

No. 13-155530- -00000-0000

Fecha: 2013-07-02 15:07:40
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 164

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: PÉPTIDOS TOMM34 Y VACUNAS QUE LOS INCLUYEN

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL: C12N 15/00

71. SOLICITANTE: ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

DOMICILIO: Kanagawa, Japón.

74. APODERADO SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

 Industria y Comercio SÚPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-155530- -00000-0000 Fecha: 2013-07-02 15:07:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR. Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 164
--	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No. PCT/JP2011/006551 Fecha 25 de Noviembre de 2011			
Publicación Internacional No. WO 2012/073459 A1 Fecha 07 de Junio de 2012			
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
PÉPTIDOS TOMM34 Y VACUNAS QUE LOS INCLUYEN			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C12N 15/00		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBR	IDENTIFICACIÓN
ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.		E	
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, No. TELÉFONO:			
CIUDAD: Kanagawa 2130012, CORREO ELECTRONICO:			
PAÍS DE RESIDENCIA: Japón LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Japón			
7	INVENTOR (ES)		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.NAKAMURA,		Yusuke	Japonés
2.TSUNODA,		Takuya	Japonés
3.OSAWA,		Ryuji	Japonés
4.YOSHIMURA,		Sachiko	Japonés
5.WATANABE,		Tomohisa	Japonés
6.NAKAYAMA,		Gaku	Japonés
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	PAÍS RESIDENCIA
1. c/o The Institute of Medical Science, THE UNIVERSITY OF TOKYO, 6-1, Shirokanedai 4-chome, Minato-ku,		Tokyo 1088639,	Japón
2. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,		Kanagawa 2130012,	Japón
3. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,		Kanagawa 2130012,	Japón
4. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,		Kanagawa 2130012,	Japón
5. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,		Kanagawa 2130012,	Japón
6. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,		Kanagawa 2130012,	Japón
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LÓPEZ DÍAZ		SILVANA MARIA	C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6 No. TELÉFONO 6181088			
CIUDAD Bogotá, D.C. CORREO ELECTRÓNICO notificaciones@clarkemodet.com.co			
PAÍS Colombia			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
Estados Unidos de América		US	61/419.181
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2010/12/02

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 13-063522// 13-064764	Fecha 27/06/2013 02/07/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción 2. ☒ Reivindicaciones 3. ☒ Dibujos y/o figuras 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.		9. ☒ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10. 18.	

PÉPTIDOS TOMM34 Y VACUNAS QUE LOS INCLUYEN

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el campo de las ciencias biológicas, más específicamente con el campo de la terapia anticancerosa. En particular, la presente invención se relaciona con novedosos péptidos que son extremadamente efectivos como vacunas contra el cáncer, y fármacos para el tratamiento y prevención de tumores.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se ha demostrado que los CTLs CD8-positivos reconocen a los péptidos epítipo derivados de los antígenos asociados a tumores (TAAs) en la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, y luego matan a las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia del antígeno del melanoma (MAGE) como el primer ejemplo de TAAs, se han descubierto muchos otros TAAs a través de procedimientos inmunológicos (NPL 1, 2), y algunos de estos TAAs están ahora en el proceso de desarrollo clínico como objetivos inmunoterapéuticos.

Los TAAs favorables son indispensables para la proliferación y supervivencia de las células cancerosas. La utilización de estos TAAs como objetivos en la inmunoterapia puede minimizar el ampliamente descrito riesgo de escape inmunológico de las células cancerosas atribuible a la eliminación, mutación o regulación en descenso de los TAAs como resultado de la selección inmunológica terapéuticamente

000002

11

manejada. Consecuentemente, la identificación de nuevos TAAs capaces de inducir respuestas inmunológicas anti-tumorales potentes y específicas garantiza el desarrollo adicional y de esta manera está en curso la aplicación clínica de las estrategias de vacunación con péptidos en diversos tipos de 5 cáncer (NPL 3 hasta 10). A la fecha, se han documentado diversos experimentos clínicos que utilizan estos péptidos derivados de TAA. Desafortunadamente, muchos de los actuales experimentos con vacunas contra el cáncer han únicamente 10 mostrado un índice de respuesta objetivo bajo (NPL 11 hasta 13). Consecuentemente, persiste la necesidad de disponer de nuevos TAAs como objetivos inmunoterapéuticos.

El gen TOMM34 (No. de Acceso al GenBank NM_006809) traslocasa de membrana mitocondrial exterior 34, ha sido 15 identificado de las bases de datos de cADN y EST humano y se predijo que codifica una proteína que contiene motivos (TPR) de repetición de tetratricopéptido degenerado. La proteína codificada por este gen está implicada en la importación de proteínas precursoras en la mitocondria. Esta proteína tiene 20 una actividad similar a chaperona, enlazando a la porción madura de proteínas no desplegadas y ayudando a importarlas en mitocondria (NPL 15).

En un estudio reciente, se identificó que TOMM34 es frecuentemente regulado hacia arriba en el cáncer colorrectal 25 por análisis de perfil de expresión de gen usando microarreglo de cADN que consiste de 23040 genes. Además, la caída de TOMM34 por siARN en líneas celulares de cáncer de colon atenuó el crecimiento de células de cáncer de colon

000003

(NPL16).

Lista de Citas

Literatura No Patentada

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

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

[NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996, 88(20):
1.442-55

[NPL 4] Butterfield LH y colaboradores, Cancer Res 1999,
10 59(13): 3.134-42

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

[NPL 6] van der Burg SH y colaboradores, J Immunol 1996,
156(9): 3.308-14

15 [NPL 7] Tanaka F y colaboradores, Cancer Res 1997,
57(20): 4.465-8

[NPL 8] Fujie T y colaboradores, Int J Cancer 1999,
80(2): 169-72

[NPL 9] Kikuchi M y colaboradores, Int J Cancer 1999,
20 81(3): 459-66

[NPL 10] Oiso M y colaboradores, Int J Cancer 1999,
81(3): 387-94

[NPL 11] Belli F y colaboradores, J Clin Oncol 2002,
20(20): 4.169-80

25 [NPL 12] Coulie PG y colaboradores, Immunol Rev octubre
2.002, 188: 33-42

[NPL 13] Rosenberg SA y colaboradores, Nat Med 2004,
10(9): 909-15

000004

[NPL 14] Nuttal SD et al., DNA Cell Biol. 1997 Sep;
16(9): 1067-74

[NPL 15] Mukhopadhyay A et al., Arch Biochem Biophys.
2002 Apr 1;400 (1): 97-104

5 [NPL 16] Shimokawa et al., Int J Oncol. 2006 Aug; (2):381-6

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención, al menos en parte, se basa en el descubrimiento de péptidos novedosos que pueden servir como
10 objetivos adecuados de la inmunoterapia. Por cuanto los TAAs son por lo general percibidos por el sistema inmunológico como "propios" y en consecuencia con frecuencia no poseen inmunogenicidad, el descubrimiento de objetivos apropiados resulta de extrema importancia. Como se señala arriba, TOMM34
15 (por ejemplo, SEQ ID NO: 41 y 42, también se indica en el No. de Acceso del NM_006809) ha sido identificado como regulado de forma ascendente en los cánceres, incluyendo, pero no limitados a, leucemia mielogenosa aguda (AML), leucemia mielogenosa crónica (CML), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago,
20 cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de célula pequeña (SCLC), cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), y tumor de tejido suave. De esta manera, la presente invención se enfoca en TOMM34
25 como un marcador de cáncer apropiado y un candidato dirigido a la inmunoterapia.

En el curso de la presente invención, se identificaron los péptidos de epítipo específicos de los productos del gen

000005

de TOMM34 que poseen la capacidad de inducir CTLs específicos para TOMM34. Conforme se explica en mayor detalle más adelante, se estimularon las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) obtenidas a partir de un donante sano utilizando los péptidos candidatos que se acoplan a HLA-A*0201 derivados de TOMM34. Luego se establecieron líneas de CTLs con una citotoxicidad específica contra las células objetivo positivas HLA-A2 cargadas con cada uno de los péptidos candidatos. Los resultados obtenidos demuestran que estos péptidos son péptidos epítipo restringidos HLA-A2 que pueden inducir respuestas inmunológicas potentes y específicas contra las células que expresan a TOMM34. Estos resultados además demuestran que TOMM34 es altamente inmunogénica y que sus epítomos son objetivos efectivos en la inmunoterapia del tumor.

Consecuentemente, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar péptidos aislados que se acoplen al antígeno HLA e incluyen la secuencia de aminoácidos de TOMM34 (SEQ ID NO: 42) o sus fragmentos inmunológicamente activos. Se prevé que estos péptidos induzcan a los CTLs y, por ende, puedan ser utilizados para inducir a los CTLs in vitro o ex vivo, o administrarse a un sujeto para inducir respuestas inmunológicas contra los cánceres, los ejemplos de los cuales incluyen pero no se limitan a AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave. Los péptidos que se prefiere utilizar son nonapéptidos

000006

o deca péptidos, y, más preferiblemente, un nonapéptido o deca péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de entre las SEQ ID NOs: 1 a 20 y 22 a 40. De estos, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 5, 31 o 32 demuestran particularmente tener una fuerte inducción de los CTLs y, por ende, resultan particularmente preferentes.

La presente invención igualmente contempla péptidos modificados con una secuencia de aminoácidos de un fragmento inmunológicamente activo de TOMM34 en los cuales uno, dos o más aminoácidos son sustituidos, insertados, eliminados o añadidos, siempre que los péptidos modificados conserven la necesaria capacidad de inducción de los CTLs del péptido no modificado original. De estos, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 5, 31 o 32 en las cuales uno, dos o más aminoácidos se sustituyen, eliminan, insertan o agregan son particularmente preferidos.

La presente invención adicionalmente abarca polinucleótidos aislados que codifican a cualquiera de los péptidos de la presente invención. Se puede utilizar estos polinucleótidos para inducir o preparar APCs con capacidad de inducir a los CTLs. Al igual que los péptidos de la presente invención descritos con anterioridad, tales APCs pueden ser administrados a un sujeto para inducir respuestas inmunológicas contra los cánceres.

Cuando son administrados a un sujeto, los presentes péptidos se ubican sobre la superficie de las APCs de forma tal de inducir a los CTLs dirigidos a los respectivos

1 /

péptidos. En consecuencia, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar composiciones o agentes que incluyen cualquiera de los péptidos o polinucleótidos proporcionados por la presente invención para la inducción de

5 los CTLs. Se puede utilizar tales composiciones o agentes, incluyendo cualquiera de los péptidos o polinucleótidos para el tratamiento y/o profilaxis de cáncer o la prevención de una recurrencia post-operatoria de los cánceres, los ejemplos de los cuales incluyen pero no se limitan a, AML, CML, cáncer

10 de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave, y/o prevenir la recurrencia post-operatoria de los mismos.

15 La presente invención también contempla agentes o composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención formulados para el tratamiento y/o profilaxis de cáncer, particularmente un

cáncer primario, o la prevención de una recurrencia post-

20 operatoria del cáncer. En lugar o además de los presentes péptidos o polinucleótidos, los presente agentes y/o composiciones farmacéuticas pueden incluir como ingredientes activos APCs o exosomas que incluyan cualquiera de los presentes péptidos.

25 Se pueden utilizar los péptidos o polinucleótidos de la presente invención en la inducción de las APCs que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el presente péptido, por ejemplo, al poner en contacto las APCs

000008

derivadas de un sujeto con el péptido o la introducción de un polinucleótido que codifique un péptido de esta invención en APCs. Estas APCs logran una alta inducción de los CTLs contra los péptidos objetivos y encuentran utilidad en la inmunoterapia del cáncer. Consecuentemente, la presente invención abarca los métodos para inducir las APCs con capacidad de inducción de los CTLs, al igual que las APCs obtenidas de conformidad con estos métodos.

Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un método para la inducción de los CTLs, tales métodos que incluyen el paso de cultivo simultáneo de células CD8-positivas con APCs o exosomas que presentan al péptido de la presente invención sobre su superficie o el paso de introducción de un polinucleótido/polinucleótidos que codifican a los polipéptidos de la subunidad del receptor de célula T (TCR), en donde el TCR formado por tales polipéptidos de subunidad es capaz de enlazar a un complejo de un antígeno HLA y el presente péptido sobre una superficie celular. Los CTLs obtenidos de conformidad con estos métodos encuentran utilidad en el tratamiento y prevención de los cánceres, los ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave. Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar APCs aislados que se presentan sobre la superficie de un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención. La presente

000009

invención además proporciona CTLs aislados que dirigen los péptidos de la presente invención. Estos APCs y CTLs pueden usarse para inmunoterapia de cáncer.

Inclusive otro objetivo de la presente invención
5 consiste en proporcionar métodos para la inducción de una respuesta inmunológica contra el cáncer en un sujeto que así lo requiere, tales métodos que incluyen el paso de administrar al sujeto una composición o agente que incluyan uno o más péptidos de la presente invención, polinucleótidos
10 que codifican los péptidos de la presente invención, o exosomas o APCs que presenten los péptidos de la presente invención. La aplicabilidad de la presente invención se extiende a cualquiera de diversas enfermedades relacionadas con o que se derivan de una sobre expresión de TOMM34, tales
15 como cáncer, los cánceres ejemplares incluyen pero no se limitan a AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave.

20 Más específicamente, la presente invención proporciona los siguientes [1] hasta [20]:

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

(a) un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID
25 NOs: 1, 5, 31 y 32;

(b) un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos en la cual uno, dos, o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan, insertan o agregan a una secuencia de

000010

aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID
NOs: 1, 5, 31 y 32 para proporcionar un péptido modificado
que mantiene la capacidad de enlazar a un antígeno HLA e
inducir la capacidad de inducción de los linfocitos T
5 citotóxicos (CTL);

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

[3] El péptido aislado de cualquiera de [1] hasta [2],
en donde el péptido es un nonapéptido o decapeptido;

10 [4] El péptido de cualquiera de [1] hasta [3], que tiene
al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste
de:

(a) el segundo aminoácido de terminal N es o se modifica
para ser un aminoácido seleccionada del grupo que consiste de
15 leucina y metionina, y

(b) el aminoácido de terminal C es o se modifica para
ser un aminoácido seleccionada del grupo que consiste de
valina y leucina;

[5] Un polinucleótido aislado que codifica el péptido de
20 de cualquiera de [1] hasta [4];

[6] Una composición para la inducción de los CTLs, en
donde la composición comprende uno o más péptidos de
cualquiera de [1] hasta [4], o uno o más polinucleótidos de
[5];

25 [7] Una composición farmacéutica, que comprende:

(a) uno o más péptidos de cualquiera de uno de [1] hasta
[4];

(b) uno o más polinucleótidos de [5];

(c) uno o más APCs o exosomas que presentan un complejo del péptido de cualquiera de uno de [1] hasta [4] y un antígeno HLA sobre su superficie; o

(d) uno o más CTLs que reconocen una célula que presenta
5 un complejo del péptido de cualquiera de uno de [1] hasta [4] y un antígeno HLA sobre su superficie;

en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable,

formulado para un propósito seleccionado del grupo que
10 consiste de:

(i) tratamiento de un cáncer existente,

(ii) profilaxis de un cáncer,

(iii) prevención de una recurrencia postoperativa de un
cáncer, y

15 (iv) combinaciones de los mismos;

[8] La composición farmacéutica de [7], formulada para administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2;

[9] Un método para la inducción de una célula presentadora de antígeno (APC) con capacidad de inducción de
20 los CTLs que comprende un paso seleccionado del grupo que consiste de:

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

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

[10] Un método para inducir un CTL, que comprende un paso seleccionado del grupo que consiste de:

(a) el cultivo simultáneo de células T CD8-positivas con

una APC, que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de cualquiera de [1] hasta [4],

(b) el cultivo simultáneo de células T CD8-positivas con un exosoma, que presentan sobre su superficie un complejo de
5 un antígeno HLA y un péptido de cualquiera de [1] hasta [4],
y

(c) introducir en una célula T un polinucleótido/polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la subunidad del receptor de célula T (TCR), en donde el
10 TCR formado por los polipéptidos de la subunidad TCR es capaz de enlazar a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de cualquiera de [1] hasta [4] en una superficie celular;

[11] Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de cualquiera de [1]
15 hasta [4];

[12] La APC de [11], la cual es inducida por un método que comprende un paso seleccionado del grupo que consiste de:

(a) poner en contacto un APC con el péptido de cualquiera de [1] hasta [4] in vitro, ex vivo o in vivo, y
20 (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de cualquiera de [1] hasta [4] en un APC;

[13] Un CTL aislado dirigido a cualquiera de los péptidos de [1] hasta [4];

[14] El CTL de [13], el cual es inducido por un método
25 que comprende un paso seleccionado del grupo que consiste de:

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

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

(c) introducir en una célula T un polinucleótido que
5 codifica los polipéptidos de la subunidad del receptor de célula T (TCR), en donde el TCR formado por los polipéptidos de la subunidad TCR es capaz de enlazar al péptido de cualquiera de [1] hasta [4];

[15] Un método para la inducción de una respuesta
10 inmunológica contra el cáncer en un sujeto, que comprende el paso de administrar al sujeto un péptido de cualquiera de [1] hasta [4] o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, o un polinucleótido que codifica al péptido o el fragmento;

[16] Un vector que comprende una secuencia de
15 nucleótidos que codifica el péptido de cualquiera de [1] hasta [4];

[17] Una célula hospedera transformada o transfectada con el vector de [16];

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

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

[20] Un kit de diagnóstico que comprende el péptido de
25 cualquiera de [1] hasta [4], el polinucleótido de [5] o el anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo de [19].

Otros objetivos y características de la invención resultarán completamente más evidentes al dar lectura a la

siguiente descripción detallada, en conjunto con las figuras y ejemplos adjuntos. Se entenderá que tanto el resumen que antecede de la invención como la siguiente descripción detallada son de aplicaciones ejemplificadas, y no limitan la presente invención u otras aplicaciones alternativas de la presente invención. En particular, aun cuando se describe la invención haciendo referencia a un número de aplicaciones específicas, se apreciará que la descripción es ilustrativa de la invención y no ha de ser interpretada como limitante de la invención. Pueden presentarse diversas modificaciones y aplicaciones para aquellos con experiencia en esta técnica, sin alejarse del espíritu y alcance de la invención, como se describe en las reivindicaciones adjuntas. De igual forma, otros objetivos, características, beneficios y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de este resumen y de ciertas aplicaciones descritas más adelante, y los mismos resultarán evidentes para aquellos con experiencia en esta técnica. Estos objetivos, características, beneficios y ventajas resultarán evidentes a partir del texto que antecede, en conjunto con los ejemplos, datos y figuras adjuntos y toda deducción razonable que pueda surgir del mismo, sola o tomando en consideración las referencias aquí incorporadas.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Diversos aspectos y aplicaciones de la presente invención resultarán evidentes para aquellos con experiencia en esta técnica luego de considerar la breve descripción de

000015

las figuras y la siguiente descripción detallada de la presente invención y sus aplicaciones preferentes.

Las **Figuras 1a-1e** están constituidas por una serie de fotografías, (1a) hasta (1e), que ilustran los resultados de los experimentos ELISPOT con IFN-gamma sobre los CTLs que fueron inducidos con péptidos derivados de TOMM34. Los CTLs en el pozo número #4 con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1) (1a), en #2 con TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5) (1b), en #4 con TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31) (1c), y en #2 con TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32) (1d), demostraron tener una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El recuadro en el pozo de estas fotografías indica que se expandieron las células del correspondiente pozo a los fines de establecer líneas de CTLs. En contraste, como es el caso típico para datos negativos, no se mostró la producción de IFN-gamma específico del CTL estimulado con TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID NO: 21) (1e). En las figuras, el signo "+" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo cargadas con el péptido apropiado, y el signo "-" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo no cargadas con ninguno de los péptidos.

La **Figura 2** es una gráfica de líneas que representa la producción IFN-gamma de la línea CTL estimulada con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1). La cantidad de IFN-gamma que CTL produjo se midió por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas IFN-gamma (ELISA). Estos resultados demuestran que las líneas de CTLs establecidas por estimulación con cada

000016

péptido demuestran una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, el signo "+" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo cargadas con el péptido apropiado y el signo "-" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo no cargadas con ninguno de los péptidos.

La **Figura 3** está compuesta de gráficas de líneas que representa la producción de IFN-gamma de los clones de CTL establecidos por medio de la limitación de la dilución de las líneas de CTL estimuladas con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1)). Los resultados demuestran que los clones de CTL establecidos por estimulación con cada péptido demuestran una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, el signo "+" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo cargadas con el péptido apropiado y el signo "-" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo no cargadas con ninguno de los péptidos.

La **Figura 4** es una gráfica en líneas que representa la actividad específica de los CTLs contra las células objetivo que expresan tanto TOMM34 como HLA-A*0201. Se prepararon células COS7 transfectadas con HLA-A*0201 o el gen TOMM34 de longitud completa como los controles. El clon de CTL establecido con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1) demostró tener actividad CTL específica contra las células COS7 transfectadas tanto con TOMM34 como con HLA-A*0201 (rombos negros). Por otro parte, no se detectó actividad CTL específica significativa contra las células objetivo que

expresan a ya sea HLA-A*0201 (triángulo) o TOMM34 (círculo).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aunque en la práctica o evaluación de las aplicaciones
5 de la presente invención se puede utilizar cualquiera de los
métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí
descritos, a continuación se describen los materiales,
métodos y dispositivos que se prefiere utilizar. Sin embargo,
antes de describir los presentes materiales y métodos, se
10 entenderá que estas descripciones son meramente ilustrativas
y que no se prevé sean limitantes. Igualmente se entenderá
que la presente invención no se limita a los tamaños, formas,
dimensiones, materiales, metodologías, protocolos, etc.
particularmente descritos en el presente documento, por
15 cuanto estos pueden variar de acuerdo con la experimentación
de rutina y la optimización. Adicionalmente, la terminología
utilizada en la descripción tiene como propósito describir
las versiones o aplicaciones particulares únicamente, y no se
prevé que limite el alcance de la presente invención, el cual
20 se verá únicamente limitado por las reivindicaciones
adjuntas.

La descripción de cada publicación, patente o solicitud de
patente citada en la presente especificación está
específicamente incorporada a título de referencia en su
25 totalidad. Sin embargo, nada de lo aquí contenido deberá ser
interpretado como una admisión que la invención pueda preceder
en tiempo a esta revelación por virtud de la invención previa.

000018

I. Definiciones

A no ser que específicamente se indique algo diferente, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado como se entiende
5 comúnmente por alguien de experiencia ordinaria en la técnica a la cual la presente invención pertenece. Sin embargo, en caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo definiciones, controlará.

Las palabras "un", "una", y "el/la" utilizadas en el
10 presente documento significan "al menos uno" a menos que se indique específicamente de otra manera.

Los términos "aislado" y "purificado" usados en relación con una sustancia (por ejemplo, péptido, anticuerpo, polinucleótido, etc.) indican que la sustancia está libre
15 sustancialmente de al menos una sustancia que también puede incluirse en la fuente natural. De esta manera, un péptido aislado o purificado se refiere al péptido que está sustancialmente libre de material celular tal como carbohidrato, lípido, u otras proteínas contaminantes de la
20 fuente de célula o tejido de la cual el péptido se deriva, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan químicamente. El término "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un péptido en las cuales el péptido se
25 separa de componentes celulares de las células de las cuales se aísla o produce recombinantemente. De esta manera, un péptido que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de polipéptido que tienen menos de

000019

alrededor de 30%, 20%, 10%, o 5% (en peso seco) de la proteína heteróloga (también referida en la presente como una "proteína contaminante"). Cuando el péptido se produce recombinantemente, también de forma preferible está

5 sustancialmente libre del medio de cultivo, que incluye preparaciones de péptido con el medio de cultivo menor que alrededor de 20%, 10%, o 5% del volumen de la preparación de péptido. Cuando el péptido se produce por síntesis química, de forma preferible está sustancialmente libre de precursores

10 químicos u otros químicos, que incluyen preparaciones de péptido con precursores químicos u otros químicos involucrados en la síntesis del péptido menor que alrededor de 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) del volumen de la preparación de péptido. Puede mostrarse que una preparación

15 de péptido particular contiene un péptido aislado o purificado, por ejemplo, por la apariencia de una banda sencilla seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida-sulfato dodecil de sodio (SDS) de la preparación de proteína y tinción de Azul Brillante de Coomasie o similares del gel.

20 En una aplicación preferida, los péptidos y polinucleótidos de la presente invención están aislados o purificados.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" son utilizados de forma intercambiable en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Estos

25 términos aplican a los polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos pueden ser residuos modificados, o residuos de aparición no natural, tales como miméticos químicos artificiales de los correspondientes

aminoácidos de aparición natural, al igual que a los polímeros de aminoácidos de aparición natural. El término "oligopéptido" utilizado en ocasiones en la presente especificación es utilizado para referirse a los péptidos de la presente invención que tienen una longitud de 20 residuos o menos, típicamente 15 residuos o menos y que están típicamente constituidos por entre aproximadamente 8 y cerca de 11 residuos, con frecuencia 9 o 10 residuos.

El término "aminoácido" como es utilizado en el presente documento se refiere a los aminoácidos de aparición natural y sintéticos, al igual que a los análogos de los aminoácidos y a los miméticos de los aminoácidos que funcionan de forma similar a la de los aminoácidos de aparición natural. Los aminoácidos pueden ser ya sea aminoácidos L o aminoácidos D. Los aminoácidos de aparición natural son aquellos codificados por el código genético, al igual que aquellos modificados después de la translación en células (por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina). La frase "análogo de los aminoácidos" se refiere a los 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 un aminoácido de aparición natural pero que tiene un grupo R modificado o estructuras centrales modificadas (por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metionina metil sulfonio). La frase "mimético de aminoácido" se refiere a los compuestos químicos que tienen estructuras diferentes pero un funcionamiento similar al de los aminoácidos en general.

000021

Los aminoácidos pueden ser aquí denominados por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

5 Los términos "gen", "polinucleótidos" y "ácidos nucleicos" son utilizados de forma intercambiable y, a no ser que específicamente se indique algo diferente, son, al igual que los aminoácidos, denominados por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

10 El término "composición" es utilizado en la presente para referirse a un producto que incluye los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, al igual que cualquier producto que sea el resultado directo o indirecto de la combinación de los ingredientes especificados en las
15 cantidades especificadas. Tal termino en relación a la "composición farmacéutica", se prevé que abarque un producto que incluye los ingredientes activos, y cualquiera de los ingredientes inertes que constituyan el portador, al igual que cualquier producto que sea el resultado directo o
20 indirecto de la combinación, formación de complejos o adición de cualesquiera de dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Consecuentemente, en el contexto de la presente
25 invención, el término "composición farmacéutica" se refiere a cualquier composición hecha al mezclar un compuesto de la presente invención y un portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable. La frase "portador

000022

farmacéuticamente aceptable" o "portador fisiológicamente aceptable" utilizado en el presente documento significa un material, composición, sustancia, compuesto o vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable, pero no se limitan
5 a, un material de relleno líquido o sólido, un diluyente, un excipiente, un solvente o un material encapsulante.

El término "ingrediente activo" en la presente se refiere a una sustancia en una composición que es biológica o fisiológicamente activa. En particular, en el contexto de una
10 composición farmacéutica, el término "ingrediente activo" se refiere a una sustancia que tiene un efecto farmacológico objetivo. Por ejemplo, en el caso de composiciones farmacéuticas a ser utilizados en el tratamiento o prevención del cáncer, los ingredientes activos en las composiciones
15 pueden conllevar a al menos una acción biológica o fisiológica sobre las células cancerosas y/o los tejidos directamente o indirectamente. Preferiblemente, esta acción puede incluir la reducción o inhibición del crecimiento de células cancerosas, el daño o muerte de las células
20 cancerosas y/o tejidos y similares. Típicamente, el efecto indirecto de los ingredientes activos es la inducción de los CTLs para que reconozcan o maten a las células cancerosas. Antes de ser formulado, el "ingrediente activo" puede ser igualmente denominado "crudo", "sustancia farmacológica" o
25 "producto técnico".

A no ser que se defina algo diferente, el término "cáncer" se refiere a los cánceres que sobreexpresan el gen TOMM34, los ejemplos de los cuales incluyen, pero no se

000023

limitan a AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave.

5 A no ser que se defina algo diferente, los términos "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" son utilizados de forma intercambiable en la presente y a no ser que específicamente se indique algo diferente, se refieren a un sub-grupo de los linfocitos T que son capaces de reconocer
10 a las células extrañas (por ejemplo, las células tumorales, las células infectadas con virus) y de inducir la muerte de estas células. A no ser que se defina algo diferente, el término "HLA-A2" utilizado en el presente documento, se refiere de forma representativa a los subtipos, ejemplos de
15 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 no ser que se defina algo diferente, el término "kit"
20 como se usa en la presente, se usa en referencia a una combinación de reactivos y otros materiales. Se contempla en la presente que el kit pueda incluir un micro arreglo, un chip, un marcador, y similares. No se prevé que el término "kit" se vea limitado a una combinación en particular de
25 reactivos y/o materiales.

Como se usa en la presente, en el contexto de un sujeto o paciente, la frase "antígeno HLA del sujeto (o paciente) es HLA-A2" se refiere a que el sujeto o paciente

000024

homocigóticamente o heterocigóticamente posee el gen del antígeno HLA-A2 como la molécula de MHC (complejo de histocompatibilidad principal) clase I, y el antígeno HLA-A2 se expresa en las células del sujeto o paciente como un
5 antígeno HLA.

En la medida en la cual los métodos y composiciones de la presente invención encuentran utilidad en el contexto del "tratamiento" del cáncer, se estima que un tratamiento es "eficaz" si conlleva a un beneficio clínico tal como,
10 reducción de la expresión del gen TOMM34, o una disminución en el tamaño, la predominio o el potencial metastásico del cáncer en el sujeto. Cuando se aplica el tratamiento profilácticamente, el término "eficaz" significa que el mismo retarda o impide la formación de cánceres o previene o mejora
15 un síntoma clínico del cáncer. La eficacia es determinada en asociación con cualquier método conocido para el diagnóstico o tratamiento del tipo particular de tumor.

En la medida en la cual los métodos y composiciones de la presente invención encuentran utilidad en el contexto de
20 la "prevención" y "profilaxis" del cáncer, estos términos son utilizados de forma intercambiable para referirse a cualquier actividad que reduzca la carga de mortalidad o morbilidad de la enfermedad. La prevención y profilaxis puede ocurrir "a los niveles primarios, secundarios y terciarios de
25 prevención". Aun cuando la prevención y profilaxis primaria evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles secundario y terciario de prevención y profilaxis abarcan las actividades dirigidas a la prevención y profilaxis del avance

de una enfermedad y la presencia de síntomas, al igual que la reducción del impacto negativo que tiene una enfermedad ya establecida por medio de la restauración de la funcionalidad y de la reducción de las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y profilaxis pueden incluir un rango amplio de terapias profilácticas dirigidas al alivio de la severidad del trastorno en particular, por ejemplo, a la reducción de la proliferación y de la metástasis de los tumores.

10 En el contexto de la presente invención, el tratamiento y/o profilaxis del cáncer y/o la prevención de la recurrencia post-operatoria del mismo incluyen cualquiera de los siguientes pasos, por ejemplo, la remoción quirúrgica de las células cancerosas, la inhibición del crecimiento de las células cancerosas, la involución o regresión de un tumor, la inducción de la remisión y supresión de la aparición del cáncer, la regresión del tumor, y la reducción o inhibición de la metástasis. El tratamiento y/o profilaxis efectiva del cáncer disminuye la mortalidad y mejora el pronóstico de los individuos con cáncer, disminuye los niveles de los marcadores tumorales en la sangre y mejora los síntomas detectables que acompañan al cáncer. Por ejemplo, la reducción o mejora de los síntomas constituye un tratamiento eficaz y/o la profilaxis incluye 10%, 20%, 30% o más de reducción o una enfermedad estable.

En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere a las inmunoglobulinas y sus fragmentos que son específicamente reactivos a una

000026

determinada proteína o un péptido de la misma. Un anticuerpo puede incluir los anticuerpos humanos, los anticuerpos primatizados, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos fundidos con otras proteínas o radiomarcadores, y los fragmentos de anticuerpos. Adicionalmente, se utiliza un anticuerpo en la presente en su más amplio sentido y específicamente abarca los anticuerpos monoclonales intactos, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intacto, y los fragmentos de anticuerpos, siempre que estos dispongan de la actividad biológica deseada. Un "anticuerpo" indica todas las clases (por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).

A no ser que se defina algo diferente, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente del conocimiento de aquellos con experiencia en la técnica al que pertenece la presente invención.

II. Péptidos

Los péptidos de la presente invención descritos en detalles a continuación pueden referirse como "péptidos TOMM34".

Para demostrar que los péptidos derivados de TOMM34 funcionan como un antígeno reconocido por los CTLs, se analizaron péptidos derivados de TOMM34 (SEQ ID NO: 42) para determinar si eran los epítomos antigénicos restringidos por HLA-A2, los cuales son comúnmente hallados en los alelos de

000027

HLA (Date Y y colaboradores, Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A y colaboradores, J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT y colaboradores, J Immunol 152: 3.913-24, 1994). Los candidatos de péptidos derivados de TOMM34 acoplados a HLA-A2
5 fueron identificados usando la información en sus afinidades de acoplamiento hacia HLA-A2. Se identificaron los siguientes péptidos candidatos:

10 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1),
TOMM34-A02-9-77 (SEQ ID NO: 2),
TOMM34-A02-9-52 (SEQ ID NO: 3),
TOMM34-A02-9-110 (SEQ ID NO: 4),
TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5),
TOMM34-A02-9-230 (SEQ ID NO: 6),
TOMM34-A02-9-103 (SEQ ID NO: 7),
TOMM34-A02-9-80 (SEQ ID NO: 8),
TOMM34-A02-9-255 (SEQ ID NO: 9),

15

000028

TOMM34-A02-9-23 (SEQ ID NO: 10),
 TOMM34-A02-9-195 (SEQ ID NO: 11),
 TOMM34-A02-9-111 (SEQ ID NO: 12),
 5 TOMM34-A02-9-238 (SEQ ID NO: 13),
 TOMM34-A02-9-1 (SEQ ID NO: 14),
 TOMM34-A02-9-113 (SEQ ID NO: 15),
 TOMM34-A02-9-253 (SEQ ID NO: 16),
 TOMM34-A02-9-239 (SEQ ID NO: 17),
 TOMM34-A02-9-144 (SEQ ID NO: 18),
 TOMM34-A02-9-142 (SEQ ID NO: 19),
 TOMM34-A02-9-279 (SEQ ID NO: 20),
 10 TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID NO: 21)
 TOMM34-A02-10-97 (SEQ ID NO: 22),
 TOMM34-A02-10-79 (SEQ ID NO: 23),
 TOMM34-A02-10-237 (SEQ ID NO: 24)
 TOMM34-A02-10-135 (SEQ ID NO: 25)
 TOMM34-A02-10-219 (SEQ ID NO: 26)
 TOMM34-A02-10-238 (SEQ ID NO: 27)
 TOMM34-A02-10-127 (SEQ ID NO: 28)
 15 TOMM34-A02-10-113 (SEQ ID NO: 29)
 TOMM34-A02-10-241 (SEQ ID NO: 30)
 TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31),
 TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32)
 TOMM34-A02-10-195 (SEQ ID NO: 33)
 TOMM34-A02-10-112 (SEQ ID NO: 34)
 TOMM34-A02-10-194 (SEQ ID NO: 35)
 TOMM34-A02-10-299 (SEQ ID NO: 36)
 20 TOMM34-A02-10-141 (SEQ ID NO: 37)
 TOMM34-A02-10-160 (SEQ ID NO: 38)
 TOMM34-A02-10-175 (SEQ ID NO: 39) y
 TOMM34-A02-10-186 (SEQ ID NO: 40).

Además, luego de la estimulación *in vitro* de las células
 T con células dendríticas (DCs) cargadas con estos péptidos,
 25 se establecieron exitosamente CTLs usando cada uno de los
 siguientes péptidos:

TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1),
 TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5),
 TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31)

000029

y

TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32).

Estos CTLs establecidos demostraron tener una potente actividad CTL específica contra las células objetivo pulsadas con los respectivos péptidos. Estos resultados en la presente demuestran que TOMM34 es un antígeno reconocido por los CTLs y que los péptidos evaluados son péptidos epítipo de TOMM34 restringidos por HLA-A2.

Dado que el gen TOMM34 está sobreexpresado en los tejidos y células cancerosas, incluyendo, pero no limitadas a aquellas de AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave. pero no se expresa en la mayoría de los órganos normales, es un objetivo adecuado para inmunoterapia. En consecuencia, la presente invención proporciona nonapéptidos (péptidos constituidos por nueve residuos de aminoácidos) y decapeptidos (péptidos constituidos por diez residuos de aminoácidos) de epítipos reconocidos por los CTLs de TOMM34. Alternativamente, la presente invención proporciona un péptido aislado que se acopla a un antígeno HLA e induce a los linfocitos T citotóxicos (CTLs), en donde el péptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 o es un fragmento inmunológicamente activo del mismo. Específicamente, la presente invención proporciona péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NOs: 1, 5, 31 y 32. Más

000030

específicamente, en algunas aplicaciones, la presente invención proporciona péptidos que consisten de la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NOs: 1, 5, 31 y 32.

5 Generalmente, se pueden utilizar los programas de software actualmente disponibles, por ejemplo, en la Internet, tales como aquellos descritos en Parker KC y colaboradores, J Immunol 1994, 152(1): 163-75, para calcular las afinidades de enlace entre diversos péptidos y los
10 antígenos HLA *in silico*. Se puede medir la afinidad de enlace con los antígenos HLA conforme se describe en, por ejemplo, Parker KC y colaboradores, J Immunol 1994, 152(1): 163-75, y Kuzushima K y colaboradores, Blood 2001, 98(6): 1.872-81, Larsen MV y colaboradores. BMC Bioinformatics. 2007; 8: 424,
15 y Buus S y colaboradores. Tissue Antigens, 62:378-84, 2003. Los métodos para la determinación de la afinidad de enlace se encuentran descritos en, por ejemplo, **Journal of Immunological Methods** 1995, 185: 181-190 y Protein Science 2000, 9: 1838-1846. En consecuencia, se pueden utilizar
20 fácilmente estos programas de software para seleccionar aquellos fragmentos derivados de TOMM34 que tienen una alta afinidad de enlace con los antígenos HLA. Consecuentemente, la presente invención abarca los péptidos constituidos de cualquiera de los fragmentos derivados de TOMM34 que tienen
25 alta afinidad de enlace con los antígenos HLA determinados por tales programas conocidos. Adicionalmente, estos péptidos pueden incluir la secuencia de longitud completa de TOMM34 (por ejemplo, SEQ ID NO: 42).

000031

Los péptidos de la presente invención, particularmente los nonapéptidos y los decapeptidos de la presente invención, pueden ser flanqueados con residuos de aminoácidos adicionales siempre que los péptidos retengan su capacidad de inducción de los CTL. Los residuos de aminoácidos adicionales particulares pueden estar compuestos de cualquier tipo de aminoácidos, siempre que estos no impidan la capacidad de inducción de los CTL del péptido original. Por ende, la presente invención abarca péptidos que presentan una afinidad de acoplamiento por los antígenos HLA, en particular péptidos derivados de TOMM34. Estos péptidos son, por ejemplo, menores de alrededor de 40 aminoácidos, con frecuencia menores de alrededor de 20 aminoácidos, usualmente menores de alrededor de 15, 14, 13, 12, 11, o 10 aminoácidos.

Generalmente, se sabe que las modificaciones de uno o más aminoácidos en un péptido no afectan la función del péptido, o en algunos casos, inclusive mejoran la función deseada de la proteína original. De hecho, se sabe que los péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos de una secuencia de aminoácidos modificados por medio de la sustitución, eliminación, inserción o adición de uno, dos o varios residuos de aminoácidos a una secuencia de referencia original) retienen la actividad biológica del péptido original (Mark y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13). Por ende, de acuerdo con una aplicación de la presente invención, el péptido que tiene

capacidad de inducción de los CTL de la presente invención, puede estar compuesto de un péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 5, 31 y 32, en el cual, dos o inclusive más aminoácidos son añadidos, eliminados, insertados y/o sustituidos.

Alguien de experiencia en la técnica reconocerá que las modificaciones individuales (esto es, eliminaciones, inserciones, adiciones o sustituciones) a una secuencia de aminoácidos que alteran un aminoácido individual o un pequeño porcentaje de la secuencia de aminoácidos general resulta en la conservación de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original; por lo cual es denominada como "sustitución conservativa" o "modificación conservativa", en donde la alteración de una proteína resulta en una proteína con funcionamientos similares. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de propiedades de cadenas laterales de aminoácidos son aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrofílicos (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); un grupo hidroxilo que contenga una cadena lateral (S, T, Y); un átomo de azufre que contenga una cadena lateral (C, M); un ácido carboxílico y una amida que contenga una cadena lateral (D, N, E, Q); una base que contenga una cadena lateral (R, K, H); y un grupo aromático que contenga una cadena lateral (H, F, Y, W). Adicionalmente,

los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

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

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

5 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);

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

8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins 1984).

Estos péptidos modificados de forma conservadora son igualmente considerados para ser péptidos de la presente invención. Sin embargo, el péptido de la presente invención no se ve limitado en este sentido y puede incluir modificaciones no conservadoras, siempre que el péptido modificado resultante retenga la capacidad de inducción de los CTL del péptido original no modificado. Adicionalmente, los péptidos modificados no deberían excluir los péptidos inducibles CTL de variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos de TOMM34.

Se pueden insertar, sustituir o añadir residuos de aminoácidos a los péptidos de la presente invención o, alternativamente, los residuos de aminoácidos pueden eliminarse de allí para lograr una afinidad de enlace superior. Para conservar la capacidad de inducción de los CTLs necesaria, preferiblemente se modifica (esto es,

000033
000034

elimina, inserta, agrega o sustituye) únicamente un número reducido (por ejemplo, 1, 2 o varios) o un porcentaje reducido de aminoácidos. En el presente documento, el término "varios" significa 5 o menos aminoácidos, por ejemplo, 3 o 5 menos. El porcentaje de aminoácidos a ser modificados puede ser 20% o menos, por ejemplo, 15% o menos, por ejemplo 10% o menos, por ejemplo 1 hasta 5%.

Además, los péptidos pueden ser sustituidos o agregados por los residuos de aminoácidos para lograr una afinidad de 10 enlace más alta. Cuando se utiliza en la inmunoterapia, los presentes péptidos pueden estar presentes sobre la superficie de una célula o exosoma en la forma de un complejo con un antígeno HLA. Además de los péptidos que son naturalmente desplegados, ya que se conoce fácilmente la regularidad de 15 las secuencias de péptidos desplegadas por medio de su acoplamiento con antígenos HLA (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), las modificaciones basándose en esta regularidad pueden ser introducidas en los péptidos inmunogénicos de la presente 20 invención.

Por ejemplo, los péptidos que poseen una alta afinidad de acoplamiento a HLA-A2 tienden a tener el segundo aminoácido de la terminal N sustituido con leucina o metionina. De igual forma, los péptidos en los cuales el 25 aminoácido de terminal C está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina pueden ser igualmente utilizados de forma favorable. Por ende, los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos

000035

seleccionadas de entre las SEQ ID NO: 1, 5, 31 y 32 en las
cuales el segundo aminoácido de la terminal N de la secuencia
de aminoácidos de dicha SEQ ID NO. está sustituida con
leucina o metionina, y/o la terminal C de la secuencia de
5 aminoácidos de dicha SEQ ID NO. está sustituida con valina o
leucina son contemplados en la presente invención. Se pueden
introducir sustituciones no sólo en los aminoácidos
terminales, sino también en la posición de reconocimiento del
receptor de células T (TCR) potencial de los péptidos. Varios
10 estudios han demostrado que un péptido con sustituciones de
aminoácidos puede ser igual a o mejor que la del original,
por ejemplo, CAP1, p53 (264-272), Her-2/neu (369-377) o gp100 (209-217)
(Zaremba y colaboradores. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T.
K. Hoffmann y colaboradores. J Immunol. (2002); 168(3):1338-
15 47., S. O. Dionne y colaboradores. Cancer Immunol immunother.
(2003) 52: 199-206 y S. O. Dionne y colaboradores. Cancer
Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

La presente invención igualmente contempla la adición de
uno, dos o varios aminoácidos a la terminal N y/o C de los
20 presentes péptidos. Estos péptidos modificados con alta
afinidad de acoplamiento con el antígeno HLA y capacidad de
inducción de los CTL retenida están igualmente incluidos en
la presente invención.

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

000035

(i) una secuencia de aminoácidos se selecciona de entre las SEQ ID NO: 1 y 5;

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

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

(a) el segundo aminoácido de la terminal N de dicha SEQ ID NO. está seleccionado de entre leucina y metionina; y

(b) el aminoácido de terminal C de dicha SEQ ID NO está seleccionado de entre valina y leucina.

Además, la presente invención igualmente proporciona un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12, u 11 aminoácidos en longitud que se une a un antígeno HLA, que tiene la capacidad de inducción CTL y comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre:

(i') una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 31 hasta 32;

(ii') una secuencia de aminoácidos en la cual uno, dos o varios aminoácidos se modifican en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 hasta 32, y

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

(a) el segundo aminoácido de la terminal N de dicha SEQ ID No está seleccionado de entre leucina y metionina; y

(b) el aminoácido de terminal C de dicha SEQ ID NO está

000037

seleccionado de entre valina y leucina.

Estos péptidos enlazados con antígenos HLA en APCs son para presentarse en APCs como complejos con antígenos HLA cuando aquellos péptidos están en contacto con APCs.

5 Alternativamente, aquellos péptidos se introducen en APCs y se procesan en fragmentos que consisten de una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre (i)-(iii) y (i')-(iii') en APCs para presentarse en APCs como complejos con antígenos HLA, cuando aquellos péptidos están en contacto con APC. En
10 consecuencia, se inducen los CTLs 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, se pueden
15 inducir efectos colaterales tales como trastornos autoinmunitarios o síntomas alérgicos contra sustancias específicas. En consecuencia, se puede llevar a cabo búsquedas de homología utilizando las bases de datos disponibles para evitar las situaciones en las cuales la
20 secuencia del péptido coincida con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando se haga evidente a partir de las búsquedas de homología que no existe ningún péptido con 1 ó 2 aminoácidos diferentes al péptido objetivo, el péptido objetivo puede ser modificado a los fines de
25 incrementar su afinidad de acoplamiento con los antígenos HLA, y/o de incrementar su capacidad de inducción de los CTL sin ningún peligro de estos efectos colaterales.

Aunque se prevé que los péptidos que tienen alta

000038

afinidad de acoplamiento hacia los antígenos HLA descritos con antelación sean sumamente efectivos, los péptidos candidatos, que son seleccionados de acuerdo con la presencia de una alta afinidad de acoplamiento como un indicador, son

5 examinados adicionalmente en búsqueda de la presencia de capacidad de inducción de los CTL. En el presente documento, la frase "capacidad de inducción de los CTL" indica la capacidad del péptido para inducir los CTLs, cuando se presentan sobre la célula que presenta antígenos (APCs).

10 Además, la "capacidad de inducción de los CTL" incluye la capacidad del péptido de inducir la activación de los CTL, la proliferación de los CTLs, la promoción de la lisis por parte de los CTLs de las células objetivo y el incremento en la producción de IFN-gamma en los CTLs.

15 La confirmación de la capacidad de inducción de los CTLs es llevada cabo por medio de la inducción de las APCs portadoras de antígenos MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos, y células dendríticas (DCs)), o más específicamente las DCs derivadas de los leucocitos

20 mononucleares de la sangre periférica humana, y luego de la estimulación con los péptidos, la mezcla con células CD8-positivas, y posteriormente la medición del IFN-gamma producido y liberado por los CTL en contra de las células objetivo. Como sistema de reacción, se puede utilizar los

25 animales transgénicos que han 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, Artículos

relacionados, libros, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA-A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on HLA class II restricted T(H) response). Por ejemplo, las células objetivo pueden ser radiomarcadas con ^{51}Cr y similares, y la actividad citotóxica puede ser calculada a partir de la radioactividad liberada por las células objetivo. Alternativamente, estas pueden ser examinadas por medio de la medición del IFN-gamma producido y liberado por el CTL en la presencia de las APCs portadoras de péptidos inmovilizados, y de la visualización de la zona de inhibición en el medio utilizando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

Al examinar la capacidad inducción de los CTL de los péptidos como se describe con antelación, se descubrió que los nonapéptidos y los decapeptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NOs: 1, 5, 31 y 32 mostraron una capacidad de inducción de los CTL particularmente alta, así como también una alta afinidad de acoplamiento con un antígeno HLA. Por ende, estos péptidos son ejemplificados como aplicaciones preferentes de la presente invención.

Adicionalmente, los análisis de la homología demuestran que estos péptidos no tienen una homología significativa con los péptidos derivados de cualquiera de los otros productos genéticos humanos conocidos. En consecuencia, puede disminuirse la posibilidad de respuestas inmunitarias desconocida o no deseadas surgidas cuando se utiliza para inmunoterapia. Por lo tanto, igualmente desde este aspecto,

estos péptidos encuentran uso para producir inmunidad en
contra de TOMM34 en pacientes con cáncer. Por ende, los
péptidos preferidos de la presente invención son aquellos
péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada
5 de entre las SEQ ID NOs: 1, 5, 31 y 32.

Además de las modificaciones de los presentes péptidos.
discutidas con anterioridad, los péptidos de la presente
invención también pueden ser acoplados a otros péptidos,
siempre que conserve la capacidad de inducción de los CTL, y
10 más preferiblemente también conserve el acoplamiento a HLA
necesario. Los ejemplos de "otros" péptidos adecuados
incluyen: los péptidos de la presente invención o los
péptidos inducibles CTL derivados de otros TAAs. Las
ligaduras entre los péptidos son bien conocidos en la
15 técnica, por ejemplo, AAY (P. M. Daftarian y colaboradores, J
Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Suttmuller y
colaboradores, J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) o K (S. Ota y
colaboradores, Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura y
colaboradores, J Immunol. 2002, 168: 5709-5715).

20 Por ejemplo, se puede igualmente utilizar los péptidos
antigénicos asociados con tumores no TOMM34 sustancial y
simultáneamente para incrementar la respuesta inmunitaria por
medio de la HLA clase I y/o clase II. Está bien establecido
que las células cancerosas pueden expresar más de un gen
25 asociado a tumor. Consecuentemente, dentro del alcance de la
experimentación de rutina de los expertos en la técnica se
prevé determinar si un sujeto en particular expresa genes
adicionales asociados a tumor, y posteriormente incluir los

péptidos que se acoplan a HLA clase I y/o HLA clase II derivados de los productos de expresión de estos genes en las composiciones o vacunas que contengan TOMM34.

Los ejemplos de los péptidos que se acoplan a HLA clase I y HLA clase II son del conocimiento de aquellos con experiencia en esta técnica (véase, por ejemplo, Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995) y de esta manera pueden ser utilizados en la invención de manera similar como aquellos descritos en la presente. De esta manera, alguien de experiencia ordinaria en la técnica puede preparar fácilmente polipéptidos incluyendo uno o más péptidos TOMM34 y uno o más de los péptidos no TOMM34, o ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos, que utilizan procedimientos convencionales de la biología molecular.

Los péptidos descritos arriba son denominados "polítomos", es decir, grupos de dos o más péptidos que estimulan la respuesta inmunitaria o potencialmente inmunogénicos que pueden ser agrupados entre sí en varias disposiciones (por ejemplo, concadenado, traslapado). El polítomo (o ácido nucleico que codifica el polítomo) puede ser administrado de acuerdo con los protocolos de inmunización convencionales, por ejemplo, a los animales, con el objeto de evaluar la efectividad del polítomo en la estimulación, mejora y/o inducción de una respuesta inmunitaria.

Los péptidos pueden ser agrupados conjuntamente de forma directa o por medio de la utilización de secuencias flanqueadoras para formar polítomos, y el uso de polítomos

como vacunas es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Thomson y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert y colaboradores, Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson y colaboradores, 5 J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn y colaboradores, J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990). Los polítopos que contienen varios números y combinaciones de epítomos, pueden ser preparados y evaluados para ser reconocidos por los CTLs y para la eficacia del incremento de una respuesta inmunitaria.

10 Los péptidos de la presente invención pueden ser adicionalmente unidos a otras sustancias, siempre que mantengan la capacidad de inducción de los CTL del péptido original. Los ejemplos de sustancias adecuada pueden incluir: péptidos, lípidos, azúcar y cadenas de azúcares, grupos 15 acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glicosilación, oxidación de la cadena lateral, o fosforilación; siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos como se describe en el presente documento. Se puede 20 llevar a cabo estos tipos de modificaciones para conferirle funciones adicionales (por ejemplo, función direccional y función de liberación) o estabilizar al polipéptido.

Por ejemplo, para incrementar la estabilidad *in vivo* de un polipéptido, es conocido en la técnica la introducción de 25 aminoácidos D, miméticos de aminoácidos o aminoácidos no naturales; este concepto puede ser igualmente adoptado para los presentes polipéptidos. La estabilidad de un polipéptido puede ser experimentada de varias formas. Por ejemplo, las

peptidasas y varios medios biológicos, tales como el plasma y el suero humano, pueden ser utilizado para evaluar la estabilidad (véase, por ejemplo, Verhoef y colaboradores, Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

5 Además, conforme se mencionó anteriormente, entre los péptidos modificados que son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos por uno, dos o varios residuos de aminoácidos, los que presentan una actividad igual o superior comparada con los péptidos originales pueden ser evaluados o
10 seleccionados. La presente invención, en consecuencia, igualmente proporciona el método de evaluación o selección de los péptidos modificados que presentan una actividad igual o superior comparada con los originales. Por ejemplo, el método puede incluir los siguientes pasos:

15 a: la sustitución, eliminación, inserción o adición de al menos un residuo de aminoácido de un péptido de la presente invención,

 b: la determinación de la actividad del péptido, y

 c: la selección del péptido que tiene una actividad
20 igual o superior comparada con la original.

 En el presente documento, la actividad puede incluir actividad de acoplamiento de MHC, APC o la capacidad de inducción de los CTL y la actividad citotóxica.

 Cuando los péptidos de la presente invención incluyen un
25 residuo de cisteína, los péptidos tienden a formar dímeros por medio de un enlace disulfuro entre grupos SH de los residuos de cisteína. Por lo tanto, los dímeros de péptido de la presente invención también son incluidos en los péptidos

de la presente invención.

III. Preparación de los péptidos TOMM34

Los péptidos de la presente invención pueden ser
5 preparados utilizando técnicas bien conocidas. Por ejemplo,
los péptidos pueden ser preparados de forma sintética, por
medio de la tecnología de ADN recombinante o síntesis
química. Los péptidos de la presente invención pueden ser
sintetizados individualmente o como polipéptidos más largos,
10 incluyendo dos o más péptidos. Los péptidos pueden ser
aislados, es decir, purificados o aislados sustancialmente
libres de otras proteínas de la célula hospedera de aparición
natural y fragmentos de los mismos, o de cualquiera de otras
sustancias químicas.

15 Los péptidos de la presente invención pueden contener
modificaciones, tales como glicosilación, oxidación de la
cadena lateral, o fosforilación, con la salvedad que estas
modificaciones no destruyan la actividad biológica de los
péptidos originales. Otras modificaciones ilustrativas
20 incluyen la incorporación de aminoácidos D u otros
miméticos de aminoácidos que pueden ser utilizados, por
ejemplo, para incrementar la vida media sérica de los
péptidos.

Un péptido de la presente invención puede obtenerse a
25 través de la síntesis química basada en la secuencia de
aminoácidos seleccionada. Por ejemplo, los métodos de
síntesis de péptidos convencionales que pueden ser adoptados
para la síntesis incluyen:

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Pres, New York, 1976;
- (iii) Peptide Synthesis (en Japonés), Maruzen Co., 1975;
- 5 (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (en Japonés), Maruzen Co., 1985;
- (v) Development of Pharmaceuticals (segundo volumen) (en Japonés), Vol. 14 (síntesis peptídica), Hirokawa, 1991;
- (vi) WO99/67288; y
- 10 (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Pres, New York, 1980, 100-118.

Alternativamente, los presentes péptidos pueden ser obtenidos adoptando cualquiera de los métodos de ingeniería genética conocidos para la producción de péptidos (por ejemplo, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtis & Curtis, Methods in Enzymology (eds. Wu y colaboradores.) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, primero, se prepara un vector adecuado que hospeda un polinucleótido que codifica el péptido objetivo en una forma expresable (por ejemplo, corriente abajo de una secuencia regulatoria correspondiente a una secuencia promotora) y es transformado en una célula hospedera adecuada. Tales vectores y células hospederas se proporcionan igualmente en la presente invención. La célula hospedera es posteriormente cultivada para producir el péptido de interés. El péptido puede ser también producido *in vitro* adoptando un sistema de translación *in*

vitro.

IV. Polinucleótidos

5 La presente invención proporciona polinucleótidos que
codifican cualquiera de los péptidos mencionados con
anterioridad de la presente invención. Estos incluyen los
polinucleótidos derivados del gen TOMM34 de aparición natural
(por ejemplo, SEQ ID NO: 42 (No. de Acceso al GenBank
10 NM_006809)) y aquellos que tienen una secuencia de
nucleótidos modificada de forma conservativa de los mismos.
En el presente documento, la frase "secuencia de nucleótidos
modificada de forma conservativa" se refiere a secuencias que
codifican una secuencia de aminoácidos idéntica o
15 esencialmente idéntica. 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 al aminoácido
alanina. Por ende, en cualquier posición donde se especifique
20 una alanina por un codón, el codón puede ser alterado hasta
cualquiera de los codones correspondientes descritos sin
alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones del
ácido nucleico son "variaciones silentes", que son una
especie de las variaciones conservadoramente modificadas.
25 Cada secuencia de ácido nucleico descrita en el presente
documento que codifica un péptido igualmente describe cada
variación silente posible del ácido nucleico. Alguien de
experiencia ordinaria en la técnica reconocerá que cada codón

000047

en un ácido nucleico (excepto AUG, que es de forma ordinaria el único codón para la metionina, y TGG, que es de forma ordinaria el único codón para el triptófano) puede ser modificado para conseguir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silente de un ácido nucleico que codifica un péptido se describe de forma implícita en cada secuencia descrita.

El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto de ADN, ARN, y derivados de los mismos. Como es bien conocido en la técnica, una molécula de ADN está compuesta de bases tales como las bases de aparición natural A, T, C, y G, y T es reemplazada por U en un ARN. Los expertos reconocerán que las bases de aparición no natural se incluyan igualmente en los polinucleótidos.

El polinucleótido de la presente invención puede codificar múltiples péptidos de la presente invención, con o sin la intervención de secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos intermedia puede proporcionar un sitio de división (por ejemplo, secuencia de reconocimiento de la enzima) del polinucleótido o los péptidos convertidos. Adicionalmente, el polinucleótido puede incluir cualquiera de las secuencias adicionales a la secuencia de codificación que codifica el péptido de la presente invención. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido recombinante que incluye secuencias regulatorias requeridas para la expresión del péptido o puede ser un vector de expresión (plásmido) con genes marcadores y similares. En general, estos polinucleótidos recombinantes

pueden ser preparados por medio de la manipulación de polinucleótidos a través de técnicas recombinantes convencionales que utilizan, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

5 Tanto las técnicas químicas de síntesis como las recombinantes pueden ser utilizadas para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, un polinucleótido puede ser producido por la inserción en un vector apropiado, que puede ser expresado cuando es
10 transfectado en una célula competente. Alternativamente, un polinucleótido puede ser ampliado utilizando técnicas de PCR o por medio de la expresión en huéspedes adecuados (véase, por ejemplo, Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York,
15 1989). Alternativamente, un polinucleótido puede ser sintetizado utilizando las técnicas de fase sólida, como se describe en Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes y colaboradores, EMBO J 1984, 3: 801-5.

20 V. Exosomas

La presente invención adicionalmente proporciona vesículas intracelulares, denominadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de la presente invención y los antígenos HLA sobre su superficie. Los
25 exosomas pueden ser preparados, por ejemplo, utilizando los métodos detallados en las Publicaciones Kohyo de las Solicitudes de Patente Japonesa No. Hei 11-510507 y W099/03499, y pueden ser preparados utilizando las APCs

obtenidas a partir de los pacientes sometidos a tratamiento y/o prevención. Los exosomas de la presente invención pueden ser inoculados en la forma de vacunas, de forma similar a los péptidos de la presente invención.

5 El tipo de antígenos HLA incluidos en los complejos debe coincidir con el del sujeto que requiere tratamiento y/o prevención. Por ejemplo, para los Japoneses, HLA-A2, en particular HLA-A*0201 y HLA-A*0206, son totalmente prevalentes y por lo tanto serían apropiados para tratamiento
10 de pacientes Japoneses. El uso del tipo HLA-A2 que es altamente expresado entre las poblaciones Japonesas y Caucásicas resulta favorable en términos de la obtención de resultados efectivos y los subtipos tal como HLA-A*0201 y HLA-A*0206 encuentra utilidad. Típicamente, en la clínica, se
15 investiga el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento de forma anticipada, lo que permite una selección apropiada de los péptidos que tienen altos niveles de afinidad de acoplamiento con este antígeno, o que tienen la capacidad de inducir a los CTL por medio de la presentación
20 del antígeno. Adicionalmente, con objeto de obtener péptidos que muestran una alta afinidad de acoplamiento y capacidad de inducción de los CTL, se puede llevar a cabo la sustitución, eliminación, inserción o adición de uno, dos o varios aminoácidos, en función de la secuencia de aminoácidos del
25 péptido parcial TOMM34 de aparición natural.

Cuando el exosoma de la presente invención posee tipo HLA-A2 como un antígeno HLA, los péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 1,

000050

5, 31 y 32 tienen utilidad particular.

VI. Células que presentan antígeno (APCs)

La presente invención igualmente proporciona las células
5 que presentan antígeno (APCs) aisladas que están presentes
complejos formados con los antígenos HLA y los péptidos de la
presente invención sobre su superficie. Las APCs pueden ser
derivadas de pacientes sometidos a tratamiento y/o
prevención, y pueden ser administradas en la forma de vacunas
10 solas o en combinación con otras fármacos, incluyendo los
péptidos de la presente invención, los exosomas, o los CTLs.

Las APCs no se limitan a un tipo en particular de
células. Los ejemplos de APCs incluyen pero no se limitan a,
células dendríticas (DCs), las células tipo Langerhans, los
15 macrófagos, las células B y las células T activadas, las
cuales se sabe presentan antígenos proteínicos sobre su
superficie celular de forma tal de ser reconocidos por los
linfocitos. Dado que las DCs son APCs representativas que
tienen la acción inductora CTL más fuerte entre las APCs, las
20 DCs encuentran utilidad en la forma de las APCs de la
presente invención.

Por ejemplo, las APCs de la presente invención pueden
ser obtenidas por medio de la inducción de DCs a partir de
los monocitos de la sangre periférica, poniéndolos en
25 contacto posteriormente (estimulando) con los péptidos de la
invención *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Cuando se administran
los péptidos de esta invención a los sujetos, se inducen las
APCs que presentan los péptidos de la presente invención en

el cuerpo del sujeto. La frase "inducir una APC" incluye poner en contacto (estimular) una célula con el péptido de la presente invención, o introducir un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención en una célula para presentar un complejo formado entre el antígeno HLA y el péptido de la presente invención sobre la superficie celular. En consecuencia, las APCs de esta invención pueden ser obtenidas recolectando las APCs del sujeto luego de la administración de los péptidos de esta invención al sujeto. Alternativamente, las APCs de esta invención pueden ser obtenidas poniendo en contacto las APCs recolectadas de un sujeto con el péptido de esta invención.

Las APCs de la presente invención pueden ser administradas a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria en contra del cáncer en el sujeto, sola o en combinación con otros fármacos incluyendo los péptidos, exosomas o los CTLs de la presente invención. Por ejemplo, la administración ex vivo puede incluir los siguientes pasos:

- a: la recolección de las APCs del un primer sujeto,
- b: el contacto con las APCs del paso a, con el péptido,
- y
- c: la administración de las APCs del paso b a un segundo sujeto.

El primer y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo, o pueden ser individuos diferentes. Las APCs obtenidas de conformidad con el paso b pueden ser servir como una vacuna para el tratamiento y/o prevención del cáncer, los ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, AML,

CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave.

5 En el contexto de la presente invención, se pueden utilizar los péptidos de la presente invención para fabricar una composición farmacéutica capaz de inducir células que presentan antígeno. Se proporciona un método o proceso para fabricar una composición farmacéutica para inducir células
10 que presentan antígeno en la presente y preferiblemente incluir la etapa de mezclar o formular el péptido de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable. La presente invención igualmente se proporciona para el uso de los péptidos de la presente invención para inducir células
15 que presentan antígeno.

 De acuerdo a un aspecto de la presente invención, las APCs de la presente invención tienen un alto nivel de capacidad de inducción de los CTL. En la frase "alto nivel de capacidad de inducción de los CTL", el "alto nivel" significa
20 que la capacidad de inducción de los CTL es relativamente alta como se compara con el nivel de aquel detectado en las APCs contactadas con no péptidos. Las APCs que tienen un alto nivel de capacidad de inducción de los CTL pueden ser preparadas utilizando un método que incluye el paso de la
25 transferencia de un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención a las APCs *in vitro*, así como también el método mencionado anteriormente. Los polinucleótidos introducidos pueden encontrarse en la forma de ADNs o ARNs.

Los ejemplos de los métodos de introducción, incluyen sin limitaciones particulares, diversos métodos convencionalmente llevados a cabo en este campo, tales como la lipofección, la electroporación y se puede utilizar el método que utiliza fosfato de calcio. Más específicamente, este puede ser llevado a cabo tal como se describe en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; Traducción de la Publicación Internacional Japonesa No. 2000-509281. Por medio de la transferencia el gen que codifica el péptido de la presente invención en las APCs, el gen experimenta transcripción, traslación y similares en la célula, y luego se procesa la proteína obtenida por MHC Clase I o Clase II y se procede a través de una vía de presentación para presentar los péptido de la presente invención.

Alternativamente, las APCs de la presente invención pueden prepararse por un método que incluye la etapa de poner en contacto APCs con el péptido de la presente invención. En algunas aplicaciones, las APCs de la presente invención presentan complejos del antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre su superficie.

VII. Linfocitos T citotóxicos (CTLs)

Un CTL inducido contra cualquiera de los péptidos de la presente invención refuerza la respuesta inmunológica dirigida a las células cancerosas *in vivo* y por ende puede ser utilizado en la forma de vacunas similares a los péptidos. Por ende, la presente invención proporciona CTLs aislados que son específicamente inducidos o activados a

través de cualquiera de los presentes péptidos.

Estos CTLs pueden ser obtenidos por (1) la administración de los péptidos de la presente invención a un sujeto, o (2) por medio del contacto de (estimulando) las APCs derivadas del sujeto, y las células CD8-positivas, o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con los péptidos de la presente invención o (3) por medio del contacto de células CD8-positivas o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con las APCs o exosomas que presenten un complejo de un antígeno HLA y el péptido sobre su superficie, o (4) a través de la introducción de un polinucleótido/polinucleótidos que codifican las subunidades del receptor de célula T (TCR), en donde el TCR formado por tales subunidades TCR es capaz de enlazar a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de esta invención sobre su superficie. Estas APCs o exosomas pueden ser preparados por el método (3) por los métodos descritos anteriormente. Los detalles del método (4) están descritos más adelante en la sección "VIII. Receptor de célula T (TCR)".

Los CTLs de la presente invención pueden ser derivados de pacientes sometidos a tratamiento y/o prevención, y pueden ser administrados solos o en combinación con otras fármacos incluyendo los péptidos de la presente invención o exosomas con el propósito de regular los efectos. Los CTLs obtenidos actúan específicamente contra las células objetivo que presentan los péptidos de esta invención, por ejemplo, los mismos péptidos utilizados en la inducción. Las células objetivo pueden ser células que expresan de forma endógena a

TOMM34, tales como las células cancerosas, o células que son transfectadas con el gen TOMM34; y las células que presentan un péptido de esta invención sobre la superficie celular debido a la estimulación con el péptido pueden ser igualmente
5 utilizadas como objetivos del ataque de los CTL activados.

En algunas modalidades, los CTLs de la presente invención son CTLs que reconocen células que presentan complejos del antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre su superficie. En el contexto del CTL, la
10 frase "reconoce una célula" se refiere a enlazar un complejo del antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre la superficie celular por medio de su TCR y muestra actividad citotóxica específica contra la célula. En la presente, "actividad citotóxica específica" se refiere para
15 mostrar actividad citotóxica contra la célula que presenta un complejo del antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención pero no otras células.

VIII. Receptor de células T (TCR)

20 La presente invención igualmente proporciona una composición incluyendo polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de células T (TCR), y los métodos de que utiliza el mismo. Las subunidades TCR tienen la habilidad
25 de formar TCRs que confieren especificidad a las células T contra las células tumorales que presentan TOMM34. Utilizando los métodos conocidos en la técnica, pueden identificarse los polinucleótidos que codifican cada una de las cadenas alfa y

000056

beta de las subunidades TCR del CTL inducido con los péptidos de esta invención (WO2007/032255 y Morgan y colaboradores, J Immunol, 171, 3288 (2003)). Por ejemplo, el método PCR es ideal para analizar el TCR. Los cebadores PCR para el análisis pueden ser, por ejemplo, cebadores 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (SEQ ID NO: 43) como un cebador lateral 5' y cebadores 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID NO: 44) específicos para la región C de la cadena alfa de TCR, cebadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (SEQ ID NO: 45) específicos para la región C1 de la cadena beta de TCR o cebadores 3-TRbeta-C2 (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3') (SEQ ID NO: 46) específicos para la región C2 de la cadena beta de TCR como cebadores laterales 3', pero sin limitarse a los mismos. Los derivados TCRs pueden unir células objetivo que presentan el péptido TOMM34 de la presente invención con alta avidéz, y opcionalmente mediar eficientemente la muerte de células objetivo que presentan el péptido TOMM34 de la presente invención *in vivo* e *in vitro*.

El polinucleótido/polinucleótidos que codifican las subunidades TCR (esto es, el polinucleótido que codifica tanto las subunidades TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades TCR) pueden ser incorporados en vectores adecuados, por ejemplo, vectores retrovirales. Estos vectores son bien conocidos en la técnica. Los polinucleótidos o los vectores incluyéndolos, pueden ser transferidos de forma útil en una célula T (por ejemplo, célula T CD8-positiva), por ejemplo, una célula T de un

000057

paciente. Ventajosamente, la presente invención proporciona una composición en existencia que permite una rápida modificación de las células T propias de un paciente (o aquellas de otros mamíferos) para rápida y fácilmente producir células T modificadas con excelentes propiedades aniquiladoras de las células cancerosas.

El TCR específico contra el péptido de la presente invención es un receptor capaz de reconocer específicamente un complejo del péptido de la presente invención y una molécula de HLA, dando una actividad específica de una célula T en contra de la célula objetivo que presenta un complejo del péptido de la presente invención y un antígeno HLA cuando el TCR es expresado sobre la superficie de la célula T. Se puede confirmar por cualquiera de los métodos conocidos que los CTLs preparados al introducir los polipéptidos que codifican tales subunidades TCR pueden reconocer específicamente tales células objetivo. Los ejemplos preferidos de tales métodos incluyen, por ejemplo análisis de tetrámero usando molécula HLA y el péptidos de la presente invención, y el experimento ELISPOT. Por el experimento ELISPOT, se puede confirmar que un CTL preparado por el método como se describe arriba puede reconocer específicamente las células objetivo, y que las señales generadas por tal reconocimiento puede transmitirse intracelularmente. Adicionalmente, puede confirmarse por los métodos conocidos que los CTLs preparados por el método descrito arriba tienen actividad citotóxica específica contra las células objetivo. Los ejemplos de tales métodos incluyen,

por ejemplo, ensayo de liberación de cromo usando células que expresan tanto el antígeno HLA-A2 como TOMM34.

En un aspecto, la presente invención proporciona CTLs que son preparados por transducción con el
5 polinucleótido/polinucleótidos que codifican a los polipéptidos de la subunidad TCR (esto es, el polinucleótido que codifica ambas de las subunidades TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades TCR), en donde el TCR formado por tales subunidades TCR puede enlazar a un
10 complejo del péptido TOMM34 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NOs: 1, 5, 31 y 32 y antígeno HLA-A2 sobre la superficie.

Los CTLs convertidos son capaces de alojar a las células cancerosas *in vivo*, y pueden ser expandidos por métodos de
15 cultivo *in vitro* ampliamente conocidos (por ejemplo, Kawakami y colaboradores, J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Los CTLs de la presente invención pueden ser utilizados para formar una composición inmunogénica útil en ya sea o tanto en el tratamiento como la prevención del cáncer en un paciente que
20 tiene la necesidad de terapia o protección (WO2006/031221).

IX. Agentes o composiciones farmacéuticas

Dado que la expresión de TOMM34 está específicamente elevada en el cáncer, los ejemplos de los cuales incluyen,
25 pero no se limitan a AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave. en comparación

con el tejido normal, los péptidos o polinucleótidos de la presente invención pueden ser utilizados en el tratamiento y/o profilaxis del cáncer y/o la prevención de la recurrencia post-operatoria de los mismos. Por ende, la presente
5 invención proporciona un agente o composición farmacéutica formulada para el tratamiento y/o la profilaxis y/o del cáncer, y/o para la prevención de la recurrencia post-operatoria del mismo, tal agente o composición que incluye como un ingrediente activo uno o más de los péptidos, o
10 polinucleótidos de esta invención en la forma de un ingrediente activo. Alternativamente, los presentes péptidos pueden ser expresados sobre la superficie de cualquier de los exosomas o células que anteceden, tales como las APCs para ser utilizadas como agentes o composiciones farmacéuticas.
15 Adicionalmente, los CTLs mencionados con anterioridad cuyo objetivo es cualquiera de los péptidos de la presente invención, pueden ser igualmente utilizados como el ingrediente activo de los presentes agentes o composiciones farmacéuticas.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se utilizan en la forma de una vacuna. En el contexto de la presente invención, la frase "vacuna" (igualmente denominada como una "composición inmunogénica") se refiere a una composición que tiene la función de mejorar, aumentar y/o
25 inducir la inmunidad anti-tumoral luego de su inoculación en animales.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser utilizados para tratar y/o prevenir cánceres, y/o

000060

para la prevención de la recurrencia post-operatoria de los mismos, en sujetos o pacientes incluyendo el ser humano y cualquier otro mamífero incluyendo, pero sin limitarse a, ratón, rata, conejillo de indias, conejo, gato, perro, oveja, 5 cabra, cerdo, ganado, caballo, mono, mandril, y chimpancé, particularmente un animal comercialmente importante o un animal domesticado.

En otra modalidad, la presente invención proporciona también la utilización de un ingrediente activo en la 10 elaboración de un agente o composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer o tumor, dicho ingrediente activo seleccionado a de entre:

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica tal péptido como está 15 descrito en el presente documento en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y
- (d) una célula T citotóxica de la presente invención.

Alternativamente, la presente invención proporciona 20 además un ingrediente activo para ser utilizado en el tratamiento y/o prevención de los cánceres o tumores, el ingrediente activo seleccionado de entre:

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica tal péptido como está 25 descrito en el presente documento en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y
- (d) una célula T citotóxica de la presente invención.

Alternativamente, la presente invención adicionalmente proporciona un método o proceso para la elaboración de un agente o composición farmacéutica para el tratamiento o prevención del cáncer o tumor, en donde el método o proceso incluye el paso de formular un portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable con un ingrediente activo seleccionado a partir de:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un ácido nucleico que codifica estos péptidos como está descrito en el presente documento en una forma expresable;

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

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

En otra modalidad, la presente invención igualmente proporciona un método o proceso para la elaboración de un agente o composición farmacéutica para el tratamiento o prevención del cáncer o tumor, en donde el método o proceso incluye los pasos de combinación de un ingrediente activo con un portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable, en donde el ingrediente activo es seleccionado de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

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

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

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

Los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente

000062

invención pueden usarse para tratar y/o prevenir cáncer, y/o para prevenir una recurrencia post-operativa del mismo en sujetos o pacientes incluyendo humano y cualquier otro mamífero incluyendo, pero no limitado a, ratón, rata, conejillo de indias, conejo, gato, perro, oveja, cabra, cerdo, ganado, caballo, mono, mandril, y chimpancé, particularmente un animal comercialmente importante o un animal domesticado.

De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que los péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 5, 31 y 32 son péptidos de epítipo restringidos HLA-A2 o los candidatos que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica. En consecuencia, los presentes agentes o composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de estos péptidos con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1, 5, 31 y 32 son particularmente adecuados para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Lo mismo aplica para agentes o composiciones farmacéuticas que incluyen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de esta invención).

Los cánceres a ser tratados con los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención no se limitan e incluyen cualquier cáncer en el cual el TOMM34 esté involucrado (por ejemplo, se sobreexpresa), incluyendo, pero no limitado a, AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma

000063

renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave.

Los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener, además de los ingredientes activos mencionados con anterioridad, otros péptidos que tienen la
5 capacidad de inducir los CTLs en contra de las células cancerosas, otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, o estos. Los ejemplos de tales "otros" péptidos que tienen la capacidad de inducir los CTLs en contra de las células
10 cancerosas incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos del cáncer (por ejemplo, TAAs identificados).

De ser necesario, los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden opcionalmente incluir otras sustancias terapéuticas en la forma de un
15 ingrediente activo, siempre que la sustancia no inhiba el efecto antitumoral del ingrediente activo, por ejemplo, cualquiera de los presentes péptidos. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir sustancias o composiciones anti-inflamatorias, analgésicos, quimioterapias, y similares.
20 Además de incluir otras sustancias terapéuticas en el medicamento por sí mismo, los medicamentos de la presente invención pueden ser igualmente administrados de forma única o secuencial con una o más de otras composiciones farmacológicas. Las cantidades de medicamento y composición
25 farmacológica dependen de, por ejemplo, que tipo de composiciones farmacológicas son utilizadas, la enfermedad que está siendo tratada, y los horarios y vías de administración.

000004

Aquellos de experiencia en la técnica fácilmente reconocerán que, además de los ingredientes en particularmente mencionados en el presente documento, los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente
5 invención pueden incluir otras sustancias convencionales en la técnica que se relacionen con el tipo de formulación en cuestión (por ejemplo, rellenos, aglutinantes, diluyentes, etc.)

En una modalidad de la presente invención, los presentes
10 agentes o composiciones farmacéuticas pueden ser empacadas en artículos de elaboración, por ejemplo, como kits que contienen materiales útiles para el tratamiento las condiciones patológicas de la enfermedad a ser tratada, por ejemplo, el cáncer. El artículo de elaboración puede incluir
15 un recipiente de cualquier de los presentes agentes o composiciones farmacéuticas con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen botellas, ampollas, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta en el
20 recipiente debe indicar el agente o composición utilizada para el tratamiento o la prevención de una o más condiciones de la enfermedad. La etiqueta puede indicar igualmente las direcciones para su administración y similares.

Además del recipiente anteriormente descrito, un kit que
25 incluya un agente o composición farmacéutica de la presente invención puede opcional y adicionalmente incluir un segundo recipiente de contención de un diluyente farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente se pueden incluir otros materiales

000065

adecuados desde el punto de vista comercial y de su utilización, lo que incluye otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas, inyectoras e inserciones en el empaque con las instrucciones de uso.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden, si se desea, ser presentadas en la forma de un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más unidades de formas de dosificación que contienen el ingrediente activo. El paquete puede, por ejemplo, incluir una lámina metálica o
10 plástica, tal como un paquete tipo blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede estar acompañado por las instrucciones para la administración.

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

Los péptidos de esta invención pueden ser administrados directamente en la forma de un agente o composición farmacéutica, o en caso que se considere necesario, puede ser formulada a través de los métodos de formulación
20 convencionales. En el último caso, además de los péptidos de esta invención, pueden incluirse como apropiados, portadores, excipientes y los que son utilizados de forma ordinaria para las fármacos, sin limitaciones particulares. Los ejemplos de estos portadores son agua estéril, solución fisiológica
25 salina, solución amortiguadora de fosfato, fluidos de cultivo y similares. Adicionalmente, los agentes o composiciones farmacéuticas pueden contener si se considera necesario, estabilizantes, suspensiones, preservativos, tensoactivos y

000066

similares. Los agentes o composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser utilizados para propósitos anticancerosos.

Los péptidos de la presente invención pueden ser
5 preparados en combinación, lo que incluye dos o más de los
péptidos de la presente invención, para inducir a CTL *in*
vivo. Los péptidos pueden encontrarse en la forma de un
coctel o pueden ser conjugados entre sí utilizando técnicas
convencionales. Por ejemplo, los péptidos pueden ser
10 químicamente enlazados o expresados como una secuencia de
polipéptidos de fusión sencilla que puede tener uno o varios
aminoácidos en la forma de una ligadura (por ejemplo,
ligadura de Lisina: K. S. Kawamura y colaboradores. J.
Immunol. 2002, 168: 5709-5715). Los péptidos en la
15 combinación pueden ser los mismos o diferentes. Mediante la
administración de los péptidos de esta invención, los
presentan se presentan en una alta densidad por los antígenos
HLA sobre las APCs, entonces son inducidos los CTLs que
reaccionan específicamente en dirección al complejo formado
20 entre el péptido desplegado y el antígeno HLA.
Alternativamente, las APCs (por ejemplo, DCs) son removidos
de los sujetos y posteriormente son estimulados por los
péptidos de la presente invención, para obtener las APCs que
presentan cualquiera de los péptidos de esta invención sobre
25 su superficie celular. Estas APCs son nuevamente
administradas a los sujetos, para inducir los CTLs en los
sujetos y, como un resultado, pueden aumentar la agresividad
hacia los tumores asociados con el endotelio.

000067

Los agentes o composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que incluyen cualquiera de los péptidos de esta invención como el ingrediente activo, pueden igualmente incluir un adyuvante de forma tal que se establecerá efectivamente la inmunidad celular, o pueden ser administradas con otros ingredientes activos, y pueden ser administradas por formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a un compuesto que mejora la respuesta inmunitaria en contra de la proteína cuando se administra conjuntamente (o sucesivamente) con la proteína que tiene la actividad inmunológica. Un adyuvante que puede ser aplicado incluye aquellos descritos en la literatura (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Los adyuvantes ejemplares incluyen fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina de cólera, toxina de salmonella, adyuvante incompleto de Freund (IFA), adyuvante completo de Freund (CFA), ISCOMatrix, GM-CSF, CpG, O/W emulsión, y similares, pero sin limitarse a los mismos.

Adicionalmente, las formulaciones de liposomas, formulaciones granulares en las cuales el péptido está unido a microesferas de unos pocos micrómetros de diámetro, y las formulaciones en las cuales un lípido está unido al péptido pueden ser utilizadas convenientemente.

En otra modalidad de la presente invención, los péptidos de la presente invención pueden ser igualmente administrados en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos preferidos de las sales incluyen sales con un metal alcalino, sales con un metal, sales con una base orgánica,

sales con un ácido orgánico y sales con un ácido inorgánico. Como se usa en la presente, la frase "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que mantienen la efectividad biológica y propiedades del compuesto y que se obtienen por reacción con bases o ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares.

10 En algunas modalidades, los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir además un componente que ceba al CTL. Los lípidos han sido identificados como sustancias o composiciones capaces de cebar el CTL *in vivo* en contra de antígenos virales. Por ejemplo, los residuos de ácido palmítico pueden ser ligados a la épsilon y a los grupos alfa aminos de un residuo de lisina y posteriormente enlazados a un péptido de la presente invención. El péptido lipidado puede ser luego administrado ya sea directamente en una micela o partícula, incorporado en un liposoma, o emulsificado en un adyuvante. Como otro ejemplo del cebado lipídico de las respuestas del CTL, se pueden utilizar lipoproteínas de *E. coli*, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS) para cebar el CTL cuando se liga de forma covalente a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres y colaboradores, Nature 25 1989, 342: 561-4).

Los ejemplos de métodos adecuados de administración incluyen, pero no se limitan necesariamente a, administración

oral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraósea, peritoneal, e intravenosa, o similares, y administración sistémica o administración local en la vecindad de los sitios objetivo. La administración puede ser llevada a cabo mediante
5 administración individual o reforzada por múltiples administraciones. Se puede ajustar la dosis de los péptidos de esta invención de forma apropiada de acuerdo con la enfermedad a ser tratada, la edad del paciente, el peso, el método de administración y similares y habitualmente se ubica
10 entre 0.001 mg y 1.000 mg, por ejemplo, 0.01 mg hasta 100 mg, por ejemplo, 0.1 mg hasta 10 mg, por ejemplo, 0.5 mg hasta 5mg, y puede ser administrada una vez durante entre unos días y hasta unos meses. Aquellos con experiencia en esta técnica podrán apropiadamente seleccionar la dosis adecuada.

15

(2) Agentes o composiciones farmacéuticas que contiene polinucleótidos como el ingrediente activo

Los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden igualmente incluir ácidos nucleicos que
20 codifican a los péptidos descritos en el presente documento, en una forma expresable. En el presente documento, la frase "en una forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando es introducido en una célula, se expresará *in vivo* en la forma de un polipéptido que induce inmunidad anti-tumoral.
25 En una aplicación ejemplificada, la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido de interés incluye elementos regulatorios necesarios para la expresión del polinucleótido. Los polinucleótidos pueden ser equipados con el objeto de

000070

lograr una inserción estable en el genoma de la célula objetivo (véase, por ejemplo, Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 para una descripción de los vectores casete de recombinación homóloga). Véase igualmente, por ejemplo, 5 Wolff y colaboradores, Science 1990, 247: 1465-8; las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; y WO 98/04720. Los ejemplos de tecnologías de liberación basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", facilitado (bupivacaína, 10 polímeros, mediados por péptidos) liberación, complejos lipídicos catiónicos, y mediado por partículas ("pistola genética") o liberación mediada por presión (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de América No. 5,922,687).

15 Los péptidos de la presente invención pueden ser igualmente expresados por vectores virales o bacterianos. Los ejemplos de vectores de expresión incluyen los huéspedes virales atenuados, tales como de vacuna o viruela aviar. Este enfoque involucra la utilización de una vacuna viral, por 20 ejemplo, como un vector para expresar secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. Luego de su introducción en un huésped, la vacuna recombinante viral expresa al péptido inmunogénico y en consecuencia produce una respuesta inmunitaria. Los vectores de vacuna y los métodos 25 útiles en los protocolos de inmunización están descritos en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de América No. 4,722,848. Otro vector es BCG (Bacille Calmette Guérin). Los vectores BCG están descritos en Stover y colaboradores,

000071

Nature 1991, 351: 456-60. Serán aparentes una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o inmunización, por ejemplo, adenovectores y vectores adenovirales, vectores retrovirales, vectores de *Salmonella typhi*, vectores de toxina ántrax destoxificada, y similares. Véase, por ejemplo, Shata y colaboradores, Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock y colaboradores, J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hip y colaboradores, En Vivo 2000, 14: 571-85.

La liberación de un polinucleótido en un paciente puede ser sea directa, caso en el cual el paciente es directamente expuesto a un vector portador de un polinucleótido, o indirecta, caso en el cual, las células se transforman primero con el polinucleótido de interés *in vitro*, entonces las células son trasplantadas en el paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapias génicas *in vivo* y *ex vivo*.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel y colaboradores, 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). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante que son aplicables a la presente invención están descritos por Ausubel y colaboradores, en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; y Krieger, en Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990.

La administración similar de péptidos, puede realizarse la administración de polinucleótidos oral, intradérmica, subcutánea, intraósea, peritoneal y/o inyección intravenosa, o similares, por ejemplo la administración sistémica o la administración local encuentra utilidad en las cercanías de los sitios objetivo. La administración puede ser llevada a cabo mediante administración individual o reforzada por múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el portador adecuado o en las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de esta invención, pueden ser ajustadas de forma apropiada de acuerdo con la enfermedad a ser tratada, la edad del paciente, el peso, el método de administración y similares, y de forma ordinaria está entre 0.001 mg y 1000 mg, por ejemplo, 0.001 mg y 100 mg, por ejemplo, 0.1 mg y 10 mg, por ejemplo, 0.5 mg hasta 5 mg, y puede ser administrada una vez cada pocos días hasta una vez cada pocos meses. Los expertos en la técnica pueden seleccionar de forma apropiada las dosis adecuadas.

20 X. Métodos que utilizan los péptidos, los exosomas, las APCs y los CTLs

Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención pueden ser utilizados para la preparación o inducción de las APCs y los CTLs. Los exosomas y las APCs de la presente invención pueden ser igualmente utilizados para inducir los CTLs. Los péptidos, polinucleótidos, exosomas y las APCs pueden ser utilizados en combinación con cualquiera de otros compuestos siempre que los compuestos adicionales no inhiban

000073

su capacidad de inducción de los CTL. Por ende, cualquiera de los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención mencionados con anterioridad pueden ser utilizados para inducir los CTLs. Adicionalmente, se pueden igualmente
5 utilizar aquellos que incluyen los péptidos y polinucleótidos para inducir las APCs tal como se explica más adelante.

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

La presente invención proporciona métodos para inducir
10 las APCs con alta capacidad de inducción de los CTL, que utilizan los péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

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

a: la recolección de las APCs de un sujeto; y

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

Las APCs no están limitadas a un tipo particular de células. Los ejemplos de APCs incluyen, pero no se limitan a, DCs, células tipo Langerhans, macrófagos, células B, y células T activadas, que son conocidas por presentar
25 antígenos proteínicos sobre su superficie celular, de forma tal de ser reconocido por los linfocitos. Preferiblemente, los DCs pueden ser utilizados dado que tienen la más fuerte capacidad de inducción de los CTL entre las APCs. Cualquiera

000074

de los péptidos de la presente invención pueden ser utilizados solos o con otros péptidos de esta invención.

Por otro lado, cuando los péptidos de la presente invención son administrados a un sujeto, las APCs entran en
5 contacto con los péptidos *in vivo*, consecuentemente, las APCs con alta capacidad de inducción de los CTL son inducidos en el cuerpo del sujeto. Por ende, el método de la presente invención puede incluir la administración de los péptidos de esta invención a un sujeto. De igual forma, cuando los
10 polinucleótidos de esta invención son administrados a un sujeto en una forma expresable, los péptidos de esta invención son expresados y entran en contacto con las APCs *in vivo*, consecuentemente, las APCs con alta capacidad de inducción de los CTL son inducidos en el cuerpo del sujeto.
15 Por ende, en lugar del paso antes mencionado, el método de la presente invención puede incluir la administración de los polinucleótidos de esta invención a un sujeto. La frase "forma expresable" es descrita anteriormente en la sección "IX. Agente o composiciones farmacéuticas, (2) Agentes o
20 composiciones farmacéuticas que contiene polinucleótidos como el ingrediente activo".

Alternativamente, la presente invención puede incluir la introducción del polinucleótido de esta invención en las APCs para inducir las APCs con capacidad de inducción de los CTL.
25 Por ejemplo, el método puede incluir los pasos de:

- a: la recolección de las APCs de un sujeto; y
- b: la introducción de un polinucleótido que codifica al péptido de esta invención.

000075

El paso b puede realizarse como se describe con antelación en la sección "VI. Células que presentan antígeno".

Alternativamente, la presente invención proporciona un
5 método para la preparación de una célula que presenta el antígeno (APC), que específicamente induce la actividad CTL en contra de TOMM34, donde el método puede incluir uno de los siguientes pasos:

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

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

Alternativamente, la presente invención proporciona métodos para inducir una APC que tiene capacidad de inducción
15 CTL, en donde los métodos incluyen el paso seleccionado de entre:

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

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

Los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Preferiblemente, los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo *in vitro* o *ex vivo*. Las APCs usadas para inducción de las APCs
25 que tienen capacidad de inducción de CTL pueden ser preferiblemente APCs que expresan antígeno HLA-A2. Tales APCs pueden prepararse por los métodos bien conocidos en las técnicas de células mononucleares de sangre periférica

000076

(PBMCS) obtenidas de un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2.

Las APCs inducidas por el método de la presente invención pueden ser APCs que presentan un complejo del péptido de la presente invención y antígeno HLA (antígeno HLA-A2) sobre su superficie. Cuando las APCs inducidas por el método de la presente invención se administran a un sujeto con objeto de inducir respuestas inmunitarias contra el cáncer en el sujeto, el sujeto es preferiblemente el mismo a partir del cual las APCs se derivan. Sin embargo, el sujeto puede ser uno diferente del donador APC siempre y cuando el sujeto tenga el mismo tipo HLA con el donador APC.

En otra modalidad, la presente invención proporciona agentes o composiciones para uso al inducir una APC que tiene capacidad de inducción de CTL, y tales composiciones incluyen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

En otra modalidad, la presente invención proporciona el uso del péptido de la presente invención o el polinucleótido que codifica el péptido en la fabricación de una composición formulada para inducir APCs.

Alternativamente, la presente invención proporciona además el péptido de la presente invención o el polipéptido que codifica el péptido para uso al inducir una APC que tiene capacidad de inducción del CTL.

(2) El método para inducir los CTLs

La presente invención igualmente proporciona los métodos para inducir los CTLs que utilizan los péptidos,

000077

polinucleótidos, exosomas o las APCs de esta invención.

La presente invención igualmente proporciona los métodos para inducir los CTLs que utilizan un polinucleótido/polinucleótidos que codifican polipéptidos (esto es, subunidades TCR) que son capaces de formar un receptor de célula T (TCR) que es capaz de reconocer un complejo de los péptidos de la presente invención y los antígenos HLA. Preferiblemente, los métodos para inducir los CTLs pueden incluir al menos un paso seleccionado de entre:

10 a) el contacto de una célula T CD8 positiva con una célula presentadora de antígeno y/o un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención; y

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

Cuando los péptidos, los polinucleótidos, las APCs, o los exosomas de esta invención son administrados a un sujeto, los CTLs son inducidos en el cuerpo del sujeto, y mejora la intensidad de la respuesta inmunitaria dirigida a las células cancerosas. Por ende, en lugar del paso mencionado anteriormente, los métodos de la presente invención pueden incluir el paso de la administración de los péptidos, los polinucleótidos, las APCs o exosomas de la presente invención a un sujeto.

Alternativamente, los CTLs pueden ser inducidos también

por que se utilizan ex vivo, y luego de inducir CTL, los CTLs activados pueden ser retornados al sujeto. Por ejemplo, el método puede incluir los pasos de:

a: la recolección de las APCs de un sujeto;

5 b: el contacto con las APCs del paso a, con el péptido;

y

c: el cultivo simultáneo las APCs del paso b con las células T CD8-positivas.

Las APCs a ser cultivadas en conjunto con las células T
10 CD8-positivas en el paso c que antecede pueden ser igualmente preparadas por medio de la transferencia de un gen que incluye un polinucleótido de esta invención en las APCs descritas con antelación en la sección "VI. Células presentadoras de antígeno", sin embargo, la presente
15 invención no se ve limitada en este sentido y abarca cualquiera de las APCs que están efectivamente presentes sobre la superficie de un complejo de un antígeno HLA y un péptido de esta invención.

Alguien puede opcionalmente utilizar los exosomas que
20 presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención en lugar de las APCs mencionadas anteriormente. A saber, la presente invención puede incluir el paso del cultivo simultáneo de exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA
25 y el péptido de esta invención. Estos exosomas pueden ser preparados por los métodos descritos anteriormente en la sección "V. Exosomas".

Adicionalmente, los CTLs de la presente invención pueden

000079

ser inducidos por la introducción de una célula T CD8-positiva en un polinucleótido/polinucleótidos que codifican las subunidades TCR, en donde la TCR formada por tales subunidades TCR es capaz de enlazar a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de esta invención sobre una superficie celular.. Esta transducción puede ser llevada a cabo tal como se describe con antelación en la sección "VIII. Receptor de la Célula T (TCR)".

Los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo in vitro, ex vivo o in vivo. Preferiblemente, los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo in vitro o ex vivo. Las células T CD8-positivas usadas para inducción de CTLs pueden prepararse por métodos bien conocidos en la técnica de PBMCs obtenidas de un sujeto. En modalidades preferidas, el donador para células T CD8-positivas puede ser un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Los CTLs inducidos por los métodos de la presente invención pueden ser CTLs que pueden reconocer células que presentan un complejo del péptido de la presente invención y antígeno HLA sobre su superficie. Cuando los CTLs inducidos por el método de la presente invención son administrados a un sujeto con objeto de inducir respuestas inmunitarias contra cáncer en el sujeto, el sujeto es preferiblemente el mismo a partir del cual las células T CD8-positivas se derivan. Sin embargo, el sujeto puede ser uno diferente del donador de célula T CD8-positiva siempre y cuando el sujeto tenga el mismo tipo HLA con el donador de célula T CD8-positiva.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un

000080

método o proceso para la elaboración de una composición farmacéutica para inducir los CTLs, en donde el método incluye el paso de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un portador farmacéuticamente
5 aceptable.

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

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

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

(3) Método para inducir la respuesta inmunitaria

Además, la presente invención proporciona los métodos
20 para inducir una respuesta inmunitaria en contra de las enfermedades relacionadas con TOMM34. Las enfermedades adecuadas pueden incluir el cáncer, ejemplos que incluyen, pero que no están limitados a, AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer
25 de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave.

Los métodos de la presente invención pueden incluir el

paso de la administración de agentes o composiciones que
contengan cualquiera de los péptidos de la presente invención
o los polinucleótidos que los codifican. Alternativamente, el
método de la presente invención puede incluir el paso de la
5 administración de exosomas o las APCs que presentan
cualquiera de los péptidos de la presente invención. Para los
detalles, véase el segmento de "IX. Agentes o composiciones
farmacéuticas", particularmente la parte que describe el uso
de los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente
10 invención en forma de vacunas. Adicionalmente, los exosomas y
las APCs que puede ser utilizados para los presentes métodos
con el fin de inducir la respuesta inmunitaria, están
descritos en detalle bajo los segmentos de "V. Exosomas",
"VI. Células que presentan el antígeno (APCs)", y (1) y (2)
15 de "X. Métodos que utilizan los péptidos, exosomas, las APCs
y los CTLs", *supra*.

La presente invención igualmente proporciona un método o
proceso para la elaboración de un agente o una composición
farmacéutica para inducir una respuesta inmunitaria, en donde
20 el método puede incluir el paso de la mezcla o la formulación
del péptido de la presente invención, con un portador
farmacéuticamente aceptable.

Alternativamente, el método de la presente invención
puede incluir el paso de la administración de una vacuna o
25 una composición farmacéutica de la presente invención que
contiene:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un ácido nucleico que codifica tal péptido, como

000081
000082

está descrito en el presente documento en una forma expresable;

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

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

En el contexto de la presente invención, se puede tratar un cáncer que sobre expresa a TOMM34 con estos ingredientes activos. Los ejemplos de tal cáncer incluyen, pero no se limitan a AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave. Consecuentemente, antes de llevar a cabo la administración de las vacunas o composiciones farmacéuticas que incluyen los ingredientes activos, se prefiere confirmar si el nivel de expresión de TOMM34 en las células o tejidos a ser tratados está aumentado en comparación con las células normales del mismo órgano. En consecuencia, en una aplicación, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un cáncer que (sobre) expresa a TOMM34, método éste que puede incluir los siguientes pasos:

i) la determinación del nivel de expresión de TOMM34 en las células o tejido(s) obtenidos de un sujeto con el cáncer a ser tratado;

ii) la comparación del nivel de expresión de TOMM34 con un control normal; y

iii) la administración de al menos un componente

000083

seleccionado a partir de entre (a) a (d) a un sujeto con
cáncer descrito anteriormente que sobre expresa TOMM34
comparado con un control normal.

Alternativamente, la presente invención proporciona una
5 vacuna o composición farmacéutica que incluye al menos un
componente seleccionado a partir de entre (a) hasta (d),
descrito anteriormente, para ser utilizado en la
administración a un sujeto que presenta cáncer, que sobre
expresa TOMM34. En otro palabras, la presente invención
10 adicionalmente proporciona un método para la identificación
de un sujeto a ser tratado con el polipéptido TOMM34 de la
presente invención, método éste que incluye el paso de la
determinación de un nivel de expresión de TOMM34 en las
células o tejidos derivados del sujeto, en donde un
15 incremento del nivel comparado con un nivel normal de control
del gen, indica que el sujeto puede tener cáncer que puede
ser tratado con el polipéptido TOMM34 de la presente
invención. Los métodos de tratamiento del cáncer de la
presente invención están descritos con mayores detalles más
20 adelante.

Cualquier célula o tejido derivado del sujeto puede ser
utilizado para la determinación de la expresión de TOMM34,
siempre que estos incluyan la transcripción objetiva o el
producto de la traducción de TOMM34. Los ejemplos de muestras
25 adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, tejidos y
fluidos corporales, tales como sangre, esputo y orina.
Preferiblemente, la muestra de célula o de tejido derivada
del sujeto contiene una población celular que incluye una

000084

célula epitelial, idealmente, una célula epitelial cancerosa o una célula epitelial derivada del tejido sospechoso de ser canceroso. Adicionalmente, en caso que se considere necesario, la célula puede ser purificada a partir de los tejidos y fluidos corporales obtenidos, y posteriormente utilizada como la muestra derivada del sujeto.

Un sujeto a ser tratado por el presente método es preferiblemente un mamífero. Los mamíferos ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo, el ser humano, el primate no humano, el ratón, la rata, el perro, el gato, el caballo, y la vaca.

De acuerdo a la presente invención, puede determinarse el nivel de expresión de TOMM34 en las células o tejidos obtenidos a partir de un sujeto. El nivel de expresión puede ser determinado en el nivel del producto de la transcripción (ácido nucleico), que utiliza métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARNm de TOMM34 puede ser cuantificado que utiliza sondas por medio de métodos de hibridización (por ejemplo, hibridización Northern). La detección puede ser llevada a cabo en un chip, una serie. El uso de una serie puede ser preferible para la detección del nivel de expresión de TOMM34. Aquellos expertos en la técnica pueden preparar estas sondas utilizando la información de la secuencia de TOMM34. Por ejemplo, el ADNc de TOMM34 puede ser utilizado como las sondas. De ser necesario, las mismas pueden ser marcadas con un marcador adecuado, tal como tintes, sustancias fluorescentes e isótopos y el nivel de expresión del gen puede ser detectado como la intensidad de

000085

los marcadores hibridizados.

Adicionalmente, el producto de la transcripción de TOMM34 puede ser cuantificado utilizando cebadores por métodos de detección basados en amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Estos cebadores pueden ser preparados basándose en la información disponible de la secuencia del gen.

Específicamente, una sonda o cebador utilizado en el presente método sufre hibridización bajo condiciones severas, moderadamente severas o poco severas en la forma del ARNm de TOMM34. Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "condiciones severas (hibridización)" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda o cebador hibridizará su secuencia objetivo, pero otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes bajo diferentes circunstancias. La hibridización específica de secuencias más largas es observada a temperaturas más altas que las secuencias más cortas. Generalmente, la temperatura de una condición severa es seleccionada para estar entre 5 grados C más bajo que el punto térmico de derretimiento (T_m) para una secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. El T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la cual 50% de las sondas complementarias de la secuencia objetivo sufren hibridización en la forma de la secuencia objetivo en equilibrio. Dado que las secuencias objetivos están generalmente presentes en exceso, a T_m , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio. Típicamente, se considera condiciones exigentes a aquellas en las cuales

000086

la concentración salina es inferior a alrededor de 1.0 M del ión de sodio, típicamente alrededor de entre 0.01 y 1.0 M del ión de sodio (u otras sales) a un pH de entre 7.0 y 8.3 y siendo la temperatura de al menos cerca de 30 grados C para las sondas o cebadores cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos de cerca de 60 grados C para las sondas o cebadores más largos. Las condiciones rigurosas pueden ser igualmente logradas con la adición de sustancias desestabilizadoras, tales como la formamida.

10 Una sonda o cebador de la presente invención típicamente es un oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido típicamente incluye una región de secuencia de nucleótidos que sufre hibridización bajo condiciones severas para al menos cerca de 2000, 1000, 500, 400, 350, 15 300, 250, 200, 150, 100, 50 ó 25, secuencia de nucleótido de hebra sencilla consecutiva de un ácido nucleico que incluye una secuencia TOMM34, o una secuencia de nucleótidos de hebra anti-sentido de un ácido nucleico que incluye una secuencia TOMM34, o de un mutante de aparición natural de estas 20 secuencias. En particular, por ejemplo, en una aplicación preferente, un oligonucleótido que tiene 5-50 de longitud, puede ser utilizado en la forma de un cebador para la amplificación de los genes, a ser detectados. Idealmente, el ARNm o el ADNc de un gen TOMM34 puede ser detectado con sonda 25 o cebador de un oligonucleótido de un tamaño específico, generalmente entre 15-30b de longitud. El tamaño puede estar en el intervalo desde 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 estar en el intervalo en tamaño desde 5-10 nucleótidos, 10-15 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-25 nucleótidos y 25-30 nucleótidos. En aplicaciones preferentes, la longitud de la sonda o cebador de un oligonucleótido puede ser seleccionado a partir de 15-25. Los procedimientos, dispositivos, o reactivos de ensayo para la detección del gen utilizando estas sondas o cebadores de un oligonucleótido son bien conocidos (por ejemplo una microserie de oligonucleótidos o PCR). En estos experimentos, las sondas o cebadores pueden incluir igualmente secuencias marcadoras o de enlace. Adicionalmente, las sondas o cebadores pueden ser modificados con un marcador detectable o con el ligando de afinidad a ser capturado. Alternativamente, en los procedimientos de detección basados en hibridización, puede utilizarse igualmente un polinucleótido que tiene unos pocos cientos (por ejemplo, cerca de 100-200) de bases hasta unas bases de pocos kilos (por ejemplo, cerca de 1000-2000) de longitud, para una sonda (por ejemplo, experimento northern blotting o análisis de una microserie de ADNc).

Alternativamente, el producto de la traducción puede ser detectado para el diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, puede determinarse la cantidad de proteína TOMM34 (SEQ ID NO: 42) o el fragmento inmunológico de la misma. Los métodos para la determinación de la cantidad de la proteína como el producto de la traducción incluyen los métodos de experimentos inmunológicos que utilizan un anticuerpo específico reconociendo la proteína. El anticuerpo puede ser

000088

monoclonal o policlonal. Adicionalmente, cualquier fragmento o modificación (por ejemplo, anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo puede ser utilizado para la detección, siempre que el fragmento o anticuerpo modificado
5 retenga la capacidad de acoplamiento con la proteína TOMM34. Estos anticuerpos en contra de los péptidos de la presente invención y los fragmentos de los mismos, se proporcionan igualmente en la presente invención. Los métodos para preparar estos tipos de anticuerpos para la detección de
10 proteínas, son bien conocidos en la técnica, y cualquier método puede ser empleado en la presente invención para preparar estos anticuerpos y equivalentes de los mismos.

Como otro método para detectar el nivel de expresión del gen TOMM34, basándose en su producto de la traducción, puede
15 medirse la intensidad de la coloración por medio de un análisis inmunohistoquímico que utiliza un anticuerpo en contra de la proteína TOMM34. A saber, al tomar esta medida, una fuerte coloración indica una presencia/nivel incrementado de la proteína y, al mismo tiempo, un alto nivel de expresión
20 del gen TOMM34.

Se puede determinar que el nivel de expresión de un gen objetivo, por ejemplo, el gen TOMM34, en las células cancerosas está aumentado si el nivel aumenta del nivel de control (por ejemplo, el nivel en las células normales) del
25 gen objetivo por, por ejemplo, 10%, 25%, o 50%; o aumenta hasta más de 1.1 veces, más de 1.5 veces, más de 2.0 veces, más de 5.0 veces, más de 10.0 veces o más.

En el contexto de la presente invención, un nivel de

control determinado a partir de una muestra biológica que es conocida por no ser cancerosa, es denominado como un "nivel normal de control". Por otro lado, si el nivel de control es determinado a partir de una muestra biológica cancerosa, este es denominado como a "nivel canceroso de control". La diferencia entre el nivel de expresión de una muestra y el nivel de control puede ser normalizada al nivel de expresión de los ácidos nucleicos de control, por ejemplo, genes de mantenimiento, cuyos niveles de expresión se sabe no difieren dependiendo del estado canceroso o no canceroso de la célula. Los genes de control ejemplares entre otros incluyen beta-actina, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, y la proteína ribosomal P1.

El nivel de control puede determinarse al mismo tiempo que las células cancerosas que utilizan muestras previamente recolectadas y almacenadas de sujetos cuyos estados de enfermedad (cancerosa o no cancerosa) son conocidos. Adicionalmente, las células normales obtenidas a partir de regiones no cancerosas de un órgano que tiene un cáncer a ser tratado, pueden ser utilizadas como un control normal. Alternativamente, el nivel de control puede ser determinado por un método estadístico, basándose en los resultados obtenidos por medio del análisis previamente determinado del nivel de expresión del gen TOMM34 en las muestras de los sujetos cuyos estados de enfermedad son conocidos. Adicionalmente, el nivel de control puede ser derivado de los patrones de una base de datos de expresión de las células previamente evaluadas. Además, de acuerdo con un aspecto de

la presente invención, el nivel de expresión del gen TOMM34 en una muestra biológica puede ser comparado con múltiples niveles de control, determinados a partir de múltiples muestras de referencia. Es preferible utilizar un nivel de control determinado de una muestra de referencia derivada de un tejido similar al tipo del derivado de la muestra biológica del sujeto. Además, es preferible utilizar el valor convencional de los niveles de expresión del gen TOMM34 en una población con un estado de enfermedad conocido. El valor convencional puede ser obtenido utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse un rango de desviación estándar media de ± 2 o ± 3 como el valor convencional.

En el contexto de la presente invención, un nivel de control determinado de una muestra biológica que se conoce para ser no canceroso se refiere como un "nivel de control normal" Por otro lado, si el nivel de control se determina de una muestra biológica cancerosa, se refiere como un "nivel de control canceroso".

Cuando el nivel de expresión del gen TOMM34 incrementa en comparación con el nivel normal de control o es similar/equivalente al nivel canceroso de control, se puede diagnosticar que el sujeto padece de un cáncer que necesita ser tratado.

La presente invención igualmente proporciona un método para (i) el diagnóstico de una sospecha que un sujeto padezca de un cáncer que necesita ser tratado, y/o (ii) la selección de un sujeto para recibir tratamiento del cáncer, método éste

que puede incluir los pasos de:

a) la determinación del nivel de expresión de TOMM34 en las células o tejidos obtenidos de un sujeto del que se sospecha tener un cáncer a ser tratado;

5 b) la comparación del nivel de expresión de TOMM34 con un nivel de control normal;

c) el diagnóstico del sujeto como el que presenta el cáncer a ser tratado, si el nivel de expresión de TOMM34 es incrementado comparado con el nivel de control normal; y

10 d) la selección del sujeto que ha de recibir un tratamiento para el cáncer, si se diagnostica que el sujeto padece del cáncer a ser tratado, en el paso c).

Alternativamente, este método puede incluir los pasos de:

15 a) la determinación del nivel de expresión de TOMM34 en las células o tejidos obtenidos de un sujeto del que se sospecha pueda tener el cáncer a ser tratado;

b) la comparación del nivel de expresión de TOMM34 con un nivel de control canceroso;

20 c) el diagnóstico del sujeto como el que presenta el cáncer a ser tratado, si el nivel de expresión de TOMM34 es similar o equivalente al nivel de control canceroso; y

d) la selección del sujeto que ha de recibir un tratamiento para el cáncer, si se diagnostica que el sujeto
25 padece del cáncer a ser tratado, en el paso c).

La presente invención igualmente proporciona un kit de diagnóstico para el diagnóstico o determinación de un sujeto que tiene o se sospecha padece de un cáncer que puede ser

000092

tratado con el polipéptido TOMM34 de la presente invención, el cual puede ser igualmente utilizado en la evaluación del pronóstico de cáncer y/o monitoreo de la eficacia o aplicabilidad de una inmunoterapia del cáncer, particularmente una inmunoterapia de cáncer. Los ejemplos ilustrativos de cánceres adecuados incluyen pero no se limitan a, AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave. Más particularmente, el kit puede preferiblemente incluir al menos un reactivo para la detección de la expresión del gen TOMM34 en una célula derivada del sujeto, tal reactivo seleccionado a partir del grupo de:

(a) un reactivo para la detección del ARNm del gen TOMM34;

(b) un reactivo para la detección de la proteína TOMM34 o del fragmento inmunológico de los mismos; y

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

Los ejemplos de reactivos adecuados para la detección ARNm del gen TOMM34 pueden incluir los ácidos nucleicos que específicamente se unen a o identifican el ARNm del TOMM34, tal como los oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a una porción del ARNm del TOMM34. Estos tipos de oligonucleótidos son ilustrados por cebadores y sondas que son específicos para el ARNm del TOMM34. Estos tipos de oligonucleótidos pueden ser preparados basándose en métodos

bien conocidos en la técnica. Si se considera necesario, el reactivo para la detección del ARNm del TOMM34 puede ser inmovilizado sobre una matriz sólida. Además, en el kit puede incluirse más de un reactivo para la detección del ARNm del TOMM34.

Por otro lado, ejemplos de reactivos adecuados para la detección de la proteína TOMM34 o del fragmento inmunológico de la misma pueden incluir los anticuerpos de la proteína TOMM34 o el fragmento inmunológico de los mismos. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Adicionalmente, cualquier fragmento o modificación (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo puede ser utilizado como el reactivo, siempre que el fragmento o anticuerpo modificado mantenga la habilidad de acoplamiento con la proteína TOMM34 o el fragmento inmunológico de la misma. Los métodos para preparar estos tipos de anticuerpos para la detección de las proteínas, son bien conocidos en la técnica, y cualquier método puede ser utilizado en la presente invención para preparar estos anticuerpos y los equivalentes de los mismos. Adicionalmente, el anticuerpo puede ser marcado con moléculas para la generación de señales por medio del acoplamiento directo o una técnica de marcado indirecta. Los marcadores y los métodos para el marcado de los anticuerpos y la detección del acoplamiento de los anticuerpos con sus objetivos son bien conocidos en la técnica, y cualquier marcador y método puede ser utilizado para la presente invención. Además, en el kit puede utilizarse más de un reactivo para la detección de la

000094

proteína TOMM34.

El kit puede contener más de uno de los reactivos mencionados con anterioridad. El kit puede incluir adicionalmente una matriz sólida y un reactivo para acoplar
5 una sonda en contra de un gen TOMM34 o un anticuerpo en contra de un péptido TOMM34, un medio y un recipiente para el cultivo de células, reactivos de control positivos y negativos, y un anticuerpo secundario para la detección de un anticuerpo en contra de un péptido TOMM34. Por ejemplo, las
10 muestras de tejido obtenidas a partir de sujetos sin cáncer o que padecen de cáncer, pueden ser reactivos de control útiles. Un kit de la presente invención puede adicionalmente incluir otros materiales adecuados desde el punto de vista comercial y del usuario, lo que incluye soluciones
15 amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e inserciones en el empaque (por ejemplo, escritas, grabadas, en CD-ROM, etc.) con instrucciones para uso. Estos reactivos y similares pueden ser introducidos en un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados pueden incluir botellas,
20 ampollas, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

En una modalidad de la presente invención, cuando el reactivo es una sonda en contra del ARNm del TOMM34, el
25 reactivo puede ser inmovilizado sobre una matriz sólida, tal como una cinta porosa, para formar al menos uno sitio de detección. La región de medición o detección de la cinta porosa puede incluir una pluralidad de sitios, que contienen

000095

cada uno un ácido nucleico (sonda). Una cinta de evaluación puede también contener sitios para los controles negativos y/o positivos. Alternativamente, los sitios de control pueden ser ubicados sobre una cinta separada de la cinta de evaluación. Opcionalmente, los diferentes sitios de detección pueden contener diferente cantidades de ácidos nucleicos inmovilizados, es decir, una cantidad mayor en el primer sitio de detección y menores cantidades en los sitios subsiguientes. Después de la adición de una muestra de evaluación, el número de sitios que muestran una señal detectable proporciona una indicación de la cantidad cuantitativa de ARNm del TOMM34 presente en la muestra. Los sitios de detección pueden ser configurados de cualquier de forma adecuada y detectable y están típicamente en la forma de una barra o partícula que abarcan el ancho de una cinta de evaluación.

El kit de la presente invención puede incluir adicionalmente una muestra de control positivo o una muestra convencional de TOMM34. La muestra de control positivo de la presente invención puede ser preparada recolectando muestras positivas de TOMM34 y experimentando posteriormente sus niveles de TOMM34. Alternativamente, la proteína purificada de TOMM34 o al polinucleótido, pueden añadirse a las células que no expresan el TOMM34 para formar la muestra positiva o la muestra de TOMM34 convencional. En la presente invención, el TOMM34 purificado puede ser una proteína recombinante. El nivel de TOMM34 de la muestra de control positivo es, por ejemplo, más del valor de corte.

000096

En una modalidad, la presente invención adicionalmente proporciona un kit de diagnóstico incluyendo, una proteína o una proteína parcial de la misma capaz de reconocer específicamente el anticuerpo de la presente invención o el
5 fragmento de los mismos.

Los ejemplos del péptido parcial de la proteína de la presente invención incluyen polipéptidos que consisten de al menos 8, preferiblemente 15, y más preferiblemente 20 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de una
10 proteína de la presente invención. El cáncer puede ser diagnosticado por medio de la detección de un anticuerpo en una muestra (por ejemplo, sangre, tejido), que utiliza una proteína o un péptido (polipéptido) de la presente invención. El método para la preparación de la proteína de la presente
15 invención y los péptidos son tal como se describe con antelación.

La presente invención proporciona métodos para el diagnóstico del cáncer, que pueden ser llevados a cabo mediante la determinación de la diferencia entre la cantidad
20 de anticuerpo anti-TOMM34 y la de la correspondiente muestra control como se describe anteriormente. El sujeto es sospechoso de sufrir cáncer, si las células o tejidos del sujeto contienen anticuerpos en contra de los productos de expresión (TOMM34) del gen y la cantidad del anticuerpo anti-
25 TOMM34 es determinada por ser mayor que el valor de corte en el nivel comparado con el del control normal.

En otra modalidad, un kit de diagnóstico de la presente invención puede incluir el péptido de la presente invención y

000097

una molécula HLA acoplada al mismo. El método para la
detección del CTLs específicos de antígeno que utilizan
péptidos antigénicos y moléculas HLA han sido ya establecidos
(por ejemplo, Altman JD y colaboradores, Science. 1996,
5 274(5284): 94-6). Por ende, el complejo del péptido de la
presente invención y la molécula HLA puede ser aplicado al
método de detección para detectar los CTLs de antígeno
específicos tumorales, permitiendo en consecuencia una más
temprana detección de la recurrencia y/o metástasis del
10 cáncer. Adicionalmente, este puede ser utilizado para la
selección de sujetos aplicables con los fármacos incluyendo
el péptido de la presente invención, en la forma de un
ingrediente activo, o la evaluación del efecto del
tratamiento con los fármacos.

15 Particularmente, de acuerdo con los métodos conocidos
(véase, por ejemplo, Altman JD y colaboradores, Science.
1996, 274(5284): 94-6), puede prepararse el complejo
oligomérico, tal como el tetrámero, de la molécula HLA
radiomarcada y el péptido de la presente invención. Cuando se
20 utiliza el complejo, el diagnóstico puede ser hecho, por
ejemplo, a través de la cuantificación de los CTLs
específicos antígeno-péptido en los linfocitos de la sangre
periférica derivados del sujeto sospechoso de sufrir cáncer.

La presente invención adicionalmente proporciona un
25 método o agentes de diagnóstico para la evaluación de la
respuesta inmunológica del sujeto, utilizando epítomos de
péptido tales como se describen en el presente documento. En
una aplicación de la invención, los péptidos restringidos

HLA-A2, tales como los descritos en el presente documento, pueden ser utilizados como reactivos para la evaluación o la predicción de la respuesta inmunitaria de un sujeto. La respuesta inmunitaria a ser evaluada puede ser inducida poniendo en contacto un inmunógeno con células inmunocompetentes *in vitro* o *in vivo*. En aplicaciones preferidas, las células inmunocompetentes para evaluar una respuesta inmunológica, pueden seleccionarse de entre sangre periférica, linfocito de sangre periférica (PBL), y célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). Los métodos para recolectar o aislar tales células inmunocompetentes son bien conocidos en las técnicas. En algunas aplicaciones, puede emplearse cualquier agente que puede resultar en la producción de CTLs específicos de antígeno que reconocen y enlazan a los epítomos de péptido como el reactivo. El reactivo de péptido no se usa como el inmunógeno. Los sistemas experimentales que son utilizados para estos análisis incluyen desarrollos técnicos relativamente recientes tales como tetrámeros, coloración para los experimentos de liberación de linfocinas intracelulares e interferón, o experimentos ELISPOT. En aplicaciones preferentes, las células inmunocompetentes para ponerse en contacto con el reactivo de péptido pueden ser células que presentan antígeno incluyendo células dendríticas.

25 Por ejemplo, los péptidos de la presente invención pueden ser utilizados en experimentos de coloración de tetrámero para la evaluación de células mononucleares de sangre periférica para la presencia de los CTLs específicos

de antígeno que siguen a la exposición a un antígeno celular tumoral o un inmunógeno. El complejo tetramérico HLA puede ser utilizado para visualizar directamente los CTLs específicos de antígenos (véase, por ejemplo, Ogg y colaboradores, Science 279: 2103-2106, 1998; y Altman y colaboradores, Science 174: 94-96, 1996) y determinar la frecuencia de la población de CTLs específicos de antígeno en una muestra de células mononucleares de sangre periférica. Un reactivo de tetramero que utiliza un péptido de la invención puede ser generado como sigue:

Un péptido que se acopla a una molécula HLA es replegado en la presencia de la correspondiente cadena pesada de HLA y de beta 2-microglobulina, para generar un complejo trimolecular. En el complejo, el carboxilo terminal de la cadena pesada es biotinilado en un sitio que fue previamente preparado por ingeniería en la proteína. Posteriormente, la estreptavidina es añadida al complejo para formar el tetramero constituido por el complejo trimolecular y la estreptavidina. Por medio de estreptavidina marcado por fluorescencia, el tetramero puede ser utilizado para teñir células antigénicas específicas. Las células pueden entonces ser identificadas, por ejemplo, por medio de citometría de flujo. Estos análisis pueden ser utilizados con propósitos diagnósticos o pronóstico. Las células identificadas utilizando el procedimiento pueden ser utilizadas también con propósitos terapéuticos.

La presente invención igualmente proporciona reactivos para la evaluación de respuestas inmunitarias de memoria

000100

(véase, por ejemplo, Bertoni y colaboradores, J. Clin. Invest. 100: 503-513, 1997 y Penna y colaboradores, J Exp. Med. 174: 1565-1570, 1991) incluyendo los péptidos de la presente invención. Por ejemplo, las muestras PBMC del
5 paciente de individuos con cáncer a ser tratado, pueden ser analizadas para averiguar la presencia de CTLs específicos de antígeno que utilizan péptidos específicos. Una muestra de sangre que contiene células mononucleares puede ser evaluada por medio del cultivo de las PBMCs y estimulando las células
10 con un péptido de la invención. Luego de un período de cultivo apropiado, la población celular expandida puede ser analizada, por ejemplo, para averiguar la actividad de los CTL.

Los péptidos pueden ser igualmente utilizados como
15 reactivos para la evaluación de la eficacia de una vacuna. Las PBMCs obtenidas a partir de un paciente vacunado con un inmunógeno, pueden ser analizadas utilizando, por ejemplo, cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Se determina el HLA del paciente y los reactivos de péptido
20 epítipo que reconocen a las moléculas alelo-específicas presentes en el paciente son seleccionadas para el análisis. La inmunogenicidad de la vacuna puede ser indicada por la presencia de los CTLs epítipo-específicos en la muestra de PBMC.

25 Los péptidos de la invención pueden ser igualmente utilizados para elaborar anticuerpos, que utilizan técnicas bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; y Antibodies A

Laboratory Manual, Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), que puede utilizarse como reactivos para diagnosticar o monitorear el cáncer. Estos anticuerpos pueden incluir aquellos que reconocen un péptido en el
5 contexto de una molécula HLA, es decir, los anticuerpos que se unen a un complejo péptido-MHC.

Los péptidos y composiciones de la presente invención tienen un número de usos adicionales, algunos de ellos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la presente
10 invención proporciona un método para el diagnóstico o la detección de un desorden caracterizado por la expresión de un polipéptido inmunogénico TOMM34. Estos métodos involucran la determinación de la expresión del péptido de la presente invención, o un complejo de un péptido de acoplamiento HLA de
15 la presente invención y una molécula HLA clase I en una muestra biológica. La expresión de un péptido o de una complejo de péptido y una molécula HLA clase I puede ser determinada o detectada por el experimento con un compañero de acoplamiento para el péptido o complejo. En una aplicación
20 preferente, un compañero de acoplamiento que se une con el péptido o complejo puede ser un anticuerpo que reconoce y específicamente se une al péptido. La expresión de TOMM34 en una muestra biológica, tal como una biopsia de un tumor, puede ser igualmente evaluada por protocolos convencionales
25 de amplificación de PCR que utilizan cebadores TOMM34. Un ejemplo de la expresión de un tumor es presentado en el presente documento y la descripción adicional de las condiciones ilustrativas y de los cebadores para la

amplificación de TOMM34, puede ser hallada en WO2003/27322.

Preferiblemente, los métodos de diagnóstico involucran la etapa de poner en contacto una muestra biológica aislada de un sujeto con un agente específico para el péptido de acoplamiento HLA de TOMM34, para detectar la presencia del péptido de la presente invención en la muestra biológica. Tal como se utiliza en el presente documento, "el contacto de" significa la colocación de la muestra biológica en una proximidad suficiente con el agente y bajo las condiciones apropiadas de, por ejemplo, concentración, temperatura, tiempo, fuerza iónica, para permitir la interacción específica entre el agente y el péptido de la presente invención que están presentes en la muestra biológica. En general, las condiciones para el contacto del agente con la muestra biológica son condiciones conocidas para aquellos expertos en la técnica con el objeto de facilitar una interacción específica entre una molécula y su cognado (por ejemplo, una proteína y su receptor afín, un anticuerpo y su antígeno proteico afín, un ácido nucleico y su secuencia complementaria afín) en una muestra biológica. Las condiciones ilustrativas para facilitar una interacción específica entre una molécula y su cognado están descritas en la Patente de los Estados Unidos de América No. 5,108,921, otorgada a Low y colaboradores.

El método de diagnóstico de la presente invención puede ser llevado a cabo tanto *in vivo* como *in vitro*, así como en ambas. Consecuentemente, la muestra biológica puede ser ubicada *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 TOMM34 puede ser utilizado para detectar la presencia de estas moléculas en el tejido. Alternativamente, la muestra biológica puede ser recolectada o aislada *in vitro* (por ejemplo, una muestra de sangre, una biopsia de un tumor, el extracto de un tejido). En una aplicación preferente particular, la muestra biológica puede ser una muestra que contiene células, más preferiblemente una muestra que contiene células tumorales recolectadas de un sujeto a ser diagnosticado o tratado.

Alternativamente, el diagnóstico puede ser hecho, utilizando un método que permite la cuantificación directa de la células T específicas de antígeno por coloración con complejos multiméricos HLA marcados con fluoresceína (por ejemplo, Altman, J. D. y colaboradores, 1996, Science 274: 94; Altman, J. D. y colaboradores, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10330). La coloración para las linfocinas intracelulares, y experimentos de liberación del interferón-gamma o experimentos ELISPOT se proporcionan igualmente. Parece que tanto la coloración de tetrámero, como la coloración de la linfocina intracelular como los experimentos ELISPOT son al menos 10 veces más sensibles que los experimentos más convencionales (Murali-Krishna, K. y colaboradores, 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. y colaboradores, 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. y colaboradores, 1998, Curr. Biol. 8: 413). Los pentámeros (por ejemplo, US 2004-209295A), dextrámeros (por ejemplo, WO

02/072631), y estreptámeros (por ejemplo, Nature medicine 6. 631-637 (2002)) pueden ser igualmente utilizados.

Por ejemplo, en algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico o la
5 evaluación de una respuesta inmunológica de un sujeto, administrado al menos uno de los péptidos TOMM34 de la presente invención, método éste que incluye los pasos de:

(a) el contacto de un inmunógeno con células inmunocompetentes bajo la condición adecuada de inducción de
10 CTL específico para el inmunógeno;

(b) la detección de o la determinación del nivel de inducción del CTL inducido en el paso (a); y

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

15 En la presente invención, el inmunógeno preferiblemente incluye al menos uno de (a) un péptido TOMM34 de la presente invención, por ejemplo, péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NOs: 1, 5, 31 y
32 , y péptidos modificados de la misma (péptidos que tiene
20 tales secuencias de aminoácidos, y los péptidos en los cuales tales secuencias de aminoácidos han sido modificadas con 1,2 o más sustitución(es) de aminoácidos)). Entre tanto, las condiciones utilizadas en la inducción del CTL específico del inmunógeno son ampliamente conocidas en la técnica. Por
25 ejemplo, las células inmunocompetentes pueden ser cultivadas in vitro, bajo la presencia del inmunógenos para inducir el CTL específico de inmunógeno. A los fines de inducir a los CTLs específicos del inmunógeno, se puede añadir cualquiera

de los factores de estimulación al cultivo celular. Por ejemplo, el IL-2 es un factor de estimulación preferible para la inducción de los CTL. En algunas aplicaciones, el paso del monitoreo o la evaluación de la respuesta inmunológica de un sujeto a ser tratado con terapia anticancerosa a base de péptidos puede ser llevada a cabo antes de, durante y/o luego del tratamiento. En general, durante un protocolo de terapia anticancerosa, los péptidos inmunogénicos son administrados de forma repetida a un sujeto a ser tratado. Por ejemplo, los péptidos inmunogénicos pueden ser administrados cada semana durante 3-10 semanas. Consecuentemente, la respuesta inmunológica del sujeto puede ser evaluada o monitoreada durante el protocolo de terapia anticancerosa. Alternativamente, el paso de la evaluación o el monitoreo de la respuesta inmunológica a la terapia anticancerosa puede llevarse a cabo al final del protocolo de terapia. De acuerdo a la presente invención, la inducción mejorada del CTL específico de inmunógeno comparada con un control, indica que el sujeto a ser evaluado o diagnosticado respondió inmunológicamente a los inmunógenos que han sido administrados. Los controles adecuados para la evaluación de la respuesta inmunológica pueden incluir, por ejemplo, una inducción del nivel de CTL cuando las células inmunocompetentes entran en contacto con controles sin péptidos, o con péptidos que presentan una secuencia de aminoácidos distinta a cualquiera de los péptidos TOMM34. (por ejemplo, una secuencia aleatoria de aminoácidos). En una aplicación preferente, la respuesta inmunológica del sujeto

es evaluada con una forma específica de la secuencia, comparándola con una respuesta inmunológica entre cada inmunógeno administrado al sujeto. En particular, aún cuando la mezcla de algunos tipos de péptidos TOMM34 es administrado al sujeto, la respuesta inmunológica puede variar dependiendo de los péptidos. En ese caso, comparando la respuesta inmunológica entre cada péptido, pueden identificarse los péptidos con los que el sujeto presenta una respuesta más alta.

10

XI. Anticuerpos

La presente invención adicionalmente proporciona anticuerpos que se acoplan a los péptidos de la presente invención. Los anticuerpos preferiblemente se acoplan de forma específica al péptido de la presente invención y no se acoplarán (o lo harán con debilidad) a los componentes no peptídicos de la presente invención. Alternativamente, los anticuerpos se acoplan al péptido de la invención, al igual que a los homólogos del mismo.

20

Se puede utilizar anticuerpos contra el péptido de la invención en el diagnóstico del cáncer y en los experimentos de diagnóstico, y en las metodologías de imagenología. De igual forma, estos anticuerpos pueden ser de utilidad en el tratamiento, diagnóstico y/o prognosis de otros cánceres, siempre que TOMM34 igualmente se exprese o sobre exprese en el paciente con cáncer. Además, los anticuerpos intracelularmente expresados (por ejemplo, los anticuerpos de cadena única) pueden hallar una utilidad terapéutica en el

25

tratamiento de los cánceres en los cuales la expresión de TOMM34 se encuentra implicada, algunos ejemplos de los cuales entre otros incluyen el AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, 5 cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave.

La presente invención igualmente proporciona varios experimentos inmunológicos para la detección de y/o cuantificación de la proteína TOMM34 (SEQ ID NO: 42) o los 10 fragmentos de los mismos incluyendo los polipéptidos de la presente invención. Estos experimentos pueden incluir uno o más anticuerpos anti-TOMM34 capaces de reconocer y acoplarse a la proteína TOMM34 o a los fragmentos de la misma, en forma apropiada. En la presente invención, los anticuerpos anti- 15 TOMM34 acoplados al polipéptido TOMM34 reconocen preferiblemente un polipéptido de la presente invención. Se puede confirmar la especificidad de enlace de un anticuerpo con una evaluación de la inhibición. Es decir, cuando el acoplamiento entre un anticuerpo a ser analizado y el 20 polipéptido TOMM34 de longitud completa es inhibido bajo la presencia de cualquier fragmento de polipéptidos de la presente invención, se muestra que este anticuerpo se acopla específicamente al fragmento. En el contexto de la presente invención, estos experimentos inmunológicos son llevados a 25 cabo dentro de diversos formatos de experimentos inmunológicos ampliamente conocidos en la técnica, lo que entre otros incluye varios tipos de experimentos radioinmunológicos, técnicas inmuno-cromatográficas, ensayos

de inmunoabsorción enlazados a la enzima (ELISA), experimentos de inmunofluorescencia enlazados a la enzima (ELIFA), y similares.

Los ensayos inmunológicos pero que no utilizan anticuerpos relacionados con la invención pueden igualmente incluir ensayos de inmunogenicidad de las células T (de inhibición o estimulación), al igual que ensayos de acoplamiento de complejo de histocompatibilidad principal (MHC). Adicionalmente, los métodos inmunológicos de imagenología capaces de detectar los cánceres que expresan a TOMM34 son igualmente utilizados en la invención, lo que entre otros incluye los métodos radioescintigráficos de imagenología que utilizan los anticuerpos marcados de la presente invención. Se puede utilizar estos ensayos clínicamente en la detección, monitoreo y pronóstico de los cánceres que expresan a TOMM34, lo que entre otros incluye el AML, CML, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, NSCLC, y tumor de tejido suave.

La presente invención proporciona anticuerpos que se acoplan al péptido de la invención. El anticuerpo de la invención puede ser utilizado en cualquier forma, tal como anticuerpos policlonales o monoclonales, e incluyen antisuero obtenido utilizando la inmunización de un animal tal como un conejo con el péptido de la invención, todas las clases de anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados producidos por recombinación

genética.

Un péptido de la invención utilizado en la forma de un antígeno para obtener un anticuerpo, puede ser derivado de cualquiera de las especies de animales, pero preferiblemente se deriva de un mamífero tal como un ser humano, ratón, o rata, idealmente de un ser humano. Un péptido derivado de un ser humano puede ser obtenido a partir del nucleótido o secuencia de aminoácidos descritos en el presente documento.

De acuerdo a la presente invención, el péptido a ser utilizado en la forma de un antígeno de inmunización puede ser una proteína completa o un péptido parcial de la misma. Un péptido parcial puede incluir, por ejemplo, el fragmento amino (N)-terminal o carboxi (C)-terminal de un péptido de la presente invención.

En el presente documento, un anticuerpo es definido como una proteína que reacciona ya sea con la longitud total o con un fragmento de un péptido TOMM34. En una aplicación preferente, el anticuerpo de la presente invención puede reconocer fragmentos de péptidos de TOMM34 que presentan una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID NOs: 1, 5, 31 y 32. Los métodos para la síntesis de oligopéptidos son bien conocidos en la técnica. Luego de la síntesis, los péptidos pueden ser opcionalmente purificados previamente para utilizarlos como un inmunógeno. En la presente invención, el oligopéptido (por ejemplo, 9- o 10mer) puede ser conjugado o enlazado con transportadores para mejorar su inmunogenicidad. La hemocianina de una variedad de lapa (KLH) es bien conocida como el portador. El método para

la conjugación del KLH y del péptido es igualmente bien conocido en la técnica.

Alternativamente, un gen que codifica un péptido de la invención o fragmento del mismo puede ser insertado en un vector de expresión conocido, que es posteriormente utilizado para transformar una célula hospedera tal como se describe en el presente documento. El péptido o fragmento del mismo deseado puede ser recuperado del exterior o interior de las células hospederas mediante cualquier método convencional, y puede ser utilizado posteriormente en la forma de un antígeno. Alternativamente, todas las células que expresan el péptido o sus lisados o un péptido químicamente sintetizado pueden ser utilizados como el antígeno.

Cualquier animal mamífero puede ser inmunizado con el antígeno, pero preferiblemente, la compatibilidad con las células parentales utilizadas para la fusión de las células es tomada en cuenta. En general, pueden utilizarse los animales de las familias Rodentia, Lagomorpha o de los primates. Los animales de la familia Rodentia incluyen, por ejemplo, el ratón, la rata y el hámster. Los animales de la familia Lagomorpha incluyen, por ejemplo, el conejo. Los animales de la familia de los primates incluyen, por ejemplo, un mono de Catarrhini (mono de viejo mundo) tal como el *Macaca fascicularis*, el mono Rhesus, el mandril sagrado y los chimpancés.

Los métodos para la inmunización de animales con antígenos son conocidos en la técnica. La inyección intraperitoneal o subcutánea de los antígenos es un método

000111

convencional para la inmunización de mamíferos. Más específicamente, los antígenos pueden ser diluidos y suspendidos en una cantidad apropiada de solución amortiguadora salina de fosfato (PBS), solución fisiológica salina, etc. Si se desea, la suspensión del antígeno puede ser mezclada con una cantidad apropiada de un adyuvante convencional, tales como el adyuvante completo de Freund, que es elaborado en una emulsión y posteriormente administrado a los animales mamíferos. Preferiblemente, esto es seguido por varias administraciones de antígenos mezclados con una cantidad de adyuvante incompleto de Freund, de forma apropiada, cada 4 a 21 días. También puede utilizarse un portador apropiado para la inmunización. Luego de la inmunización descrita anteriormente, el suero puede ser examinado por medio de un método convencional para conocer si se incrementaron los anticuerpos en la cantidad deseada.

Los anticuerpos policlonales en contra de los péptidos de la presente invención pueden ser preparados recolectando sangre del mamífero inmunizado examinado para el incremento de los anticuerpos deseados en el suero, y por medio de la separación del suero de la sangre utilizando cualquier método convencional. Los anticuerpos policlonales incluyen un suero que contiene los anticuerpos policlonales, así como también puede aislarse del suero la fracción que contiene los anticuerpos policlonales. Las inmunoglobulinas G o M pueden ser preparadas a partir de una fracción que reconozca únicamente el péptido de la presente invención, por ejemplo, una columna de afinidad acoplada con el péptido de la

presente invención, y la purificación adicional de esta fracción que utiliza la columna de proteína A o de proteína G.

Para preparar los anticuerpos monoclonales, las células
5 inmunitarias son recolectadas del mamífero inmunizado con el antígeno y se examinan para conocer el nivel de incremento deseado de los anticuerpos en el suero, tal como se describe con antelación, y son sometidas a la fusión de las células. Las células inmunitarias utilizadas para la fusión de las
10 células pueden ser obtenidas preferiblemente del bazo. Otras células parentales preferentes a ser fundidas con el inmunocito descrito anteriormente incluyen, por ejemplo, células del mieloma de mamíferos, e idealmente células del mieloma que presentan una propiedad adquirida para la
15 selección de las células fundidas por las fármacos.

Las células de inmunocitos y mieloma descritas anteriormente pueden ser fundidas de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein y colaboradores. (Galfre y Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46
20 (1981)).

Los hibridomas obtenidos resultantes utilizando la fusión de las células, pueden ser seleccionados por medio del cultivo de los mismos en un medio de selección convencional, tal como un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina
25 que contiene el medio). El cultivo celular es típicamente continuado en el medio HAT durante varios días a varias semanas, siendo el tiempo suficiente para permitir que mueran todas las demás células, con la excepción del hibridoma

deseado (células no fundidas). Posteriormente, puede llevarse a cabo la dilución de limitación convencional para monitorear y clonar una célula hibridoma que produce el anticuerpo deseado.

5 Adicionalmente el método descrito anteriormente, en el cual un animal distinto al ser humano es inmunizado con un antígeno para la preparación del hibridoma, los linfocitos humano tales como aquellos infectados por el virus EB, pueden ser inmunizados con un péptido, péptido este que expresa las
10 células o sus lisados *in vitro*. Posteriormente, los linfocitos inmunizados son fundidos con un derivado de células de mieloma de un ser humano que son capaces de dividir indefinidamente, tal como en la U266, para conseguir un hibridoma que produzca un anticuerpo humano deseado capaz
15 de unirse al péptido puede obtenerse (Solicitud de Patente Japonesa Publicada No examinada No. (JP-A) Sho 63-17688).

Los hibridomas obtenidos son posteriormente trasplantados a la cavidad abdominal de un ratón y se extraen los líquidos ascíticos. Los anticuerpos monoclonales
20 obtenidos pueden ser purificados por, por ejemplo, precipitación de sulfato de amonio, una columna de proteína A o de proteína G, intercambio iónico cromatográfico DEAE y o el acoplamiento de una columna de afinidad con el péptido de la presente invención. El anticuerpo de la presente invención
25 puede ser utilizado no únicamente para la purificación y detección del péptido de la presente invención, si no igualmente en la forma de un candidato para los agonistas y antagonistas del péptido de la presente invención.

Alternativamente, una célula inmunitaria, tal como un linfocito inmunizado, que produce anticuerpos puede ser inmortalizada por un oncogén y utilizada para la preparación de anticuerpos monoclonales.

5 Los anticuerpos monoclonales obtenidos por ende, pueden ser igualmente preparados de forma recombinante, utilizando técnicas de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck y Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD
10 (1990)). Por ejemplo, un ADN que codifica un anticuerpo puede ser clonado a partir de una célula inmunitaria, tal como un hibridoma o un linfocito inmunizado que produce el anticuerpo, insertado en un vector apropiado, e introducido en las células hospederas para preparar un anticuerpo
15 recombinante. La presente invención igualmente proporciona anticuerpos recombinantes preparados tal como se describe con antelación.

Adicionalmente, un anticuerpo de la presente invención puede ser un fragmento de un anticuerpo o de un anticuerpo
20 modificado, siempre que este se acople a uno o más de los péptidos de la invención. Por ejemplo, el fragmento del anticuerpo puede ser Fab, F(ab')₂, Fv o Fv de cadena individual (scFv), en el cual los fragmentos Fv de las cadenas H y L son ligados por una ligadura apropiado (Huston y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988)).
25 Más específicamente, un fragmento del anticuerpo puede ser generado por el tratamiento de un anticuerpo con una enzima, tal como papaína o pepsina. Alternativamente, puede

construirse un gen que codifica el fragmento del anticuerpo, insertándolo en un vector de expresión y que se expresa en una célula hospedera apropiada (véase, por ejemplo, Co y colaboradores, J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better y Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun y Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseaux y colaboradores, Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird y Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991)).

10 Un anticuerpo puede ser modificado por medio de la conjugación con una variedad de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). La presente invención proporciona estos anticuerpos modificados. El anticuerpo modificado puede ser obtenido al modificar químicamente un anticuerpo. Estos
15 métodos de modificación resultan convencionales en el campo.

Alternativamente, se puede obtener un anticuerpo de la presente invención en la forma de un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de un anticuerpo no humano y la región constante derivada del anticuerpo humano, o en la
20 forma de un anticuerpo humanizado, incluyendo la región determinante de complementariedad (CDR) derivada del anticuerpo no humano, la región de marco (FR) y la región constante derivada del anticuerpo humano. Estos anticuerpos pueden ser preparados utilizando la tecnología conocida. La
25 humanización puede ser llevada a cabo por medio de la sustitución de CDRs de roedores o las secuencias CDR de las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Verhoeven y colaboradores, Science 239:1534-1536

(1988)). Consecuentemente, estos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de las especies no humanas.

5 Igualmente pueden utilizarse los anticuerpos completamente humanos, incluyendo las regiones variables humanas adicionales a un marco humano y a las regiones constantes. Estos anticuerpos pueden ser producidos utilizando varias técnicas conocidas en la técnica. Por
10 ejemplo, los métodos *in vitro* involucran el uso de librerías recombinantes de fragmentos de anticuerpos humanos desplegados sobre el bacteriófago (por ejemplo, Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)). De igual forma, se puede producir anticuerpos humanos mediante la introducción
15 de ubicaciones de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los cual los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Este enfoque es descrito, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 6,150,584,
20 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016.

 Se puede purificar los anticuerpos obtenidos conforme se indicó con anterioridad hasta su homogeneidad. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la separación y purificación del
25 anticuerpo de acuerdo con los métodos de separación y purificación utilizados para las proteínas en general. Por ejemplo, se puede separar el anticuerpo y aislarlo por medio de la selección apropiada y del uso combinado de

cromatografías en columna, tales como la cromatografía de afinidad, filtración, ultrafiltración, desalación, diálisis, electroforesis en geles de poliacrilamida SDS y el enfoque isoeléctrico (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero no se limita a estos. Se puede utilizar una columna de proteína A y una columna de proteína G como la columna de afinidad. Algunos ejemplos de las columnas de proteína A que pueden ser utilizadas, por ejemplo, incluyen Hyper D, POROS y Sefarosa F.F. (Pharmacia).

A excepción de la afinidad, algunos ejemplos de métodos de cromatografía adecuados, por ejemplo, incluyen la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía hidrofóbica, la filtración en geles, la cromatografía en fase inversa, la cromatografía de adsorción y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak y colaboradores, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Se puede llevar a cabo los procedimientos cromatográficos por cromatografía en fase líquida, por ejemplo, por HPLC y FPLC.

Por ejemplo, se puede utilizar la medición de la absorbancia, el ensayo por inmunoabsorción ligada a la enzima (ELISA), el inmunoensayo enzimático (EIA), el radioinmunoensayo (RIA) y/o la inmunofluorescencia para medir la actividad antigénica de acoplamiento del anticuerpo de la invención. En ELISA, el anticuerpo de la presente invención es inmovilizado sobre una placa, se aplica un péptido de la invención a la placa y luego se le aplica una muestra

000118

contentiva del anticuerpo apropiado, por ejemplo, el sobrenadante del cultivo de las células productoras del anticuerpo o los anticuerpos purificados. Luego, se aplica un anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario y
5 que está marcado con una enzima, tal como una fosfatasa alcalina y se incuba la placa. Luego, después de lavarla, se agrega un sustrato enzimático, tal como fosfato de *p*-nitrofenilo, a la placa y se mide la absorbancia con el objeto de evaluar la actividad antigénica de acoplamiento de
10 la muestra. Se puede utilizar un fragmento del péptido, por ejemplo, un fragmento C-terminal o N-terminal, como el antígeno, a los efectos de evaluar la actividad de acoplamiento del anticuerpo. Se puede utilizar un BIAcore (Pharmacia) para evaluar la actividad del anticuerpo de
15 acuerdo con la presente invención.

Los métodos que anteceden hacen posible detectar o medir el péptido de la invención, mediante la exposición del anticuerpo de la invención a una muestra que se asume contiene el péptido de la invención y la detección o medición
20 del complejo inmunológico formado por el anticuerpo y el péptido.

Dado que el método de detección o medición del péptido de acuerdo con la invención puede específicamente detectar o medir un péptido, el método puede ser de utilidad en una
25 variedad de experimentos en los cuales se utiliza el péptido.

XII. Vectores y células hospederas

000119

La presente invención igualmente proporciona un vector y una célula hospedera en la cual se introduce un nucleótido que codifica al péptido de la presente invención. Un vector de la presente invención puede ser de utilidad en el mantenimiento de un nucleótido, especialmente un ADN, de la presente invención en la célula hospedera y así expresar al péptido de la presente invención o administrar el nucleótido de la presente invención como terapia génica.

Cuando *E. coli* es la célula hospedera y el vector es ampliado y producido en una gran cantidad en *E. coli* (por ejemplo, JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1Blue), el vector debe tener "ori" para ser ampliado en *E. coli* y un gen marcador para la selección de la *E. coli* transformada (por ejemplo, un gen con resistencia farmacológica seleccionado con una fármaco tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloramfenicol o similares). Por ejemplo, se puede utilizar los vectores de las series M13 y pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, etc. Adicionalmente, se puede igualmente utilizar pGEM-T, pDIRECT y pT7 en la subclonación y extracción del ADNc, al igual que los vectores anteriormente descritos. Cuando se utiliza un vector para producir la proteína de la presente invención, se puede utilizar un vector de expresión. Por ejemplo, un vector de expresión a ser expresado en *E. coli* debe tener las características que anteceden para ser ampliado en *E. coli*. Cuando se utiliza una *E. coli* tal como JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1 Blue, como la célula hospedera, el vector debe tener un promotor, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward y

colaboradores, *Naturaleza* 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), el promotor *araB* (Better y colaboradores, *Ciencia* 240: 1.041-3 (1988)), el promotor T7 o similares, que pueda eficientemente expresar al gen deseado en *E. coli*. En este sentido, se puede, por ejemplo, utilizar pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpres system" (Qiagen), pEGFP y pET (en este caso, el huésped preferiblemente es BL21, el cual expresa a la ARN polimerasa de T7), en lugar de los vectores que anteceden. Adicionalmente, el vector puede igualmente contener una secuencia de señal para la secreción del péptido. Un ejemplo de una secuencia de señal que dirige al péptido a ser secretado al periplasma de la *E. coli* es la secuencia de señal *pelB* (Lei y colaboradores, *J Bacteriol* 169: 4.379 (1987)). Los medios para la introducción de los vectores en las células hospederas objetivo, por ejemplo, incluyen el método que utiliza cloruro de calcio y el método de electroporación.

Además de *E. coli*, se puede, por ejemplo, utilizar vectores de expresión derivados de mamíferos (por ejemplo, pDNAC3 (Invitrogen) y pEGF-BOS (*Nucleic Acids Res* 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8), vectores de expresión derivados de células de insectos (por ejemplo, el sistema de expresión del baculovirus "Bac-to-BAC" (GIBCO BRL), pBacPAK8), vectores de expresión derivados de plantas (por ejemplo, pMH1, pMH2), vectores de expresión derivados de virus animales (por ejemplo, pHSV, pMV, pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (por ejemplo, pZipneo), un vector de expresión derivado de las levaduras

(por ejemplo, "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01) y vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pPL608, pKTH50), en la producción del polipéptido de la presente invención.

5 Para poder expresar el vector en células animales, tales como las células CHO, COS o NIH3T3, el vector debe tener un promotor necesario para llevar a cabo su expresión en estas células, por ejemplo, el promotor SV40 (Mulligan y colaboradores, *Naturaleza* 277: 108 (1979)), el promotor
10 MMLV-LTR, el promotor EF1 alfa (Mizushima y colaboradores, *Nucleic Acids Res* 18: 5322 (1990)), el promotor CMV y similares y preferiblemente de un gen marcador para la selección de transformantes (por ejemplo, un gen con resistencia farmacológica seleccionado con una fármaco (por
15 ejemplo, neomicina, G418)). Algunos ejemplos de vectores conocidos con estas características, por ejemplo, incluyen pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente pueden usarse en la
20 práctica o prueba de la presente invención, se describen los métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente
25 especificación, incluyendo definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son ilustrativos únicamente no se pretenden para ser limitantes.

Se presentan los siguientes ejemplos con el propósito de

ilustrar la presente invención y de ayudar a aquellos normalmente diestros en esta técnica a desarrollarla y utilizarla. No se prevé que los ejemplos de manera alguna limiten el alcance de la invención.

5

EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Líneas celulares

Se adquirió T2, la línea celular de B-linfoblastoide
10 HLA-A*0201-positiva y COS7, la línea celular renal del mono verde africano, de ATCC.

Selección de candidatos a partir de los péptidos derivados de TOMM34

Se utilizaron Los péptidos 9-mer y 10-mer derivados de
15 TOMM34 que se acoplan a la molécula HLA-A*0201 usando el software de predicción del acoplamiento "BIMAS" ([http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla bind](http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind)) (Parker et al. (J Immunol 1994, 152(1): 163-75), Kuzushima et al. (Blood 2001, 98(6): 1872-81). Estos péptidos fueron sintetizados por
20 Biosíntesis (Lewisville, Texas) de acuerdo con un método tradicional de síntesis en fase sólida y purificado por cromatografía líquida en fase inversa de alto rendimiento (HPLC). Se determinó la pureza (>90%) y la similitud de los péptidos por HPLC analítica y análisis espectrométrico de
25 masas, respectivamente. Los péptidos fueron disueltos en sulfóxido de dimetilo a 20 mg/ml y almacenados a una temperatura de -80 grados C.

Inducción in vitro de CTL

Se utilizaron células dendríticas derivadas de monocitos (DCs) como las células que presentan antígenos para inducir las respuestas de los linfocitos T citotóxicos (CTL) contra los péptidos presentes en el antígeno leucocitario humano (HLA). Las DCs fueron generadas *in vitro* conforme se describe en otra parte (Nakahara S y colaboradores, Cancer Res 2003, 63(14): 4112-8). Específicamente, se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) aisladas de un voluntario normal (HLA-A*0201 positivo) con la solución Ficoll-Plaque (Pharmacia) por adherencia a una placa plástica de cultivo de tejido (Becton Dickinson), de forma tal de enriquecerlas como la fracción monocitaria. La población rica en monocitos fue cultivada en la presencia de 1000 U/ml del factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos-macrófagos (R&D System) y de 1000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D System) en Medio AIM-V (Invitrogen) que contiene suero autólogo térmicamente inactivado (AS) al 2%. Luego de transcurridos 7 días de cultivo, las DCs inducidas con citoquinas fueron cargadas con 20 micro-g/ml de cada uno de los péptidos sintetizados, en la presencia de 3 micro-g/ml de beta 2-microglobulina, durante 3 horas a 37 grados C, en Medio AIM-V. Las células generadas parecían expresar a las moléculas asociadas con las DCs, tales como CD80, CD83, CD86 y HLA clase II, sobre sus superficies celulares (datos no ilustrados). Estas DCs cargadas con los péptidos fueron luego inactivadas por irradiación X (20 Gy) y mezcladas a una relación de 1:20 con las células T CD8+

autólogas, las cuales fueron obtenidas por selección positiva con el Equipo de Aislamiento CD8 Positivo (Dynal). Estos cultivos fueron colocados en placas de 48 pozos (Corning); cada pozo contenía 1.5×10^4 DCs cargadas con los péptidos, 3×10^5 células T CD8+ y 10 ng/ml de IL-7 (R&D System) en 0.5 ml de medio AIM-V/AS al 2%. Tres días más tarde, estos cultivos fueron complementados con IL-2 (CHIRON) a una concentración final de 20 IU/ml. En los días 7 y 14, las células T fueron además estimuladas con las DCs autólogas cargadas con los péptidos. En cada oportunidad, las DCs fueron preparadas de la misma manera anteriormente descrita. Se evaluaron los CTLs contra las células TISI cargadas con los péptidos luego de la 3ra ronda de estimulación con los péptidos del día 21 (Tanaka H y colaboradores, Br J Cancer 5 de Enero de 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y colaboradores, Br J Cancer 20 de Abril de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y colaboradores, Clin Cancer Res 15 de Diciembre de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y colaboradores, Cancer Sci Mayo de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y colaboradores, Cancer Sci Agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Procedimiento de Expansión de CTL

Los CTLs fueron expandidos en el cultivo utilizando un método similar a aquel descrito por Riddell y colaboradores. (Walter EA y colaboradores, N Engl J Med 19 de Octubre de 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR y colaboradores, Nat Med Febrero de 1996, 2(2): 216-23). Se suspendió un total de 5×10^4 CTLs en 25 ml de medio AIM-V/AS al 5% con 2 tipos de líneas de

células humanas de B-linfoblastoide, inactivadas con Mitomicina C, en la presencia de 40 ng/ml del anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen). Un día luego de dar inicio a los cultivos, se añadieron 120 IU/ml de IL-2 a los cultivos. A los cultivos se les agregó medio AIM-V/AS al 5% fresco que contiene 30 IU/ml de IL-2 en los días 5, 8 y 11 (Tanaka H y colaboradores, Br J Cancer 5 de Enero de 2001, 84(1): 94-9; Umano Y, y colaboradores, Br J Cancer 20 de Abril de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y colaboradores, Clin Cancer Res 15 de Diciembre de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y colaboradores, Cancer Sci Mayo de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y colaboradores, Cancer Sci Agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Establecimiento de los clones CTL

Se prepararon diluciones que tuvieran 0.3, 1 y 3 CTLs/pozo en 96 placas de micro titulación de fondo curvo (Nalge Nunc International). Los CTLs fueron cultivados con 1×10^4 células/pozo de 2 tipos de líneas de células humanas de B-linfoblastoide, 30 ng/ml del anticuerpo anti-CD3, y 125 U/ml de IL-2 en un total de 150 micro-1/pozo de Medio AIM-V contentivo de AS al 5%. Se añadieron 50 micro-1/pozo de IL-2 al medio 10 días más tarde para lograr una concentración final de 125 U/ml de IL-2. Se evaluó la actividad de CTL en el día 14 y los clones CTL fueron expandidos utilizando el mismo método descrito con antelación (Uchida N y colaboradores, Clin Cancer Res 15 de Diciembre de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y colaboradores, Cancer Sci Mayo de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y colaboradores, Cancer Sci

Agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Actividad CTL específica

Para evaluar la actividad CTL específica, se llevó a
5 cabo un ensayo de mancha inmunitaria ligada a enzima
interferón (IFN)-gamma (ELISPOT) y un ensayo de
inmunoabsorción ligada a enzima IFN-gamma (ELISA). Se
prepararon células TISI cargadas con los péptidos ($1 \times$
10⁴/pozo) como células estimuladoras. Se utilizaron las
10 células cultivadas en 48 pozos como células respondedoras. Se
llevaron a cabo los ensayos ELISPOT con IFN-gamma y ELISA con
IFN-gamma de conformidad con el procedimiento del fabricante.

Establecimiento de las células que expresan poderosamente a cualquiera o ambos del gen objetivo y HLA-A02

15 Se amplificó el ADNc que codifica el marco de lectura
abierta de los genes objetivo o HLA-A*0201 por PCR. El
producto amplificado por PCR fue clonado en el vector de
expresión. Los plásmidos fueron transfectados en COS7, la
línea de células de los genes objetivo y libre de HLA-A*0201,
20 utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con los
procedimientos recomendados por el fabricante. Luego de
transcurridos 2 días de la transfección, las células
transfectadas fueron cosechadas con versene (Invitrogen) y
utilizadas como las células objetivo (5×10^4 células/ pozo)
25 en la determinación de la actividad CTL.

Resultados 1

Expresión Incrementada de TOMM34 en los cánceres

0006127

Los datos del perfil de expresión génica en su conjunto obtenidos de diversos cánceres utilizando un micro-arreglo de cADN revelan una elevación en la expresión de TOMM34 (No. de Acceso al GenBank NM_006809; por ejemplo, SEQ ID No: 42). La expresión de TOMM34 estaba válidamente elevada en 4 de 28 AMLs, 4 de 14 CMLs, 8 de 11 cánceres de vejiga, 1 de 4 cánceres de mama, 1 de 5 cánceres cervicales, 12 de 12 cánceres colorrectales, 5 de 17 cánceres de esófago, 6 de 6 cánceres de hígado, 1 de 10 osteosarcomas, 1 de 26 cánceres de próstata, 1 de 19 carcinomas renales, 2 de 14 SCLC, 5 de 20 NSCLC y 10 de 51 tumores de tejido suave en comparación con los correspondientes tejidos normales (Tabla 1).

15

Tabla 1

Índice de casos donde se observó una sobre-regulación de TOMM34 en el tejido canceroso en comparación con el correspondiente tejido normal.

Cáncer	Relación
AML	4/28
CML	4/14
cáncer de vejiga	8/11
cáncer de mama	1/4
cáncer cervical	1/5
cáncer colorrectal	12/12
cáncer de esófago	5/17
cáncer de hígado	6/6
osteosarcoma	1/10
cáncer de próstata	1/26

000128

carcinoma renal	1/19
SCLC	2/14
NSCLC	5/20
tumor de tejido suave	10/51

Resultados 2

Predicción de los péptidos derivados de TOMM34 que se acoplan

a HLA-A02

Las **Tablas 2a y 2b** ilustran a los péptidos 9mer y 10mer que se acoplan a **HLA-A02** de TOMM34 en el orden de alta afinidad de enlace. Se seleccionó y evaluó un total de 40 péptidos con posible capacidad de acoplamiento a HLA-A02 con la finalidad de identificar los péptidos de epítopo.

Tabla 2a

Péptidos 9mer derivados de TOMM34 que se acoplan a HLA-A02

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	puntaje	SEQ ID NO
30	ALYGRALRV	222.566	1
77	ALALVPFSI	60.51	2
52	VLYSNRAAC	27.026	3
110	TVLQIDDNV	11.034	4
220	LLCSNLESA	9.518	5
230	YSNRALCYL	8.115	6
103	MAYVDYKTV	7.883	7
80	LVPFSIKPL	7.309	8
255	KLDGKNVKA	6.955	9
23	GQYAEASAL	6.931	10
195	VLKEEGNEL	5.211	11
111	VLQIDDNVT	5.194	12
238	LVLKQYTEA	4.101	13
1	MAPKFPDSV	3.058	14
113	QIDDNVTSA	2.577	15
253	ALKLDGKNV	2.434	16
239	VLKQYTEAV	2.028	17
144	LPSIPLVPV	1.775	18
142	LKLPSIPLV	1.398	19
279	SSFADISNL	1.187	20

5

Tabla 2b

10 Péptidos 10mer derivados de TOMM34 que se acoplan a HLA-A02

15

20

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	puntaje	SEQ ID NO
143	KLPSiPLVPV	559.894	21
97	ALEKyPMAYV	56.309	22
79	ALVPfSIKPL	49.134	23
237	YLVLkQYTEA	34.279	24
135	SLGPeWRLKL	21.362	25
219	SLLCsNLESA	20.716	26
238	LVLKqYTEAV	18.757	27
127	RMTRaLMDSL	17.388	28
113	QIDDnVTSAV	15.684	29
241	KQYTeAVKDC	12.975	30
30	ALYGrALRVL	12.893	31
220	LLCSnLESAT	12.668	32
195	VLKEcGNELV	8.314	33
112	LQIDdNVTSA	8.075	34
194	RVLKeEGNEL	6.916	35
299	KLRQcVKQNL	5.682	36
141	RLKLpSIPLV	5.599	37
160	SLPSeNHKEM	4.968	38
175	KETTtTKNRV	4.733	39
186	SAGDvEKARV	3.961	40

La posición inicial indica el número de residuo de aminoácidos de la terminal N de TOMM34.

25

El puntaje de acoplamiento se deriva de "BIMAS".

Inducción de CTL con los péptidos pronosticados de TOMM34 restringidos con HLA-A*0201

Se generaron los CTLs de los péptidos derivados de TOMM34 de acuerdo con los protocolos descritos en "Materiales y Métodos". Se determinó la actividad CTL específica de los péptidos de conformidad con un ensayo ELISPOT con IFN-gamma (Figuras 1a-1d). Los siguientes números de pozo demuestran producción IFN-gamma potente como se compara con los pozos de control: pozo número #4 con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1) (a), en #2 con TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5) (b), en #4 con TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31) (c), y en #2 con TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32). Por otro lado, no se determinó la actividad CTL específica por estimulación con otros péptidos mostrados en la Tabla 2a y 2b, a pesar de que aquellos péptidos tienen actividad de enlace posible con HLA-A*0201. Como un caso típico de datos negativos, la producción IFN-gamma específica no se observó del CTL estimulado con TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID NO: 21) (e). Como un resultado, esto indica que 4 péptidos derivados de TOMM34 se seleccionaron como los péptidos que pueden inducir CTLs potentes.

Establecimiento de las líneas de CTL y clon contra el péptido derivado de TOMM34

Las células que presentaron una actividad CTL específica del péptido detectada de conformidad con el ensayo ELISPOT con IFN-gamma en el pozo número #4 con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1) se expandió y la línea CTL se estableció por procedimiento de expansión como se describe en la sección de arriba "Materiales y Métodos". Se determinó la actividad CTL de estas líneas de CTL de conformidad con el ensayo ELISA con

000131

IFN-gamma (**Figuras 2**). La línea de CTL demostró tener una potente producción de IFN-gamma contra las células objetivo cargadas con el correspondiente péptido, en comparación con las células objetivo sin carga peptídica. Adicionalmente, se estableció el clon CTL mediante la limitación de la dilución de la línea CTL conforme se describe en "Materiales y Métodos" y se determinó la producción de IFN-gamma del clon CTL contra las células objetivo cargadas con los péptidos de conformidad con un ensayo ELISA con IFN-gamma. Se determinaron potentes producciones de IFN-gamma en los clones CTL estimulados con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1) (**Figura 3**).

Actividad CTL específica contra las células objetivo que expresan a TOMM34 y HLA-A*0201

La línea CTL establecida formulada contra el péptido TOMM-34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1) se examinó por la capacidad para reconocer a las células objetivo que expresan a TOMM34 y la molécula HLA-A*0201. Se prepararon células COS7 transfectadas con tanto la longitud total de gen TOMM34 y HLA-A *201 (un modelo específico para las células objetivo que expresa el gen TOMM34 y HLA-A *0201) como células estimuladoras, y las células COS7 transfectadas con ya sea longitud completa de TOMM34 o HLA-A* 0201 se usaron como los controles. En la **Figura 4**, la línea CTL estimulada con TOMM34-A022-9-30 (SEQ ID NO: 1) demuestra tener una potente actividad CTL contra las células COS7 que expresan a tanto TOMM34 como HLA-A*0201. Por otro lado, no se detectó

actividad CTL específica significativa alguna contra los controles. En consecuencia, estos datos claramente demuestran que TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1) se procesó y presentó endógenamente en las células objetivo con la molécula HLA-A*0201 y se reconoció por los CTLs. Estos resultados indican que este péptido derivado de TOMM34 pudiese ser utilizado como una vacuna contra el cáncer en el tratamiento de los pacientes con tumores que expresan a TOMM34.

10 Análisis de la homología de los péptidos antigénicos

Los CTLs estimulados con TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31) y TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32) demostraron tener una actividad CTL significativa y específica. Este resultado puede deberse al hecho que la secuencia de TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31) y TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32) son homólogas a la del péptido derivado de otras moléculas que se sabe sensibilizan al sistema inmunitario humano. Para excluir esta posibilidad, se llevaron a cabo análisis de la homología con estas secuencias de péptidos utilizando como interrogante el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) el cual no reveló secuencia alguna con una homología significativa. Los resultados de los análisis de la homología indican que la secuencia de TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO: 1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO: 5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO: 31) y TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO: 32) son únicas y que, por ende, a

nuestro mejor saber y entender, es poco probable que estas moléculas conlleven a una respuesta inmunológica no intencional a alguna molécula no relacionada. En conclusión, se identificaron novedosos péptidos de epítipo HLA-A*0201
5 derivados de TOMM34. Adicionalmente, los resultados en la presente demuestran que los péptidos de epítipo de TOMM34 pueden ser utilizados en la inmunoterapia del cáncer.

Aplicabilidad Industrial

10 La presente invención proporciona nuevos TAAs, en particular aquellos derivados de TOMM34 que pueden inducir respuestas inmunológicas anti-tumorales potentes y específicas y que tienen aplicabilidad en una amplia variedad de tipos de cáncer. Estos TAAs pueden ser de utilidad como
15 vacunas peptídicas contra las enfermedades asociadas con TOMM34, por ejemplo, el cáncer, más particularmente, cáncer de vesícula, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC,
20 NSCLS y tumor de tejido suave

Aun cuando aquí se describe en detalle la presente invención haciendo referencia a sus aplicaciones específicas, se entenderá que la descripción que antecede es ilustrativa y de naturaleza explicativa y que se prevé que ilustre la
25 presente invención y sus aplicaciones preferentes. A través de la experimentación de rutina, aquellos con experiencia en esta técnica fácilmente apreciarán que se puede efectuar diversos cambios y modificaciones sin alejarse del espíritu y

alcance de la presente invención, cuyos objetivos y límites son definidos por las reivindicaciones adjuntas.

NOVEDAD DE LA INVENCION

- 5 Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado caracterizado porque es seguido por (a) o (b):

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

(b) un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos en la cual uno, dos, o varios aminoácidos se
10 sustituyen, eliminan, insertan o agregan a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1, 5, 31 y 32 para proporcionar un péptido modificado que mantiene la capacidad de enlazar a un antígeno HLA e inducir la capacidad de inducción de los linfocitos T
15 citotóxicos (CTL).

2. El péptido aislado de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el antígeno HLA es HLA-A2.

3. El péptido aislado de conformidad con las
20 reivindicaciones 1 hasta 2, caracterizado porque el péptido es un nonapéptido o decapeptido.

4. El péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 3, caracterizado porque tiene al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste de:

25 (a) el segundo aminoácido de la terminal N es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de leucina y metionina, y

(b) el aminoácido de terminal C es o se modifica para

000136

ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de valina y leucina.

5. El polinucleótido aislado caracterizado porque codifica el péptido de conformidad con cualquiera de una de
5 las reivindicaciones 1 hasta 4.

6. Una composición para inducir una CTL, caracterizada porque la composición comprende uno o más péptidos de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4, o uno o más polinucleótidos de conformidad con la
10 reivindicación 5.

7. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende:

(a) uno o más péptidos de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4;

15 (b) uno o más polinucleótidos de conformidad con la reivindicación 5;

(c) una o más APCs o exosomas que presentan un complejo del péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4 y un antígeno HLA sobre su
20 superficie; o

(d) una o más CTLs que reconocen una célula que presenta un complejo del péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4 y un antígeno HLA sobre su superficie, en combinación con un portador farmacéuticamente
25 aceptable,

formulado para un propósito seleccionado del grupo que consiste de:

(i) tratamiento de un cáncer existente,

000137

(ii) profilaxis de un cáncer,

(iii) prevención de una recurrencia post-operativa de un cáncer, y

(iv) combinaciones de los mismos.

5 8. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque se formula para administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2.

9. Un método para inducir una célula que presenta el antígeno (APC) con capacidad de inducción de CTL,
10 caracterizado porque comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste de:

(a) poner en contacto un APC con el péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1
15 hasta 4 in vitro, ex vivo o in vivo, y

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

10. Un método para inducir un CTL, caracterizado porque
20 comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste de:

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

25 (b) co-cultivar una célula T CD8-positiva con un exosoma, que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicación 1 hasta 4, y

(c) introducir en una célula T un polinucleótido/polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la subunidad del receptor de célula T (TCR), en donde el TCR formado por los polipéptidos de la subunidad TCR es capaz de enlazar a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4 sobre su superficie celular.

11. Un APC aislado, caracterizado porque presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de conformidad con cualquiera de unas de las reivindicaciones 1 hasta 4.

12. El APC de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque se induce por un método para inducir una célula presentadora de antígeno (APC) con capacidad de inducción de los CTL, que comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste de:

(a) poner en contacto un APC con el péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4 in vitro, ex vivo o in vivo, y

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

13. Un CTL aislado caracterizado porque dirige el péptido de conformidad con cualquiera de unas de las reivindicaciones 1 hasta 4.

14. El CTL de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque se induce por un método para inducir una

célula presentadora de antígeno (APC) con capacidad de inducción de los CTL que comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste de:

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

10 (b) co-cultivar una célula T CD8-positiva con un exosoma, que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4, y

(c) introducir en una célula T un polinucleótido que codifica los polipéptidos de la subunidad del receptor de
15 célula T (TCR), en donde el TCR formado por los polipéptido de subunidad TCR es capaz de enlazar a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4 sobre una superficie celular.

20 15. Un método para inducir una respuesta inmunitaria contra cáncer en un sujeto, caracterizado porque comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, o un
25 polinucleótido que codifica el péptido o el fragmento.

16. Un vector caracterizado porque comprende una secuencia de nucleótido que codifica el péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1

hasta 4.

17. Una célula hospedera, caracterizada porque está transformada o transfectada con el vector de conformidad con la reivindicación 16.

5 18. Un exosoma que presenta un complejo, caracterizado porque comprende el péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4 y un antígeno HLA.

19. El anticuerpo contra el péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4, o
10 fragmento inmunológicamente activo del mismo.

20. Un kit de diagnóstico, caracterizado porque comprende el péptido de conformidad con cualquiera de una de las reivindicaciones 1 hasta 4, el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 5 o el anticuerpo o
15 fragmento inmunológicamente activo de conformidad con la reivindicación 19.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona péptidos aislados o fragmentos derivados de SEQ ID NO: 42, que enlazan a un antígeno HLA e inducen linfocitos T citotóxicos (CTL). Los
5 péptidos pueden incluir una de las secuencias de aminoácidos anteriormente mencionadas con la sustitución, eliminación, inserción, o adición de uno, dos, o varias secuencias de aminoácido. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas y métodos para tratar el cáncer
10 que incluyen tales péptidos. Los péptidos de esta invención pueden usarse para tratar cáncer.

000142

TOMM34 -A02-9-30 TOMM34 -A02-9-220 TOMM34 -A02-10-30 TOMM34 -A02-10-220 TOMM34 -A02-10-143

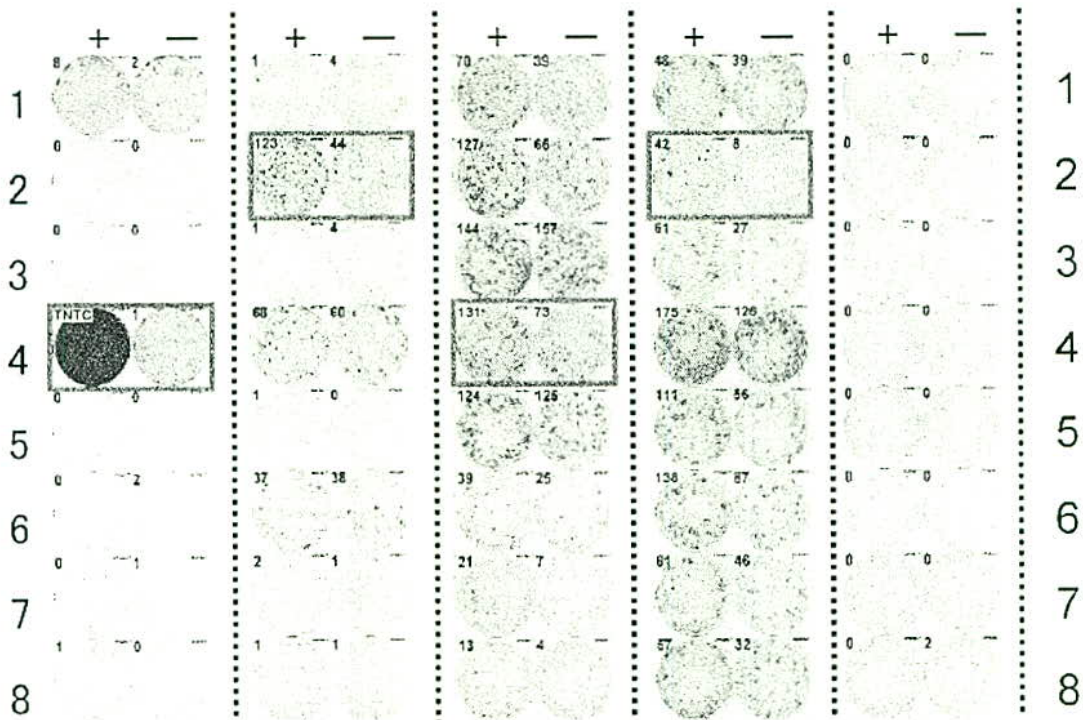


Fig. 1a

Fig. 1b

Fig. 1c

Fig. 1d

Fig. 1e

TOMM34-A02-9-30 #4

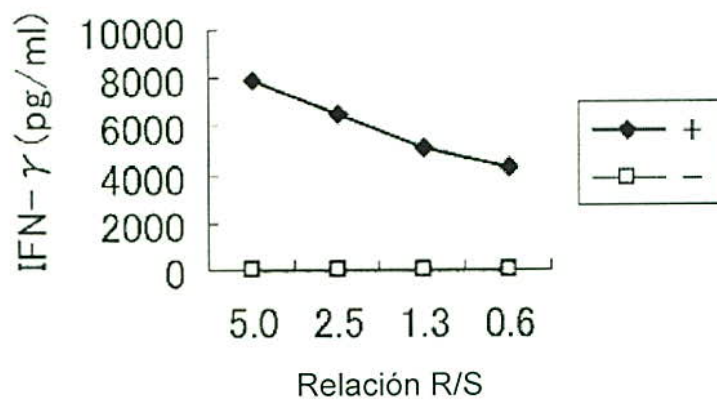


Fig. 2

TOMM34-A02-9-30 #4-105

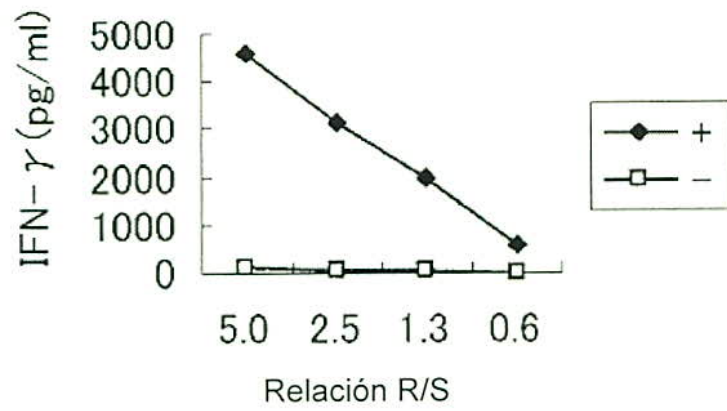


Fig. 3

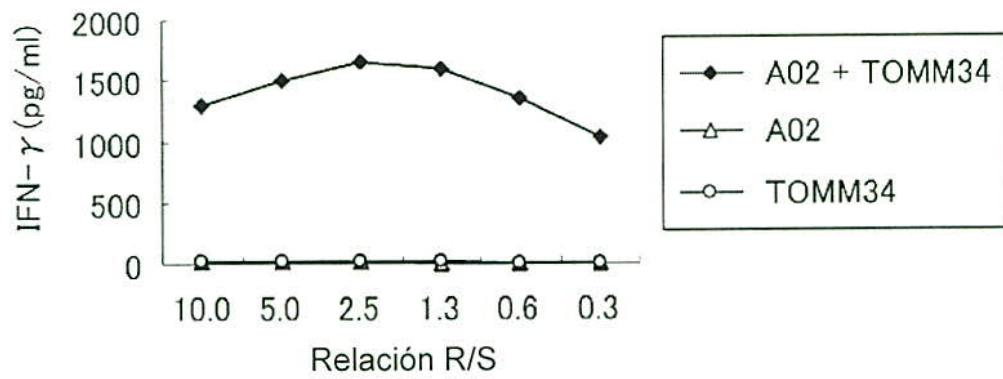
TOMM34-A02-9-30
Línea CTL

Fig. 4

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDOS TOMM34 Y VACUNAS QUE LOS INCLUYEN

<130> ONC-A1035P

<150> US 61/419,181

<151> 2010-12-02

<160> 46

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 1

Ala Leu Tyr Gly Arg Ala Leu Arg Val
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 2

Ala Leu Ala Leu Val Pro Phe Ser Ile
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 3

Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ala Ala Cys
1 5

2

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 4

Thr Val Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 5

Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 6

Tyr Ser Asn Arg Ala Leu Cys Tyr Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 7

Met Ala Tyr Val Asp Tyr Lys Thr Val
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 8

Leu Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 9

Lys Leu Asp Gly Lys Asn Val Lys Ala
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 10

Gly Gln Tyr Ala Glu Ala Ser Ala Leu
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 11

Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
<400> 12

Val Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
<400> 13

Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
<400> 14

Met Ala Pro Lys Phe Pro Asp Ser Val
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
<400> 15

Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala
1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 16

Ala Leu Lys Leu Asp Gly Lys Asn Val
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 17

Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 18

Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val Pro Val
 1 5

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 19

Leu Lys Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val
 1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 20

Ser Ser Phe Ala Asp Ile Ser Asn Leu
1 5

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 21

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

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 22

Ala Leu Glu Lys Tyr Pro Met Ala Tyr Val
1 5 10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 23

Ala Leu Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu
1 5 10

7

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 24

Tyr Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala
1 5 10

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 25

Ser Leu Gly Pro Glu Trp Arg Leu Lys Leu
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 26

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

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 27

Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val
1 5 10

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 28

Arg Met Thr Arg Ala Leu Met Asp Ser Leu
 1 5 10

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 29

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

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 30

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

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 31

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

<210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 32

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

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 33

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

<210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 34

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

<210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 35

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

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 36

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

<210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 37

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

<210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 38

Ser Leu Pro Ser Glu Asn His Lys Glu Met
 1 5 10

<210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada
 <400> 39

Lys Glu Thr Thr Ala Thr Lys Asn Arg Val
 1 5 10

<210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

<400> 40

Ser Ala Gly Asp Val Glu Lys Ala Arg Val
 1 5 10

<210> 41
 <211> 2066
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 aggtctcgca ggccccgccc cctcgccgcg ggttcgctgt tgggaggaga tttcgccgc 60
 cggcgcttgc gcccggaagg tgtgccgcac cacacggggg aggaaggaa gagctccaa 120
 ctgcggggc tggccacggg atggcccca aattcccaga ctctgtggag gagctccgc 180
 ccgcccga tgagagtttc cgcaacggcc agtacgccga ggctccgcg ctctacggcc 240
 gcgcgctgcg ggtgctgcag gcgaagggt cttcagacc agaagaaga agtggttctt 300
 actccaaccg agcagcatgt cacttgaagg atggaaactg cagagactgc atcaaagatt 360
 gcacttcagc actggccttg gttcccttca gcattaagcc cctgctgagg cgagcatctg 420
 cttatgaggc tctggagaag taccctatgg cctatgttga ctataagact gtgctgcaga 480
 ttgatgataa tgtgacgtca gccgtagaag gcatcaacag aatgaccaga gctctcatgg 540
 actcgcttgg gcctgagtg cgctgaagc tgccctcaat ccccttggtg cctgtttcag 600
 ctcaagaag gtggaattcc ttgccttcgg agaaccacaa agagatggct aaaagcaaat 660
 ccaaagaaac cacagctaca aagaacagag tgccttctgc tggggatgtg gagaaagcca 720
 gagttctgaa ggaagaaggc aatgagcttg taaagaaggg aaaccataag aaagctattg 780
 agaagtacag tgaagcctc ttgtgtagta acctggaatc tgccacgtac agcaacagag 840
 cactctgcta tttggtcctg aagcagtaca cagaagcagt gaaggactgc acagaagccc 900
 tcaagctgga tggaagaac gtgaaggcat tctacagacg ggctcaagcc cacaagcac 960
 tcaaggacta taaatccagc ttgcagaca tcagcaacct cctacagatt gagcctagga 1020

atggtcctgc acagaagttg cggcaggaag tgaagcagaa cctacactaa aaacccaaca 1080
 gggcaactgg aaccctgcc tgaccttacc cagagaagcc atgggccacc tgctctgtgc 1140
 ccgctcctga aaccagcat gccccaagtg agctctgaag cccctcctc aatcccttga 1200
 tggcctccca cctgtaaga ggctttgctt gttcaaatta aactcagtgt agtcaaacac 1260
 agacatggtt gttgcaccag aaagggtccc actagagcta agcgtgaagc tgaagctctg 1320
 tcctattcc cccagcccag ctagctgata acaccaacag atcctcatca gcaaagcatt 1380
 tggctttgtc ctgcccagt gggctgcaga ctgagtgtgc ccttgtagc ttcccagac 1440
 cccaactcac tgcagttcat ctgaacaacc tgagctcctg ggccggggtg gaaggagggg 1500
 gataaaccta aggcctgat ccaaagcagc ctggtgagct ggttctccag ggctgcagtc 1560
 tctccaggtg tacagctgct gtccctgcc tgcctgtcc ttgcacagtc tcctatgtct 1620
 gagccccagt gccttctgtt cgggcccctc tttgggtggga aggcagagcc ctgacccttg 1680
 aatggttgct ctgactctg tgctgctgcc ttctgcagag aggcacctaa gctgtttaa 1740
 gagcccagtg attgtggctg ctctcctag aggtgggagg gggcaagagg cctccttggt 1800
 cagtgtccat gctttctggg cagggaactg gtttttgtt ccaacagtgg ccttctccgg 1860
 gcttcatagt tctttgtaat atgttgaagt taatttgaat tgactgattt tgttgaactg 1920
 tgtgtttaag ctgttgcat aaaaagctt cttctacatc aatatctgct gtgctttcat 1980
 ttatgccttt tcagctttgc acctggaact ctgtagtaat aataaaagtt attgcttatt 2040
 gggcattcaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2066

<210> 42
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Met Ala Pro Lys Phe Pro Asp Ser Val Glu Glu Leu Arg Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Asn Glu Ser Phe Arg Asn Gly Gln Tyr Ala Glu Ala Ser Ala Leu Tyr
 20 25 30

Gly Arg Ala Leu Arg Val Leu Gln Ala Gln Gly Ser Ser Asp Pro Glu
 35 40 45

Glu Glu Ser Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ala Ala Cys His Leu Lys Asp
50 55 60

Gly Asn Cys Arg Asp Cys Ile Lys Asp Cys Thr Ser Ala Leu Ala Leu
65 70 75 80

Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu Leu Arg Arg Ala Ser Ala Tyr Glu
85 90 95

Ala Leu Glu Lys Tyr Pro Met Ala Tyr Val Asp Tyr Lys Thr Val Leu
100 105 110

Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala Val Glu Gly Ile Asn Arg Met
115 120 125

Thr Arg Ala Leu Met Asp Ser Leu Gly Pro Glu Trp Arg Leu Lys Leu
130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Gln Asn Leu His
 305

<210> 43
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 43
 gtctaccagg cattcgcttc at

22

<210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 44
 tcagctggac cacagccgca gcgt

24

<210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 45
 tcagaaatcc tttctcttga c

21

<210> 46
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

000150

<400> 46
ctagcctctg gaatcctttc tctt

000/59

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
7 June 2012 (07.06.2012)



(10) International Publication Number
WO 2012/073459 A1

(51) International Patent Classification:

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

(21) International Application Number:

PCT/JP2011/006551

(22) International Filing Date:

25 November 2011 (25.11.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/419,181 2 December 2010 (02.12.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. [JP/JP]; 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 2130012 (JP).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): NAKAMURA, Yusuke [JP/JP]; c/o The Institute of Medical Science, THE UNIVERSITY OF TOKYO, 6-1, Shirokanedai 4-chome, Minato-ku, Tokyo, 1088639 (JP). TSUNODA, Takuya [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 2130012 (JP). OSAWA, Ryuji [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 2130012 (JP). YOSHIMURA, Sachiko [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 2130012 (JP). WATANABE, Tomohisa [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa,

2130012 (JP). NAKAYAMA, Gaku [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 2130012 (JP).

(74) Agents: SHIMIZU, Hatsushi et al.; Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, Ibaraki, 3000847 (JP).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: TOMM34 PEPTIDES AND VACCINES INCLUDING THE SAME

(57) Abstract: The present invention provides isolated peptides or the fragments derived from SEQ ID NO: 42, which bind to an HLA antigen and induce cytotoxic T lymphocytes (CTL). The peptides may include one of the above mentioned amino acid sequences with substitution, deletion, or addition of one, two, or several amino acids sequences. The present invention also provides pharmaceutical compositions including these peptides. The peptides of this invention can be used for treating cancer.

WO 2012/073459 A1

000 60

Clark, Modet & C^o
COLOMBIA

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 -Fax: (57 1) 6350824 -Email: info@clarkmodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de
ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en 2-1,
Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012,
Japón.

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Kensuke Tomita

President and CEO

legal representative(s) of ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

an organization existing under the laws of
JAPAN

and in present execution of its business activity, domiciled 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012, Japan.

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at

on this 30 day of April of 2010


Firma / signature

000181

Yo, **DILIA RODRÍGUEZ D' ALEMAN**, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53 Piso 6, Edificio Segovia Bogotá, Colombia, atentamente informo a usted que sustituyo el poder con que obro a la doctora **SILVANA MARÍA LÓPEZ DÍAZ**, domiciliada en Bogotá, identificada con la Cédula de Ciudadanía No. 22.468.787 y portadora de la tarjeta profesional No. 147.463 del CSJ, con las mismas facultades con que me fueron conferidas para este caso.

Muy atentamente,



DILIA RODRIGUEZ D' ALEMAN
C.C. 41.654.882 de Bogotá
TP 20824 CSJ

Acepto sustitución

SILVANA MARÍA LÓPEZ DÍAZ
C.C. No. 22.468.787
TP 147463 CSJ

PRESENTACION PERSONAL

El anterior escrito fue presentado ante el
NOTARIO ONCE DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.
personalmente por Dña. Rodríguez
D. Almon
quien exhibió la c.c. 41654882 Bogotá
y Tarjeta Profesional No. 20824 C.S.J.
Fecha 18 JUN 2013

Guillermo Chávez Cristancho
NOTARIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

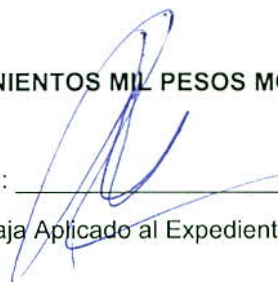
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0063522
		Bogotá D.C., Junio 27 de 2013 - 11:43:41

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	559956051	27/06/2013	74.410.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			\$500.000.00
=====			

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-155530- -00000-0000
Fecha: 2013-07-02 15:07:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 164

000163 

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0064764
		Bogotá D.C., Julio 02 de 2013 - 09:31:32

RECIBIDO DE : CLARKE MODET		NI 83.008.643			
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	63596	27/06/2013		320.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
10 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	300.000.00
				\$300.000.00
=====				

SON: **TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-155530- -00000-0000
Fecha: 2013-07-02 15:07:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 164

000164



No. 13-155530- -00000-0000

Fecha: 2013-07-02 15:07:40 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 164

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO I

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐