres días después, estos cultivos se complementaron con IL-2 (CHIRON) a una concentración final de 20 UI/ml. En el día 7 y 14, los linfocitos T se estimularon adicionalmente con las DC pulsadas con péptido autólogo. Las DC se prepararon cada vez por la misma forma descrita anteriormente. Los CTLTISI se probaron contra células T2 pulsadas con péptido después de la 3ª ronda de estimulación de péptido en el día 21 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

Procedimiento de expansión de CTL

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

Establecimiento de clones de CTL

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

Actividad de CTL específica

Para examinar la actividad de CTL específica, se realizaron ensayo de ELISPOT de IFN-gamma y ELISA de IFN-gamma. Se prepararon células TISI o células T2 pulsadas con péptido (1 X 10^4/pocillo) como células estimuladoras. Se usaron células cultivadas en placa de 48 pocillos, líneas de CTL y clones de CTL como células respondedoras. Se realizaron ensayo de ELISPOT de IFN-gamma y ELISA de IFN-gamma según el procedimiento del fabricante.

Establecimiento de células que expresan forzadamente cualquiera o ambos del gen diana y HLA-A24 o HLA-A2

Se amplificó por PCR el ADNc que codifica un marco de lectura abierto de genes diana, HLA-A*2402 o HLA-A*0201. Se clonó el producto amplificado por PCR en vector de expresión. Los plásmidos se transfectaron en COS7, que es la línea celular nula para genes diana, nula para HLA-A*0201 y nula para HLA-A*2402, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según el procedimiento del fabricante. Después de 2 días desde la transfección, las células transfectadas se recogieron con Versene (Invitrogen) y se usaron como las células estimuladoras (5 X 10^4 células/pocillo) para el ensayo de actividad de CTL.

Capacidad de CTL para reconocer la línea celular diana que expresó endógenamente TOPK y HLA-A*2402 o HLA-A*0201

Se examinó el clon de CTL para su capacidad para reconocer la célula diana que expresó endógenamente TOPK y HLA-A*2402 o HLA-A*0201. Se cultivó el clon de CTL establecido con líneas celulares diana (5 X 10^4/pocillo) durante dos noches. Después de la incubación, se midió IFN-gamma en los medios de cultivo por ELISA. Se realizó ELISA de IFN-gamma según el procedimiento del fabricante.

Resultados

Expresión de TOPK potenciada en cánceres

Los datos del amplio perfil de expresión génica obtenidos de diversos cánceres usando micromatriz de ADNc revelaron que la expresión de TOPK (Nº de acceso de GenBank NM_018492; por ejemplo, SEQ ID NO: 85) se elevó específicamente en tejidos de cáncer en comparación con tejido normal correspondiente. La expresión de TOPK se elevó de forma válida en 1 de las 15 LMA, 15 de los 18 cánceres de vejiga, 36 de los 40 cánceres de mama, 2 de los 6 cánceres de cuello uterino, 6 de los 6 carcinomas colangiocelulares, 2 de los 6 cánceres colorrectales, 1 de 1 cáncer gástrico de tipo difuso, 5 de los 5 CPCNP, 1 de los 2 linfomas, 7 de los 11 osteosarcomas, 12 de los 19 cánceres de próstata, 3 de los 12 carcinomas renales, 14 de los 14 CPCP y 15 de los 29 tumores de tejido blando (Tabla 1).

[Tabla 1]

Relación de casos de regulación por incremento observados de TOPK en tejidos cancerosos en comparación con tejidos correspondientes normales.

Cáncer/Tumor	**Relación**
LMA	1/15
Cáncer de vejiga	15/18
Cáncer de mama	36/40
Cáncer de cuello uterino	2/6
Carcinoma colangiocelular	6/6
Cáncer colorrectal	2/6
Cáncer gástrico de tipo difuso	1/1
CPCNP	5/5
Linfoma	1/2
Osteosarcoma	7/11
Cáncer de próstata	12/19
Carcinoma renal	3/12
CPCP	14/14
Tumor de tejido blando	15/29

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

La Tabla 2a y 2b muestran la unión a HLA-A24 de péptidos de TOPK 9-meros y 10-meros en el orden de alta afinidad de unión. Se seleccionaron un total de 40 péptidos que tenían posible capacidad de unión a HLA-A24 y se examinaron para determinar los péptidos de epítope.

[Tabla 2a]

Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A24 derivados de TOPK			
Posición inicial	**secuencia de aminoácidos**	**Kd (nM)**	**SEQ ID NO**
289	SYQKVIELF	21	1
230	IFAFGLTLW	363	2
130	RYKASQDPF	451	3
237	LWEMMTLSI	1351	4

Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A24 derivados de TOPK			
Posición inicial	**secuencia de aminoácidos**	**Kd (nM)**	**SEQ ID NO**
155	KYLHQEKKL	1906	5
232	AFGLTLWEM	3946	6
174	VIKGDFETI	4496	7
73	HYRSVYQKR	4663	8
235	LTLWEMMTL	4781	9
19	SVLCSTPTI	6522	10
205	CYIGTEPWK	7254	11
77	VYQKRLMDE	8604	12
270	AYYAALGTR	8621	13
58	HSPWAVKKI	9096	14
81	RLMDEAKIL	12527	15
278	RPPINMEEL	19706	16
183	KICDVGVSL	25266	17
227	KADIFAFGL	25408	18
13	LSEKKKSVL	26380	19
146	VALNMARGL	26693	20
140	AAIILKVAL	28349	21
103	FTEANDGSL	29275	22
105	EANDGSLCL	29821	23
118	GGEKSLNDL	35171	24

[Tabla 2b]

Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A24 derivados de TOPK			
Posición inicial	**secuencia de aminoácidos**	**Kd (nM)**	**SEQ ID NO**
31	ASPFMQKLGF	4764	25
155	KYLHQEKKLL	8099	26
288	ESYQKVIELF	9466	27
289	SYQKVIELFS	9631	28
130	RYKASQDPFP	9917	29
47	YLMKRSPRGL	10978	30
73	HYRSVYQKRL	11919	31
102	AFTEANDGSL	14375	32
39	GFGTGVNVYL	21925	33

Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A24 derivados de TOPK			
Posición inicial	**secuencia de aminoácidos**	**Kd (nM)**	**SEQ ID NO**
4	ISNFKTPSKL	21974	34
77	VYQKRLMDEA	23521	35
241	MTLSIPHINL	27049	36
12	KLSEKKKSVL	28153	37
148	LNMARGLKYL	30397	38
145	KVALNMARGL	32052	39
114	AMEYGGEKSL	32705	40

Posición inicial indica el número de resto de aminoácido desde el extremo N de TOPK. La constante de disociación [Kd(nM)] deriva de "NetMHC 3.0".

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

La Tabla 3a y 3b muestran los péptidos 9-meros y 10-meros que se unen a HLA-A02 de TOPK, respectivamente, en el orden de alta afinidad de unión. Se seleccionaron un total de 44 péptidos con posible capacidad de unión a HLA-A02 y se examinaron para determinar los péptidos de epítope.

[Tabla 3a]

Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A02 derivados de TOPK			
Posición inicial	**secuencia de aminoácidos**	**Kd (nM)**	**SEQ ID NO**
55	GLSHSPWAV	13	41
240	MMTLSIPHI	37	42
34	FMQKLGFGT	76	43
236	TLWEMMTLS	150	44
19	SVLCSTPTI	230	45
134	SQDPFPAAI	238	46
183	KICDVGVSL	415	47
81	RLMDEAKIL	470	48
149	NMARGLKYL	524	49
235	LTLWEMMTL	648	50
12	KLSEKKKSV	775	51
227	KADIFAFGL	1542	52
285	ELDESYQKV	1902	53
47	YLMKRSPRG	2476	54
310	SAAHIVEAL	3199	55
132	KASQDPFPA	3496	56
242	TLSIPHINL	3753	57
156	YLHQEKKLL	4077	58

Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A02 derivados de TOPK			
Posición inicial	**secuencia de aminoácidos**	**Kd (nM)**	**SEQ ID NO**
138	FPAAIILKV	4228	59
142	IILKVALNM	4330	60

[Tabla 3b]

Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A02 derivados de TOPK			
Posición inicial	**secuencia de aminoácidos**	**Kd (nM)**	**SEQ ID NO**
190	SLPLDENMTV	30	61
236	TLWEMMTLSI	32	62
231	FAFGLTLWEM	41	63
47	YLMKRSPRGL	64	64
234	GLTLWEMMTL	74	65
239	EMMTLSIPHI	93	66
290	YQKVIELFSV	101	67
37	KLGFGTGVNV	192	68
20	VLCSTPTINI	290	69
241	MTLSIPHINL	310	70
272	YAALGTRPPI	1347	71
88	ILKSLHHPNI	1656	72
81	RLMDEAKILK	1720	73
313	HIVEALETDV	2345	74
54	RGLSHSPWAV	2364	75
142	IILKVALNMA	2428	76
35	MQKLGFGTGV	2432	77
110	SLCLAMEYGG	3236	78
223	VITDKADIFA	3422	79
274	ALGTRPPINM	3575	80
173	VVIKGDFETI	3955	81
141	AIILKVALNM	4247	82
292	KVIELFSVCT	4637	83
180	ETIKICDVGV	4911	84

Posición inicial indica el número de resto de aminoácido desde el extremo N de TOPK. La constante de disociación [Kd(nM)] deriva de "NetMHC 3.0".

Inducción de CTL con los péptidos predichos de TOPK restringidos con HLA-A*2402

Se generaron CTL para aquellos péptidos derivados de TOPK según los protocolos como se describen en "Materiales y métodos". Se detectó la actividad de CTL específica de péptido por el ensayo de ELISPOT de IFN-gamma (Figura 1). El pocillo número N.º 8 con TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2) (a), N.º 3 con TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (b), N.º 3 con TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6) (c), N.º 2 con TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (d) y N.º 4 con TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (e) demostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica por estimulación con otros péptidos mostrados en la Tabla 2a y 2b, a pesar de que aquellos péptidos tuvieron posible actividad de unión con HLA-A*2402. Como es típico de datos negativos, no se observó producción de IFN-gamma específica de los CTL estimulados con TOPK-A24-9-289 (SEQ ID NO: 1) (f). Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que los 5 péptidos seleccionados derivados de TOPK podrían inducir potentes CTL.

Inducción de CTL con los péptidos predichos de TOPK restringidos con HLA-A*0201

Se detectó la actividad de CTL específica de péptido por ensayo de ELISPOT de IFN-gamma (Figura 2). El pocillo número N.º 7 con TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a), N.º 4 con TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45) (b), N.º 2 con TOPK-A02-9-183 (SEQ ID NO: 47) (c), N.º 8 con TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50) (d), N.º 4 con TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51) (e), N.º 3 con TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53) (f), N.º 3 con TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54) (g), N.º 5 con TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62) (h), N.º 3 con TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63) (i), N.º 8 con TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64) (j), N.º 1 con TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66) (k), N.º 1 con TOPK-A02-10-272 (SEQ ID NO: 71) (1), N.º 4 con TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) (m) y N.º 4 con TOPK-A02-10-142 (SEQ ID NO: 76) (n) demostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica por estimulación con otros péptidos mostrados en la Tabla 3a y 3b, a pesar de que aquellos péptidos tuvieron posible actividad de unión con HLA-A*0201. Como es típico de datos negativos, no se observó producción de IFN-gamma específica de los CTL estimulados con TOPK-A02-9-55 (SEQ ID NO: 41) (o). Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que los 14 péptidos seleccionados derivados de TOPK podrían inducir potentes CTL.

Establecimiento de la línea y clon de CTL contra péptido derivado de TOPK

Se expandieron las células en el pocillo número N.º 8 con TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2) (a), N.º 3 con TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (b), N.º 3 con TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6) (c), N.º 2 con TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (d) y N.º 4 con TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (e) que mostraron actividad de CTL específica de péptido por el ensayo de ELISPOT de IFN-gamma y se establecieron las líneas de CTL. Se midieron las actividades de CTL de estas líneas de CTL por ELISA de IFN-gamma (Figura 3). Las líneas de CTL demostraron potente producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido correspondiente en comparación con células diana sin pulso de péptido. Además, se establecieron los clones de CTL por dilución limitante de las líneas de CTL como se describe en "Materiales y métodos", y se midió la producción de IFN-gamma de los clones de CTL contra células TISI pulsadas con péptido correspondiente por ELISA de IFN-gamma. Se observó la potente producción de IFN-gamma de los clones de CTL estimulados con TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3) (a), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27) (b) y TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) (c) (Figura 4).

Se expandieron las células en el pocillo número N.º 7 con TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a), N.º 4 con TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45) (b), N.º 8 con TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50) (c), N.º 4 con TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51) (d), N.º 3 con TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53) (e), N.º 3 con TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54) (f), N.º 5 con TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62) (g), N.º 3 con TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63) (h), N.º 8 con TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64) (i), N.º 1 con TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66) (j) y N.º 4 con TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) (k) que mostraron actividad de CTL específica de péptido por el ensayo de ELISPOT de IFN-gamma y se establecieron las líneas de CTL. Se midieron las actividades de CTL de estas líneas de CTL por ELISA de IFN-gamma (Figura 5). Las líneas de CTL demostraron potente producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido correspondiente en comparación con células diana sin pulso de péptido. Además, se establecieron los clones de CTL por dilución limitante de las líneas de CTL como se describe en "Materiales y métodos", y se midió la producción de IFN-gamma de los clones de CTL contra células T2 pulsadas con péptido correspondiente por ELISA de IFN-gamma. Se observó la potente producción de IFN-gamma de los clones de CTL estimulados con TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) (a) y TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53) (b) (Figura 6).

Actividad de CTL específica frente a células diana que expresan TOPK y HLA-A*2402 o HLA-A*0201

Se examinó el clon de CTL establecido producido contra el péptido TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) para la capacidad para reconocer células diana que expresan la molécula de TOPK y HLA-A*2402. Se prepararon células COS7 transfectadas con tanto la longitud completa del gen TOPK como HLA-A*2402 (un modelo específico para las células diana que expresan el gen TOPK y HLA-A*2402) como células estimuladoras, y se usaron células COS7 transfectadas con cualquier longitud completa de TOPK o HLA-A*2402 como controles. En la Figura 7, el clon de CTL estimulado con TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) mostró potente actividad de CTL contra células COS7 que expresaron tanto TOPK como HLA-A* 2402. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica significativa contra los controles. Así, estos datos demuestran claramente que el péptido TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28) se procesa endógenamente y se expresa en las células diana con la molécula HLA-A*2402 y es reconocido por los CTL. Se examinó la línea de CTL establecida producida contra el péptido TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) para la

capacidad para reconocer células diana que expresan la molécula de TOPK y HLA-A*0201. Se prepararon células COS7 transfectadas con tanto la longitud completa del gen TOPK como HLA-A*0201 (un modelo específico para las células diana que expresan el gen TOPK y HLA-A*0201) como células estimuladoras, y se usaron células COS7 transfectadas con cualquier longitud completa de TOPK o HLA-A*0201 como controles. En la Figura 8, la línea de CTL estimulada con TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) mostró potente actividad de CTL contra células COS7 que expresan tanto TOPK como HLA-A*0201. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica significativa contra los controles. Así, estos datos demuestran claramente que el péptido TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42) es endógenamente procesado y expresado en las células diana con la molécula de HLA-A*0201 y es reconocido por los CTL. Estos resultados indican que estos péptidos derivados de TOPK pueden estar disponibles para aplicar las vacunas para el cáncer para pacientes con tumores que expresan TOPK.

Análisis de homología de péptidos de antígeno

Los CTL estimulados con TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2), TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3), TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27), TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28), TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42), TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45), TOPK-A02-9-183 (SEQ ID NO: 47), TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50), TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51), TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53), TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54), TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62), TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63), TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64), TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66), TOPK-A02-10-272 (SEQ ID NO: 71), TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) o TOPK-A02-10-142 (SEQ ID NO: 76) mostraron actividad de CTL significativa y específica. Este resultado puede ser debido al hecho de que estas secuencias son homólogas a péptido derivado de otras moléculas que son conocidas por sensibilizar al sistema inmunitario humano. Para excluir esta posibilidad, se realizaron análisis de homología para estas secuencias de péptidos usando como búsquedas el algoritmo de BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) que no reveló ninguna secuencia con homología significativa. Los resultados de los análisis de homología indican que la secuencia de TOPK-A24-9-230 (SEQ ID NO: 2), TOPK-A24-9-130 (SEQ ID NO: 3), TOPK-A24-9-232 (SEQ ID NO: 6), TOPK-A24-10-288 (SEQ ID NO: 27), TOPK-A24-10-289 (SEQ ID NO: 28), TOPK-A02-9-240 (SEQ ID NO: 42), TOPK-A02-9-19 (SEQ ID NO: 45), TOPK-A02-9-183 (SEQ ID NO: 47), TOPK-A02-9-235 (SEQ ID NO: 50), TOPK-A02-9-12 (SEQ ID NO: 51), TOPK-A02-9-285 (SEQ ID NO: 53), TOPK-A02-9-47 (SEQ ID NO: 54), TOPK-A02-10-236 (SEQ ID NO: 62), TOPK-A02-10-231 (SEQ ID NO: 63), TOPK-A02-10-47 (SEQ ID NO: 64), TOPK-A02-10-239 (SEQ ID NO: 66), TOPK-A02-10-272 (SEQ ID NO: 71), TOPK-A02-10-88 (SEQ ID NO: 72) y TOPK-A02-10-142 (SEQ ID NO: 76) son únicas y así, hay poca posibilidad, a nuestro leal conocimiento, de que estas moléculas produzcan respuesta inmunológica involuntaria a alguna molécula sin relacionar. En conclusión, los novedosos péptidos de epítope HLA-A24 o HLA-A02 derivados de TOPK identificados en el presente documento pueden encontrar utilidad en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona nuevos TAA, particularmente aquellos derivados de TOPK, que pueden inducir respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas y así tener aplicabilidad a una amplia variedad de tipos de cáncer. Tales TAA pueden encontrar uso como vacunas de péptido frente a enfermedades asociadas a TOPK, por ejemplo, cáncer, más particularmente, leucemia mieloide aguda (LMA), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y tumor de tejido blando.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDOS TOPK Y VACUNAS QUE LOS INCLUYEN

<130> P81401503EP01

<150>US 61/552.817

<151> 28-10-2011

<160> 90

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 1

Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 2

Ile Phe Ala Phe Gly Leu Thr Leu Trp
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 3

Arg Tyr Lys Ala Ser Gln Asp Pro Phe
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 4

Leu Trp Glu Met Met Thr Leu Ser Ile
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 5

Lys Tyr Leu His Gln Glu Lys Lys Leu
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 6

Ala Phe Gly Leu Thr Leu Trp Glu Met
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 7

Val Ile Lys Gly Asp Phe Glu Thr Ile
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 8

His Tyr Arg Ser Val Tyr Gln Lys Arg
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 9

Leu Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 10

Ser Val Leu Cys Ser Thr Pro Thr Ile
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 11

Cys Tyr Ile Gly Thr Glu Pro Trp Lys
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 12

Val Tyr Gln Lys Arg Leu Met Asp Glu
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 13

Ala Tyr Tyr Ala Ala Leu Gly Thr Arg
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 14

His Ser Pro Trp Ala Val Lys Lys Ile
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 15

Arg Leu Met Asp Glu Ala Lys Ile Leu
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 16

Arg Pro Pro Ile Asn Met Glu Glu Leu
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 17

Lys Ile Cys Asp Val Gly Val Ser Leu
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 18

Lys Ala Asp Ile Phe Ala Phe Gly Leu
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 19

Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Val Leu
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 20

Val Ala Leu Asn Met Ala Arg Gly Leu
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 21

Ala Ala Ile Ile Leu Lys Val Ala Leu
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 22

Phe Thr Glu Ala Asn Asp Gly Ser Leu
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 23

```
Glu Ala Asn Asp Gly Ser Leu Cys Leu
1               5
```

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 24

```
Gly Gly Glu Lys Ser Leu Asn Asp Leu
1               5
```

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 25

```
Ala Ser Pro Phe Met Gln Lys Leu Gly Phe
1               5                   10
```

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 26

```
Lys Tyr Leu His Gln Glu Lys Lys Leu Leu
1               5                   10
```

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 27

Glu Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 28

Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe Ser
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 29

Arg Tyr Lys Ala Ser Gln Asp Pro Phe Pro
1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 30

Tyr Leu Met Lys Arg Ser Pro Arg Gly Leu
1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 31

His Tyr Arg Ser Val Tyr Gln Lys Arg Leu
1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 32

Ala Phe Thr Glu Ala Asn Asp Gly Ser Leu
1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 33

Gly Phe Gly Thr Gly Val Asn Val Tyr Leu
1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 34

Ile Ser Asn Phe Lys Thr Pro Ser Lys Leu
1 5 10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 35

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

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 36

```
Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile Asn Leu
1               5                   10
```

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 37

```
Lys Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Val Leu
1               5                   10
```

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 38

```
Leu Asn Met Ala Arg Gly Leu Lys Tyr Leu
1               5                   10
```

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 39

```
Lys Val Ala Leu Asn Met Ala Arg Gly Leu
1               5                   10
```

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 40

Ala Met Glu Tyr Gly Gly Glu Lys Ser Leu
1 5 10

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 41

Gly Leu Ser His Ser Pro Trp Ala Val
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 42

Met Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 43

Phe Met Gln Lys Leu Gly Phe Gly Thr
1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 44

Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu Ser
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 45

Ser Val Leu Cys Ser Thr Pro Thr Ile
1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 46

Ser Gln Asp Pro Phe Pro Ala Ala Ile
1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 47

Lys Ile Cys Asp Val Gly Val Ser Leu
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 48

Arg Leu Met Asp Glu Ala Lys Ile Leu
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 49

Asn Met Ala Arg Gly Leu Lys Tyr Leu
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 50

Leu Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 51

Lys Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Val
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 52

Lys Ala Asp Ile Phe Ala Phe Gly Leu
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 53

Glu Leu Asp Glu Ser Tyr Gln Lys Val
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 54

Tyr Leu Met Lys Arg Ser Pro Arg Gly
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 55

Ser Ala Ala His Ile Val Glu Ala Leu
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 56

Lys Ala Ser Gln Asp Pro Phe Pro Ala
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 57

Thr Leu Ser Ile Pro His Ile Asn Leu
1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 58

Tyr Leu His Gln Glu Lys Lys Leu Leu
1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 59

Phe Pro Ala Ala Ile Ile Leu Lys Val
1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 60

Ile Ile Leu Lys Val Ala Leu Asn Met
1 5

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 61

Ser Leu Pro Leu Asp Glu Asn Met Thr Val
1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 62

Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu Ser Ile
1 5 10

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 63

Phe Ala Phe Gly Leu Thr Leu Trp Glu Met
1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 64

Tyr Leu Met Lys Arg Ser Pro Arg Gly Leu
1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 65

Gly Leu Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu
1 5 10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 66

Glu Met Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile
1 5 10

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 67

Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe Ser Val
1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 68

Lys Leu Gly Phe Gly Thr Gly Val Asn Val
1 5 10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 69

Val Leu Cys Ser Thr Pro Thr Ile Asn Ile
1 5 10

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 70

Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile Asn Leu
1 5 10

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 71

Tyr Ala Ala Leu Gly Thr Arg Pro Pro Ile
1 5 10

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 72

Ile Leu Lys Ser Leu His His Pro Asn Ile
1 5 10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 73

Arg Leu Met Asp Glu Ala Lys Ile Leu Lys
1 5 10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 74

His Ile Val Glu Ala Leu Glu Thr Asp Val
1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 75

Arg Gly Leu Ser His Ser Pro Trp Ala Val
1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 76

Ile Ile Leu Lys Val Ala Leu Asn Met Ala
1 5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 77

Met Gln Lys Leu Gly Phe Gly Thr Gly Val
1 5 10

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 78

Ser Leu Cys Leu Ala Met Glu Tyr Gly Gly
1 5 10

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 79

Val Ile Thr Asp Lys Ala Asp Ile Phe Ala
1 5 10

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 80

Ala Leu Gly Thr Arg Pro Pro Ile Asn Met
1 5 10

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 81

Val Val Ile Lys Gly Asp Phe Glu Thr Ile
1 5 10

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 82

Ala Ile Ile Leu Lys Val Ala Leu Asn Met
1 5 10

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 83

Lys Val Ile Glu Leu Phe Ser Val Cys Thr
1 5 10

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de TOPK

<400> 84

Glu Thr Ile Lys Ile Cys Asp Val Gly Val
1 5 10

<210> 85

<211> 1899

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (202)..(1170)

<400> 85

```
agcgcgcgac tttttgaaag ccaggagggt tcgaattgca acggcagctg ccgggcgtat      60

gtgttggtgc tagaggcagc tgcagggtct cgctgggggc cgctcgggac caattttgaa     120

gaggtacttg gccacgactt attttcacct ccgacctttc cttccaggcg gtgagactct     180

ggactgagag tggctttcac a atg gaa ggg atc agt aat ttc aag aca cca       231
                        Met Glu Gly Ile Ser Asn Phe Lys Thr Pro
                        1               5                   10

agc aaa tta tca gaa aaa aag aaa tct gta tta tgt tca act cca act       279
Ser Lys Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Val Leu Cys Ser Thr Pro Thr
                15                  20                  25

ata aat atc ccg gcc tct ccg ttt atg cag aag ctt ggc ttt ggt act       327
Ile Asn Ile Pro Ala Ser Pro Phe Met Gln Lys Leu Gly Phe Gly Thr
            30                  35                  40

ggg gta aat gtg tac cta atg aaa aga tct cca aga ggt ttg tct cat       375
Gly Val Asn Val Tyr Leu Met Lys Arg Ser Pro Arg Gly Leu Ser His
        45                  50                  55

tct cct tgg gct gta aaa aag att aat cct ata tgt aat gat cat tat       423
Ser Pro Trp Ala Val Lys Lys Ile Asn Pro Ile Cys Asn Asp His Tyr
    60                  65                  70

cga agt gtg tat caa aag aga cta atg gat gaa gct aag att ttg aaa       471
Arg Ser Val Tyr Gln Lys Arg Leu Met Asp Glu Ala Lys Ile Leu Lys
75                  80                  85                  90

agc ctt cat cat cca aac att gtt ggt tat cgt gct ttt act gaa gcc       519
Ser Leu His His Pro Asn Ile Val Gly Tyr Arg Ala Phe Thr Glu Ala
                95                  100                 105

aat gat ggc agt ctg tgt ctt gct atg gaa tat gga ggt gaa aag tct       567
Asn Asp Gly Ser Leu Cys Leu Ala Met Glu Tyr Gly Gly Glu Lys Ser
            110                 115                 120

cta aat gac tta ata gaa gaa cga tat aaa gcc agc caa gat cct ttt       615
Leu Asn Asp Leu Ile Glu Glu Arg Tyr Lys Ala Ser Gln Asp Pro Phe
        125                 130                 135

cca gca gcc ata att tta aaa gtt gct ttg aat atg gca aga ggg tta       663
Pro Ala Ala Ile Ile Leu Lys Val Ala Leu Asn Met Ala Arg Gly Leu
    140                 145                 150

aag tat ctg cac caa gaa aag aaa ctg ctt cat gga gac ata aag tct       711
Lys Tyr Leu His Gln Glu Lys Lys Leu Leu His Gly Asp Ile Lys Ser
155                 160                 165                 170

tca aat gtt gta att aaa ggc gat ttt gaa aca att aaa atc tgt gat       759
Ser Asn Val Val Ile Lys Gly Asp Phe Glu Thr Ile Lys Ile Cys Asp
                175                 180                 185

gta gga gtc tct cta cca ctg gat gaa aat atg act gtg act gac cct       807
Val Gly Val Ser Leu Pro Leu Asp Glu Asn Met Thr Val Thr Asp Pro
            190                 195                 200
```

```
gag gct tgt tac att ggc aca gag cca tgg aaa ccc aaa gaa gct gtg        855
Glu Ala Cys Tyr Ile Gly Thr Glu Pro Trp Lys Pro Lys Glu Ala Val
        205                 210                 215

gag gag aat ggt gtt att act gac aag gca gac ata ttt gcc ttt ggc        903
Glu Glu Asn Gly Val Ile Thr Asp Lys Ala Asp Ile Phe Ala Phe Gly
    220                 225                 230

ctt act ttg tgg gaa atg atg act tta tcg att cca cac att aat ctt        951
Leu Thr Leu Trp Glu Met Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile Asn Leu
235                 240                 245                 250

tca aat gat gat gat gat gaa gat aaa act ttt gat gaa agt gat ttt        999
Ser Asn Asp Asp Asp Asp Glu Asp Lys Thr Phe Asp Glu Ser Asp Phe
                255                 260                 265

gat gat gaa gca tac tat gca gcg ttg gga act agg cca cct att aat       1047
Asp Asp Glu Ala Tyr Tyr Ala Ala Leu Gly Thr Arg Pro Pro Ile Asn
            270                 275                 280

atg gaa gaa ctg gat gaa tca tac cag aaa gta att gaa ctc ttc tct       1095
Met Glu Glu Leu Asp Glu Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe Ser
        285                 290                 295

gta tgc act aat gaa gac cct aaa gat cgt cct tct gct gca cac att       1143
Val Cys Thr Asn Glu Asp Pro Lys Asp Arg Pro Ser Ala Ala His Ile
    300                 305                 310

gtt gaa gct ctg gaa aca gat gtc tag tgatcatctc agctgaagtg             1190
Val Glu Ala Leu Glu Thr Asp Val
315                 320

tggcttgcgt aaataactgt ttattccaaa atatttacat agttactatc agtagttatt     1250

agactctaaa attggcatat ttgaggacca tagtttcttg ttaacatatg gataactatt     1310

tctaatatga aatatgctta tattggctat aagcacttgg aattgtactg ggttttctgt     1370

aaagttttag aaactagcta cataagtact ttgatactgc tcatgctgac ttaaaacact     1430

agcagtaaaa cgctgtaaac tgtaacatta aattgaatga ccattacttt tattaatgat     1490

ctttcttaaa tattctatat tttaatggat ctactgacat tagcactttg tacagtacaa     1550

aataaagtct acatttgttt aaaacactga accttttgct gatgtgttta tcaaatgata     1610

actggaagct gaggagaata tgcctcaaaa agagtagctc cttggatact tcagactctg     1670

gttacagatt gtcttgatct cttggatctc ctcagatctt tggtttttgc tttaatttat     1730

taaatgtatt ttccatactg agtttaaaat ttattaattt gtaccttaag catttcccag     1790

ctgtgtaaaa acaataaaac tcaaatagga tgataaagaa taaaggacac tttgggtacc     1850

agaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa                 1899
```

<210> 86

<211> 322

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Met Glu Gly Ile Ser Asn Phe Lys Thr Pro Ser Lys Leu Ser Glu Lys
1 5 10 15

Lys Lys Ser Val Leu Cys Ser Thr Pro Thr Ile Asn Ile Pro Ala Ser
20 25 30

Pro Phe Met Gln Lys Leu Gly Phe Gly Thr Gly Val Asn Val Tyr Leu
35 40 45

Met Lys Arg Ser Pro Arg Gly Leu Ser His Ser Pro Trp Ala Val Lys
50 55 60

Lys Ile Asn Pro Ile Cys Asn Asp His Tyr Arg Ser Val Tyr Gln Lys
65 70 75 80

Arg Leu Met Asp Glu Ala Lys Ile Leu Lys Ser Leu His His Pro Asn
85 90 95

Ile Val Gly Tyr Arg Ala Phe Thr Glu Ala Asn Asp Gly Ser Leu Cys
100 105 110

Leu Ala Met Glu Tyr Gly Gly Glu Lys Ser Leu Asn Asp Leu Ile Glu
115 120 125

Glu Arg Tyr Lys Ala Ser Gln Asp Pro Phe Pro Ala Ala Ile Ile Leu
130 135 140

Lys Val Ala Leu Asn Met Ala Arg Gly Leu Lys Tyr Leu His Gln Glu
145 150 155 160

Lys Lys Leu Leu His Gly Asp Ile Lys Ser Ser Asn Val Val Ile Lys
165 170 175

Gly Asp Phe Glu Thr Ile Lys Ile Cys Asp Val Gly Val Ser Leu Pro
180 185 190

Leu Asp Glu Asn Met Thr Val Thr Asp Pro Glu Ala Cys Tyr Ile Gly
195 200 205

Thr Glu Pro Trp Lys Pro Lys Glu Ala Val Glu Glu Asn Gly Val Ile
210 215 220

Thr Asp Lys Ala Asp Ile Phe Ala Phe Gly Leu Thr Leu Trp Glu Met
225 230 235 240

Met Thr Leu Ser Ile Pro His Ile Asn Leu Ser Asn Asp Asp Asp Asp
245 250 255

Glu Asp Lys Thr Phe Asp Glu Ser Asp Phe Asp Asp Glu Ala Tyr Tyr
260 265 270

Ala Ala Leu Gly Thr Arg Pro Pro Ile Asn Met Glu Glu Leu Asp Glu
275 280 285

Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe Ser Val Cys Thr Asn Glu Asp
290 295 300

Pro Lys Asp Arg Pro Ser Ala Ala His Ile Val Glu Ala Leu Glu Thr
305 310 315 320

Asp Val

<210> 87

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un cebador de PCR para el análisis de TCR

<400> 87

gtctaccagg cattcgcttc at 22

<210> 88

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un cebador de PCR para el análisis de TCR

<400> 88

tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 89

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un cebador de PCR para el análisis de TCR

<400> 89

tcagaaatcc tttctcttga c 21

<210> 90

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un cebador de PCR para el análisis de TCR

<400> 90

ctagcctctg gaatcctttc tctt 24

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en (a) y (b) a continuación:

(a) un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, 2, 3, 6 y 27, y

(b) un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, 2, 3, 6 y 27, en la que 1 o 2 aminoácido(s) están sustituidos, insertados y/o añadidos, en la que el péptido tiene inducibilidad de CTL.

2. El péptido aislado de la reivindicación 1, en la que el péptido tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, 2, 3, 6 y 27 está sustituido para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, mentionina y triptófano, y

(b) el aminoácido del extremo C de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, 2, 3, 6 y 27 está sustituido para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano y metionina.

3. El péptido aislado de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho péptido es un nonapéptido o un decapéptido.

4. El péptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, 2, 3, 6 y 27.

5. Un polinucleótido aislado que codifica el péptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Una composición para inducir un CTL, en la que la composición comprende uno o más péptido(s) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o uno o más polinucleótido(s) de la reivindicación 5.

7. Una composición farmacéutica que comprende:

(a) uno o más péptido(s) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,

(b) uno o más polinucleótido(s) de la reivindicación 5.

(c) una o más APC que presentan un complejo del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un antígeno HLA sobre su superficie;

(d) uno o más exosoma(s) que presentan un complejo del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un antígeno HLA sobre su superficie; o

(e) uno o más CTL que pueden reconocer una célula que presenta un complejo del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un antígeno HLA sobre su superficie,

en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en la que la composición farmacéutica se formula para el tratamiento y/o la profilaxis de cáncer, la prevención de una reaparición posoperatoria del mismo y/o la inducción de una respuesta inmunitaria contra el cáncer.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que dicha composición farmacéutica se formula para administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24.

9. Un método *in vitro* de inducción de una célula presentadora de antígenos (APC) con inducibilidad de CTL, comprendiendo dicho método la etapa seleccionada del grupo que consiste en:

(a) poner en contacto una APC con el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 *in vitro*, y

(b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una APC.

10. Un método *in vitro* de inducción de un CTL, comprendiendo dicho método una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

(a) co-cultivar un linfocito T CD8-positivo con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,

(b) co-cultivar un linfocito T CD8-positivo con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y

(c) introducir en un linfocito T CD8-positivo un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos de subunidad del receptor de linfocitos T (TCR), en el que el TCR formado por dichos polipéptidos de subunidad de TCR es capaz de unirse a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 sobre una superficie celular.

11. Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

12. La APC de la reivindicación 11, que se induce por el método de la reivindicación 9.

13. Un CTL aislado que elige como diana el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

14. El CTL de la reivindicación 13, que se induce por el método de la reivindicación 10.

15. Una composición para su uso en inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto en necesidad de la misma, en la que la composición comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un polinucleótido que codifica el péptido.

16. Un anticuerpo contra el péptido de una cualquiera de las reivindicaciónes 1 a 4.

17. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

18. Una célula hospedadora transformada o transfectada con el vector de la reivindicación 17.

19. Un kit de diagnóstico que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el polinucleótido de la reivindicación 5 o el anticuerpo de la reivindicación 16.

20. Un método de cribado de un péptido que tiene una capacidad para inducir un CTL que tiene actividad citotóxica específica contra una célula que presenta un fragmento derivado de TOPK, en el que el método comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia candidata que consiste en una secuencia de aminoácidos modificada sustituyendo, insertando y/o añadiendo uno o dos restos de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos original, en el que la secuencia de aminoácidos original está seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, 2, 3, 6 y 27;

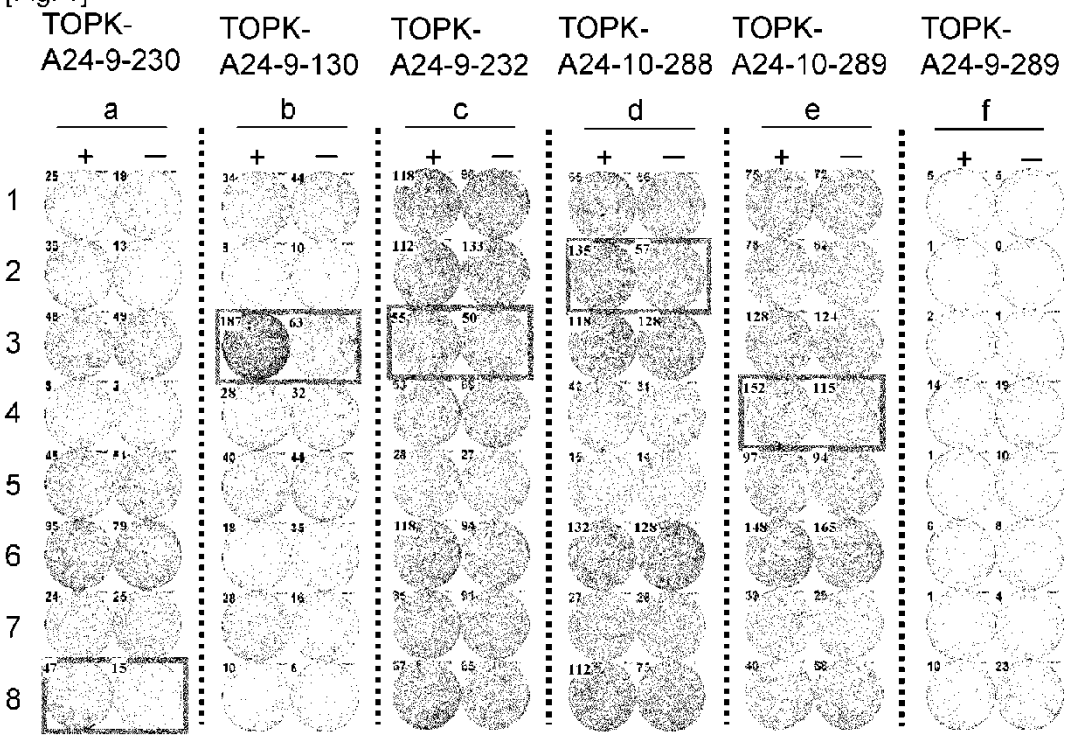
(ii) seleccionar una secuencia candidata que no tiene homología significativa sustancial con los péptidos derivados de cualquier producto génico humano conocido distinto de TOPK;

(iii) poner en contacto un péptido que consiste en la secuencia candidata seleccionada en la etapa (ii) con una célula presentadora de antígenos;

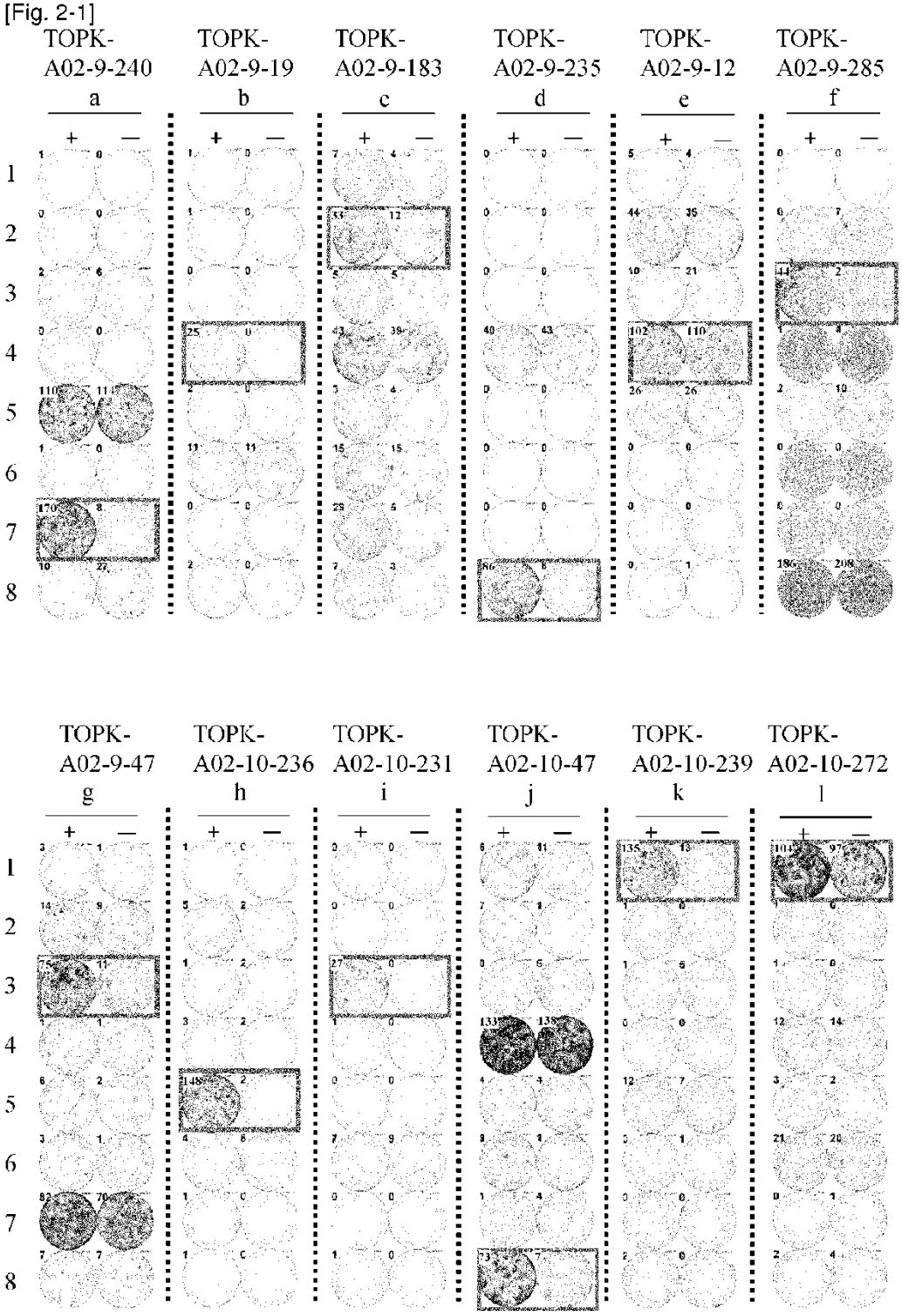
(iv) poner en contacto la célula presentadora de antígenos de la etapa (iii) con un linfocito T CD8 positivo; y

(v) identificar el péptido cuya inducibilidad de CTL es la misma a o superior a la de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos original.

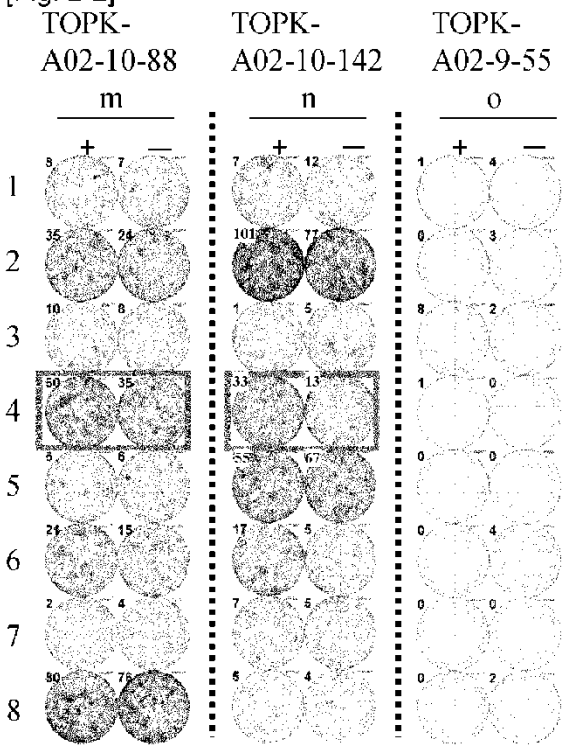
[Fig. 1]


TOPK-A24-9-230
TOPK-A24-9-130
TOPK-A24-9-232
TOPK-A24-10-288
TOPK-A24-10-289
TOPK-A24-9-289
a
b
c
d
e
f
+
−
1
2
3
4
5
6
7
8

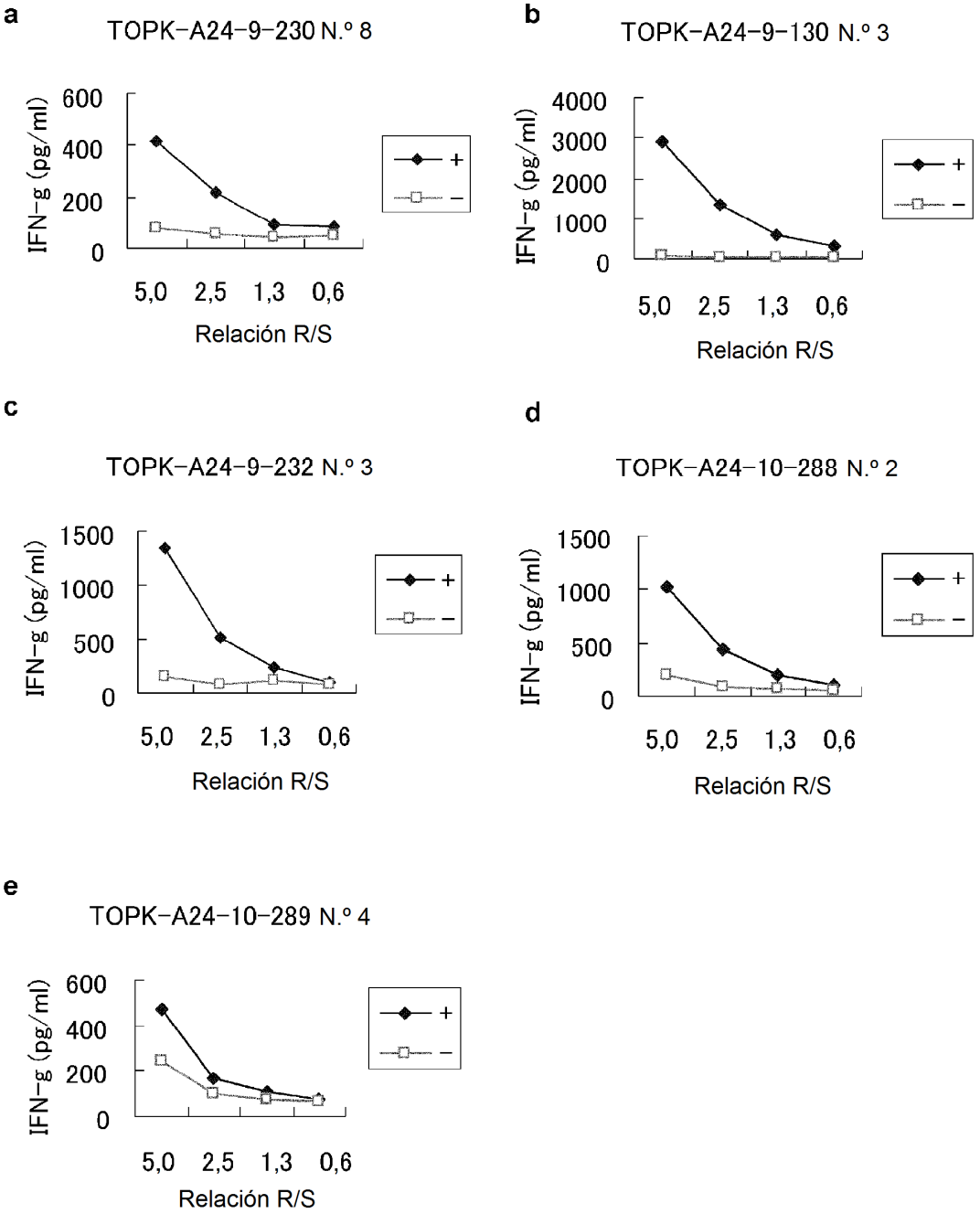
[Fig. 2-1]


TOPK-A02-9-240
a
TOPK-A02-9-19
b
TOPK-A02-9-183
c
TOPK-A02-9-235
d
TOPK-A02-9-12
e
TOPK-A02-9-285
f
TOPK-A02-9-47
g
TOPK-A02-10-236
h
TOPK-A02-10-231
i
TOPK-A02-10-47
j
TOPK-A02-10-239
k
TOPK-A02-10-272
l
+
—
1
2
3
4
5
6
7
8

[Fig. 2-2]

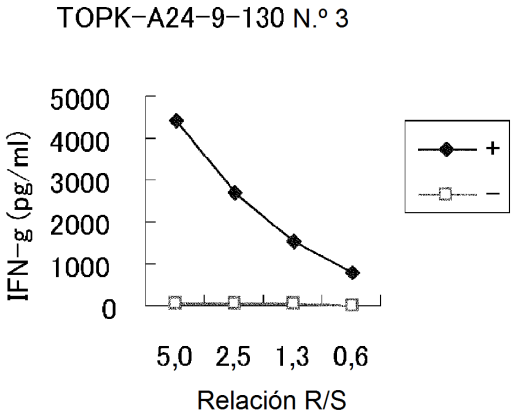


[Fig. 3]

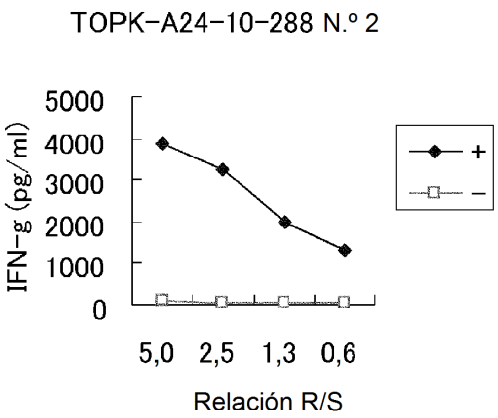

a
TOPK-A24-9-230 N.º 8
IFN-g (pg/ml)
600
400
200
0
5,0 2,5 1,3 0,6
Relación R/S
+
−
b
TOPK-A24-9-130 N.º 3
IFN-g (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
5,0 2,5 1,3 0,6
Relación R/S
+
−
c
TOPK-A24-9-232 N.º 3
IFN-g (pg/ml)
1500
1000
500
0
5,0 2,5 1,3 0,6
Relación R/S
+
−
d
TOPK-A24-10-288 N.º 2
IFN-g (pg/ml)
1500
1000
500
0
5,0 2,5 1,3 0,6
Relación R/S
+
−
e
TOPK-A24-10-289 N.º 4
IFN-g (pg/ml)
600
400
200
0
5,0 2,5 1,3 0,6
Relación R/S
+
−

[Fig. 4]

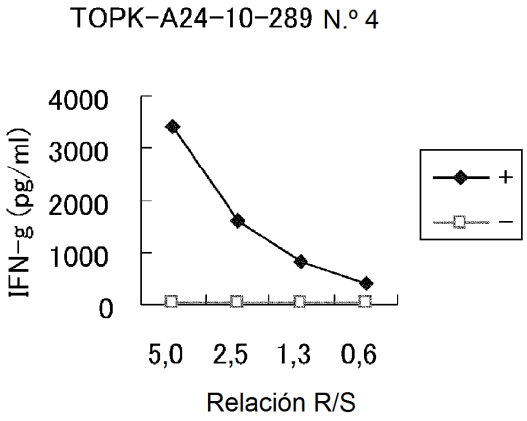
a


TOPK-A24-9-130 N.º 3
IFN-g (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
5,0
2,5
1,3
0,6
Relación R/S
+
–

b

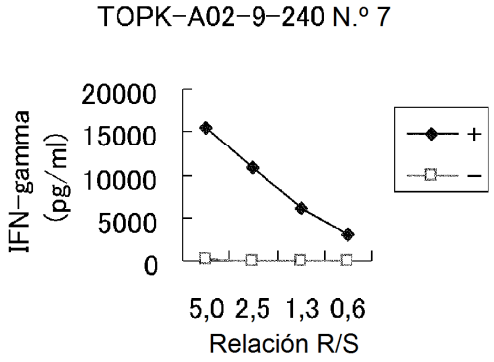

TOPK-A24-10-288 N.º 2
IFN-g (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
5,0
2,5
1,3
0,6
Relación R/S
+
–

c

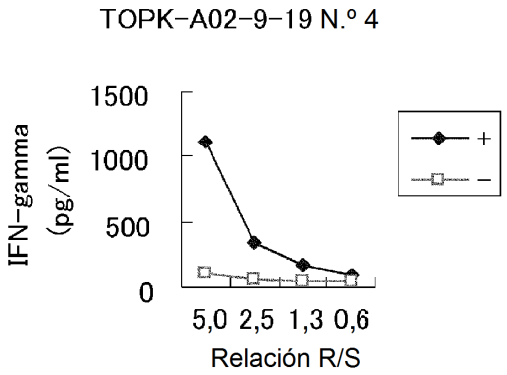

TOPK-A24-10-289 N.º 4
IFN-g (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
5,0
2,5
1,3
0,6
Relación R/S
+
–

[Fig. 5-1]

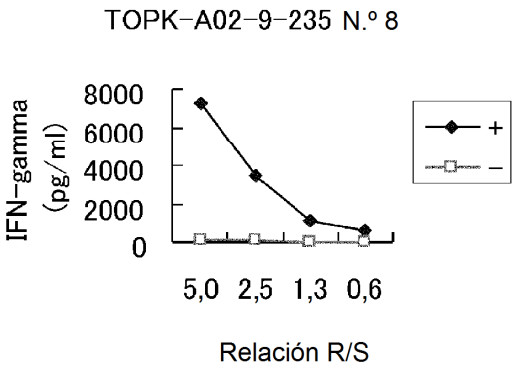
a



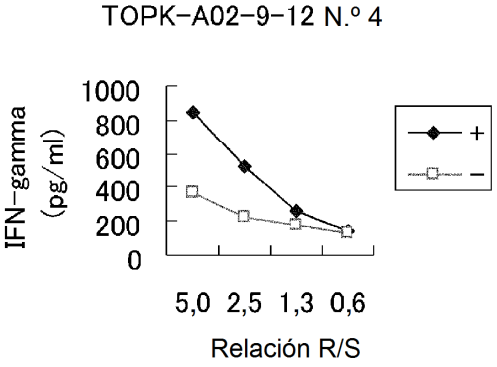
b



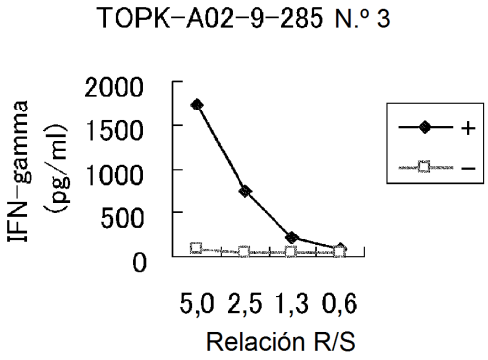
c



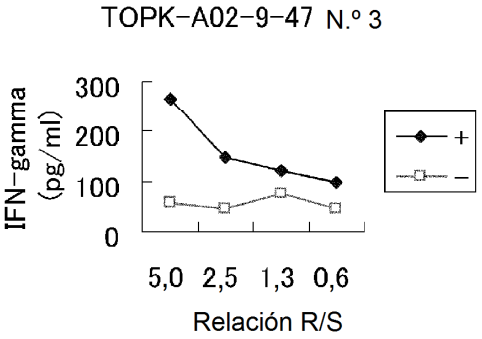
d



e

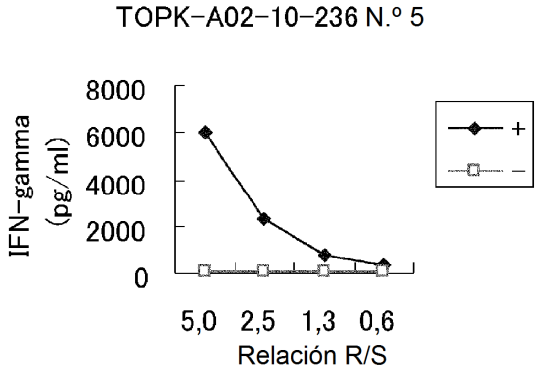


f

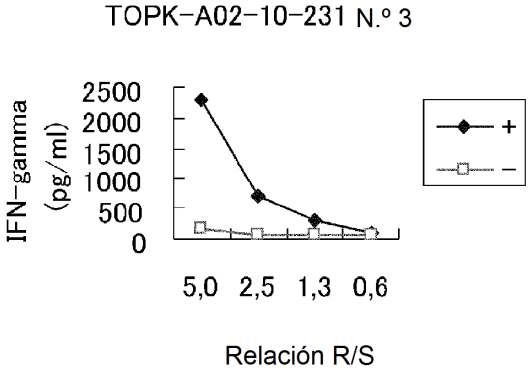


[Fig. 5-2]

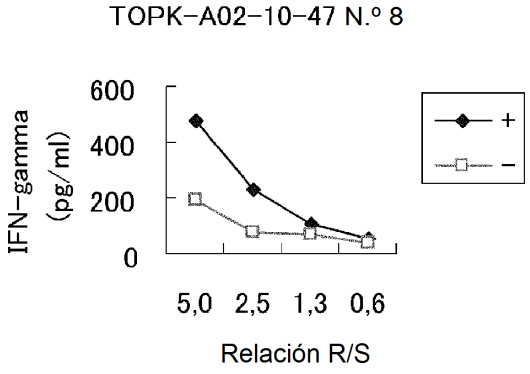
g


TOPK-A02-10-236 N.º 5
IFN-gamma (pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
5,0 2,5 1,3 0,6
Relación R/S
+
–

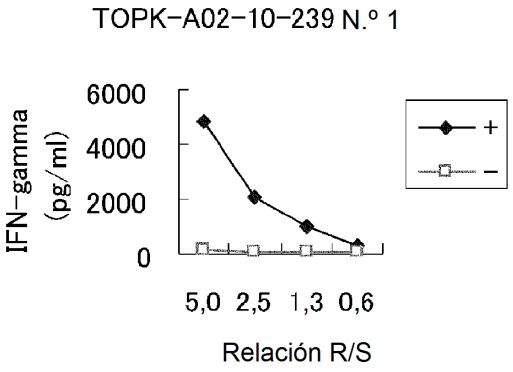
h


TOPK-A02-10-231 N.º 3
IFN-gamma (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
5,0 2,5 1,3 0,6
Relación R/S
+
–

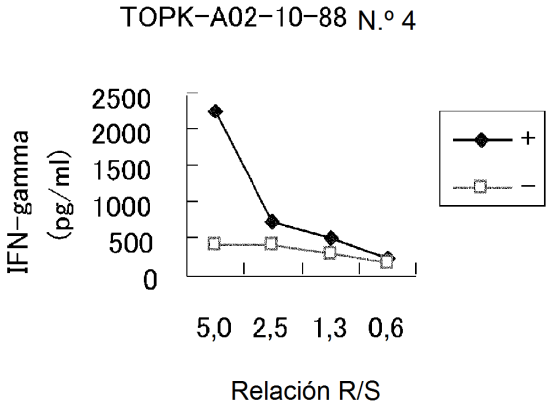
i


TOPK-A02-10-47 N.º 8
IFN-gamma (pg/ml)
600
400
200
0
5,0 2,5 1,3 0,6
Relación R/S
+
–

j

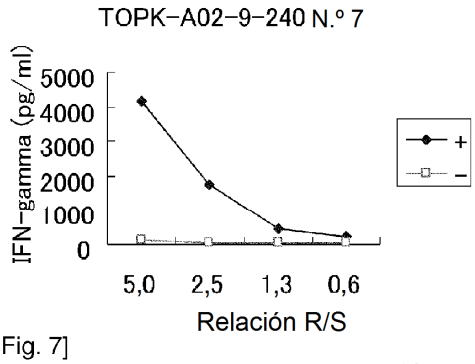

TOPK-A02-10-239 N.º 1
IFN-gamma (pg/ml)
6000
4000
2000
0
5,0 2,5 1,3 0,6
Relación R/S
+
–

k

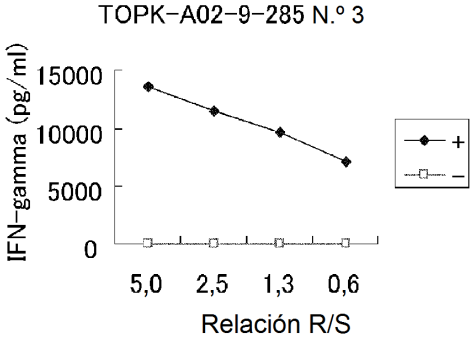

TOPK-A02-10-88 N.º 4
IFN-gamma (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
5,0 2,5 1,3 0,6
Relación R/S
+
–

[Fig. 6]

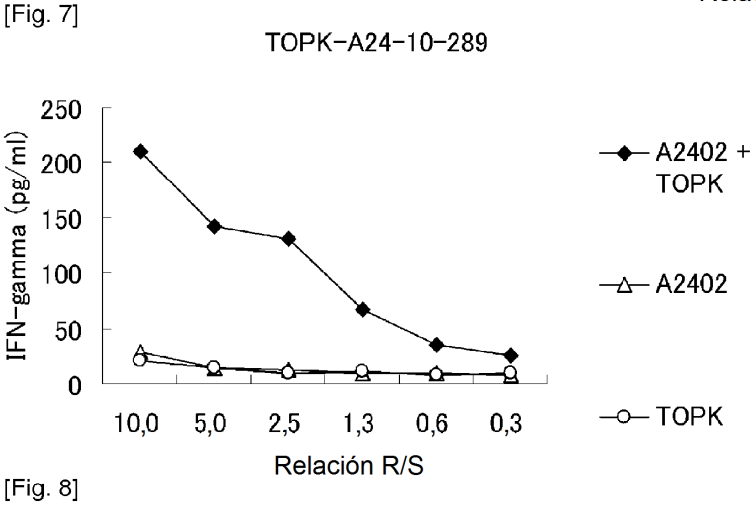
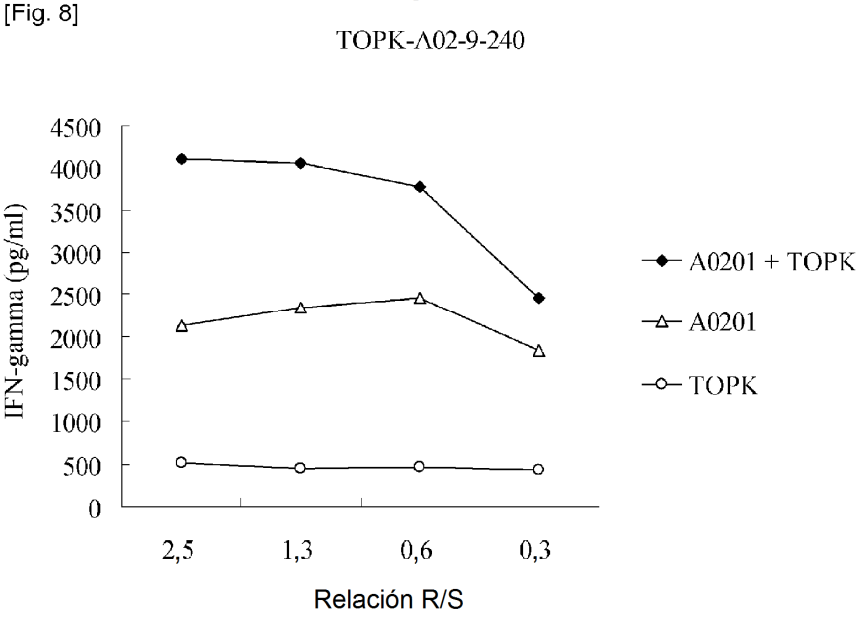
a



b



[Fig. 7]



[Fig. 8]