



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 077**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/07** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07745372 .8**

96 Fecha de presentación : **15.06.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2030984**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2009**

54 Título: **Péptido antígeno anticáncer derivado de SPARC y composición farmacéutica que comprende el mismo.**

30 Prioridad: **16.06.2006 JP 2006-167724**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.09.2011**

73 Titular/es: **ONCO THERAPY SCIENCE, Inc.**  
**2-1, Sakado 3-chome**  
**Takatsu-ku, Kawasaki-shi Kanagawa 213-0012, JP**

72 Inventor/es: **Nishimura, Yasuharu;**  
**Ikuta, Yoshiaki y**  
**Nakatsuru, Shuichi**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 365 077 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Péptido antígeno anticáncer derivado de SPARC y composición farmacéutica que comprende el mismo

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos que son eficaces como vacuna contra cánceres que expresan SPARC en gran medida, tales como el cáncer de estómago, cáncer de páncreas o el melanoma maligno (melanoma), y a medicamentos que comprenden los péptidos mencionados anteriormente utilizados para el tratamiento y/o la prevención de tumores.

**Estado de la técnica**

10 En comparación con los países occidentales, la morbilidad del cáncer de estómago es alta en los países asiáticos como Japón y China. Como resultado de la difusión de los exámenes médicos, el uso generalizado de endoscopios digestivos, y el desarrollo de técnicas de inspección, se ha hecho posible detectar el cáncer de estómago en una fase temprana y, por lo tanto, el número de pacientes que padecen este tipo de cáncer ha ido disminuyendo. No obstante, el cáncer de estómago sigue siendo la segunda causa de muerte debida a neoplasia maligna en la población japonesa. Por lo tanto, el cáncer de estómago es todavía la principal causa de muerte. Entre los diversos tipos de cánceres de estómago, el cáncer de estómago difuso (escirro) se produce en la gente joven en comparación con otro tipo de cáncer de estómago (adenocarcinoma). Dicho cáncer de estómago difuso (escirro) tiende a progresar rápidamente, y la metástasis a distancia o la metástasis peritoneal se produce con frecuencia, dando como resultado un mal pronóstico. En muchos casos de cáncer de estómago escirro, ya ha llegado a ser imposible llevar a cabo la extirpación quirúrgica en el momento del diagnóstico. Incluso si todavía es posible extirpar el tumor, el cáncer a menudo vuelve a aparecer después del tratamiento. En consecuencia, es muy deseable introducir un nuevo método de tratamiento.

25 El número de muertos por cáncer de páncreas tiende a aumentar en Japón. 21.148 personas murieron debido a un cáncer de páncreas en 2003. En la actualidad, dicho cáncer de páncreas constituye un 6,8% de los cánceres que causan la muerte en Japón. Es decir, el cáncer de páncreas ocupa la quinta causa de muerte después del cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de colon y cáncer de hígado. Los datos demográficos en el mundo se analizaron, y se calculó la tasa de mortalidad ajustada por edad, que se utiliza para la comparación entre las tasas de mortalidad de poblaciones con diferentes estructuras de edad. Como resultado, en 2000, en el caso de 100.000 hombres, 8,6 personas murieron en Japón debido a un cáncer de páncreas, mientras que 7,3 personas murieron en los Estados Unidos y de 6,3 a 7,0 personas murieron en el Reino Unido debido al mismo tipo de cáncer. En el caso de cada 100.000 mujeres, 4,9 personas murieron debido a un cáncer de páncreas en Japón, mientras que 5,3 personas murieron en los Estados Unidos y de 4,8 a 5,1 personas murieron en el Reino Unido debido al mismo tipo de cáncer. Así, la tasa de mortalidad por cáncer de páncreas en Japón ha llegado a estar al mismo nivel que las de los países occidentales.

35 Teniendo en cuenta la tasa ajustada por edad en 2000 (100.000 personas de la población mundial), en el caso de los varones, 8,6 personas murieron debido a un cáncer de páncreas en Japón, mientras que 7,3 personas murieron en los Estados Unidos y de 6,3 a 7,0 personas murieron en el Reino Unido debido al mismo tipo de cáncer. Además, en el caso de las mujeres, 4,9 personas murieron debido a un cáncer de páncreas en Japón, mientras que 5,3 personas murieron en los Estados Unidos y de 4,8 a 5,1 personas murieron en el Reino Unido debido al mismo tipo de cáncer. Así, la tasa de mortalidad por cáncer de páncreas en Japón ha llegado a situarse al mismo nivel que las de los países occidentales. A pesar del desarrollo de diagnóstico por la imagen, en la actualidad, aproximadamente el 40% del total de pacientes japoneses con cáncer de páncreas padecen de cáncer de páncreas progresivo que implica metástasis a distancia, y además, también hay muchos casos donde se descubre el cáncer, después de alcanzar un etapa del cáncer localmente avanzado, en el que tumor no puede ser extirpado. La tasa de supervivencia relativa a 5 años de la totalidad de pacientes con cáncer de páncreas es de 4,3% en los casos de diagnóstico en 1996. Aunque esta tasa tiende a ser más alta que la tasa de supervivencia convencional (2% a 3%), sigue siendo baja. En cuanto a los factores de desarrollar cáncer de páncreas, se ha sugerido que diversos factores como hábito de vida como el tabaquismo, adiposidad, comidas, beber alcohol y café, así como la pancreatitis crónica, la diabetes, los factores genéticos, etc. están implicados en la aparición de cáncer de páncreas.

50 El cáncer de páncreas no tiene síntomas específicos, y por lo tanto, en muchos casos, el cáncer ya ha progresado cuando aparecen ciertos síntomas. Como resultado, la tasa de supervivencia a 5 años de la totalidad de pacientes es de 5% o menos, y el pronóstico después del diagnóstico es sumamente baja. Debido a la dificultad en el diagnóstico de cáncer de páncreas, la tasa de este cáncer como una enfermedad causante de muerte por cáncer se incrementa gradualmente en particular en los países avanzados. En la actualidad, se ha llevado a cabo la terapia multidisciplinaria que incluye la extirpación quirúrgica como tratamiento principal, una radioterapia, y una quimioterapia. Sin embargo, no se puede obtener ninguna mejora drástica de los efectos terapéuticos, y por lo tanto, la introducción de una nueva estrategia terapéutica es urgentemente necesario.

El melanoma es un tipo de cáncer de piel, que a menudo se denomina melanoma maligno. Entre los varios tipos de cánceres de piel, el melanoma es altamente probable que se vuelva infiltrante y metastásico y tiene el grado más

5 alto de malignidad, por lo que es muy temido. Entre las células que constituyen la piel, las células generan el pigmento melanina. Estas células se llaman melanocitos. Cuando dichos melanocitos se vuelven cancerosos, se produce el melanoma. Además, la frecuencia de aparición del melanoma ha ido en aumento, especialmente entre los caucásicos, como un resultado de un aumento de la exposición a los rayos ultravioleta, debido a una reducción de la capa de ozono en la atmósfera causado por la destrucción del medio ambiente.

10 En Japón, el número de casos de melanoma varía de 1,5 a 2 personas por cada 100.000 en la población general. Por lo tanto, se estima que aproximadamente de 1.500 a 2.000 personas desarrollan melanoma al año. Por otra parte, en los países occidentales, más de una docena de personas desarrollan melanoma por cada 100.000 en la población general. En particular, en Australia, veinte o más personas desarrollan melanoma, por cada 100.000 en la población general, y por lo tanto se sabe que el número de casos del melanoma en Australia es el más alto del mundo. En tales circunstancias, las personas que viven en Europa, Estados Unidos y Australia están interesados en el melanoma, y prestan atención a la aparición del melanoma. Además, sorprendentemente, la aparición del melanoma tiende a ser cada vez mayor año tras año en Japón, así como en el extranjero. Según estudios recientes, el número de muertes por melanoma es de aproximadamente 450 en Japón. El melanoma se desarrolla independientemente de la edad. Sin embargo, el número de casos de esta enfermedad se incrementa para los mayores de 40 años, y es el más alto para las personas de 60 a 70 años y de 70 a 80 años. La aparición de esta enfermedad en la infancia es sumamente rara, pero esto no significa que la enfermedad nunca se desarrolle en la infancia. Recientemente, la aparición del melanoma tiende a ser cada vez mayor en los pacientes jóvenes en los 20 años y los 30 años. El melanoma se desarrolla independientemente del sexo, y tanto los pacientes masculinos como femeninos padecen esta enfermedad. En el caso de pacientes japoneses, el sitio en el que el melanoma es el más probable que se desarrolle es en la planta (la planta del pie), y representa el 30% de todos los casos de melanoma. Como características de los pacientes japoneses, el melanoma se desarrolla también en los pies y partes de las uñas de los dedos. Además, como en el caso de los pacientes occidentales, el melanoma se desarrolla en todas las partes de la piel, tales como el cuerpo, manos, pies, cara y cabeza.

25 En la actualidad, los métodos que se pueden aplicar para tratar el melanoma incluyen un tratamiento quirúrgico, una quimioterapia, y una radioterapia. Sin embargo, como terapia para aliviar los síntomas del cáncer metastásico o cáncer intratable, al que la terapia anterior no puede aplicarse, una inmunoterapia para mejorar la inmunidad de un paciente de cáncer al cáncer a fin de suprimir el crecimiento del cáncer se ha convertido en un foco de atención. Este tipo de inmunoterapia es realmente efectiva para algunos pacientes.

30 Por otra parte, con el desarrollo de la biología molecular e inmunología de tumores en los últimos años, se ha puesto de manifiesto que los linfocitos T citotóxicos (matadores) y los linfocitos T cooperadores reconocen los péptidos generados por la degradación de las proteínas muy y específicamente expresadas en las células cancerosas, que son presentadas en la superficie de las células cancerosas o células presentadoras de antígenos a través de las moléculas HLA, y que presentan una reacción inmunitaria para destruir dichas células cancerosas. Por otra parte, un gran número de proteínas y péptidos antigénicos tumorales derivados de ellas, que estimulan dicha reacción inmunitaria para atacar cánceres, han sido identificados, y la aplicación clínica de una inmunoterapia tumoral específica para el antígeno se ha avanzado.

40 Las moléculas HLA de clase I se expresan en las superficies de todas las células nucleadas en un cuerpo. Las proteínas generadas en los citoplasmas y los núcleos proporcionan péptidos generados como resultado de degradarse en las células, y que se expresan en la superficie de estas células. En las superficies de las células normales, los péptidos derivados de proteínas autólogas normales se unen a las moléculas HLA de clase I, y los linfocitos T del sistema inmunológico ni reconocen ni destruyen dichos péptidos unidos a moléculas HLA de clase I. Por otra parte, en un proceso en el que las células cancerosas se convierten en un cáncer, dichas células cancerosas pueden expresar grandes cantidades de proteínas, que apenas son expresadas o se exponen únicamente en pequeñas cantidades en las células normales. Si un péptido generado por la degradación en el citoplasma de dicha proteína que está muy expresada específicamente en una célula cancerosa se une a una molécula HLA de clase I y se expresa en la superficie de dicha célula cancerosa, un linfocito T matador reconoce el péptido y destruye sólo la célula cancerosa. Además, al inmunizar dicho antígeno o péptido específico del cáncer para una persona física, es posible destruir las células cancerosas y suprimir el crecimiento de un cáncer, sin afectar las células normales. Esto se conoce como inmunoterapia del cáncer utilizando un antígeno específico del cáncer. Por otra parte, una molécula HLA de clase II se expresa principalmente en la superficie de una célula presentadora de antígeno. Dicha molécula HLA de clase II se une a péptidos derivados de un antígeno específico del cáncer generado incorporando el antígeno específico del cáncer de fuera de la célula y degradándolo en la célula, y se expresa en la superficie de la célula. Un linfocito T colaborador, que ha reconocido los péptidos unidos a la molécula HLA de clase II, se activa para generar diversas citocinas que activan otras células inmunocompetentes, con el fin de provocar o reforzar una reacción inmunitaria contra un tumor.

50 Así, si una inmunoterapia dirigida a un antígeno específicamente que se expresa en un alto nivel en dicho cáncer puede desarrollarse, puede proporcionar un método terapéutico eficazmente eliminando el cáncer solo, sin alterar órganos autólogos normales. Por otra parte, se prevé que dicha inmunoterapia puede proporcionar un método terapéutico aplicable a pacientes que padecen un cáncer en la etapa terminal, para los cuales no puede aplicarse ningún otro tratamiento. Además, si un antígeno específico del cáncer y el péptido se administran en forma de vacuna a un ser humano con un alto riesgo de desarrollar un cáncer, existe la posibilidad de que se pueda prevenir

la aparición del cáncer.

En primer lugar, los presentes inventores han realizado un análisis de expresión génica en todo el genoma. Se han analizado 23.040 tipos de genes en los tejidos de cáncer de estómago y en los tejidos normales que utilizan un chip de ADNc. Como resultado, en 11 de los 20 casos de pacientes con cáncer de estómago infiltrante difuso, los inventores han identificado proteína segregada ácida y rica en cisteína (SPARC), que es un gen muy expresado en los tejidos de cáncer de estómago, y cuyo nivel de expresión es de 5 o más veces mayor que la de los tejidos normales (130.000 veces mayor en promedio) (Figura 1). El gen SPARC se expresa en un nivel bajo también en tejidos adiposos normales, la glándula mamaria, el ovario, la médula espinal, los testículos, el útero, la placenta, etc. Sin embargo, el nivel de expresión del gen SPARC en cualquiera de los órganos antes mencionados es inferior al de normal la membrana mucosa gástrica normal por un factor de 5 veces o menos (figura 2).

Otros investigadores ya había informado que SPARC no es sólo muy expresado en el cáncer de estómago infiltrante difuso, sino que se expresa también en el cáncer de páncreas y melanoma. Por otra parte, los presentes inventores han descubierto que SPARC se secreta en el suero de pacientes con melanoma, y que SPARC puede ser un marcador tumoral útil en particular para la detección precoz del melanoma (solicitud de patente japonesa número 2004-303688, y *Clinical Cancer Research* 11: 8079-8088, 2005).

SPARC es una proteína ácida secretora de 43 kDa que consiste en 286 aminoácidos. Esta proteína es rica en cisteína, y se desplaza al núcleo durante la fase de división celular. Además, SPARC controla la interacción entre una proteína extracelular de matriz y una célula, de modo que también puede estar asociada al control del crecimiento celular. Dado que SPARC se expresa en los osteoblastos, trombocitos y las áreas de la herida, se considera que esta proteína está asociada a la reparación y reconstrucción de los tejidos. Por otra parte, también ha publicado que SPARC se expresa mucho también en cánceres tales como el melanoma o el osteosarcoma y en las células intersticiales de los tumores, y que la expresión de SPARC se correlaciona con el pronóstico, la infiltración o metástasis de los tumores.

[Documento 1 no de patente] Ikuta Y. *et al.*, *Clinical Cancer Research* 11: 8079-8088, 2005.

[Documento 1 de patente] Solicitud de patente japonesa nº 2004-303688

### **Descripción de la invención**

Problemas que debe resolver la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en desarrollar un método para mejorar la inmunidad de un paciente con cáncer metastásico o cáncer intratable, para lo que se utilizan la terapia quirúrgica, la quimioterapia y la radioterapia como tratamientos para los tumores que expresan en gran medida a SPARC, tales como el de estómago infiltrante difuso, el cáncer de páncreas o el melanoma, apenas pueden aplicarse, a fin de aliviar los síntomas de dichos cánceres y a fin de llevar a cabo una inmunoterapia supresora del crecimiento de dichos cánceres. Es decir, un objetivo de la presente invención consiste en identificar un péptido procedente de una proteína SPARC que está sobreexpresado en el tejido canceroso, que es capaz de provocar una potente respuesta inmunitaria a los cánceres mencionados anteriormente sin producir fenómenos perjudiciales a los pacientes de cáncer, y aplicar el péptido identificado a una inmunoterapia del tumor. Es decir, un objetivo de la presente invención consiste en identificar un péptido derivado de la proteína SPARC que puede producir linfocitos T matadores y linfocitos T colaboradores humanos con reactividad a los tumores, y proporcionar un medio para llevar a cabo una inmunoterapia tumoral en pacientes con varios tipos de cánceres que expresan en gran medida SPARC.

Medios para solucionar los problemas

Los presentes inventores han identificado un gen, SPARC, que está muy expresado en el cáncer de estómago infiltrante difuso, mediante la realización de análisis de chip de DNA en el cáncer de estómago antes mencionado y varios tejidos normales. La expresión de SPARC se observa también en varios tipos de tejidos normales. Sin embargo, el nivel de expresión de SPARC en los tejidos normales es significativamente menor que en los tejidos cancerosos. A fin de examinar la presencia o ausencia de la inducción de inmunidad antitumoral por los linfocitos T matadores específicos de SPARC, se utilizaron ratones Balb/c que expresan moléculas de ratón K<sup>d</sup>, cuyas características de la secuencia de aminoácidos del péptido unido son idénticas a las de HLA-A24 que es el alelo de clase HLA más frecuente en la población japonesa. SPARC humano posee 95% de la secuencia de aminoácidos homóloga en comparación con el ratón SPARC. De este modo se sintetizaron los péptidos que consisten en secuencias de aminoácidos compartidas entre los seres humanos y los ratones, y que tienen un motivo de unión compartido por seres humanos HLA-A24 y el ratón K<sup>d</sup>. Después, se inmunizaron ratones BALB/c (Kd expresado) con dendrocitos procedentes de la médula ósea, en la que se había cargado una mezcla de péptidos, y los inventores investigaron si los linfocitos T matadores reactivos con células cancerosas que expresan SPARC se producen o no. Por otra parte, en relación con los ratones que habían sido previamente tratados por el mismo método de inmunización que el descrito anteriormente, los inventores investigaron si el crecimiento de las células cancerosas trasplantadas que expresan SPARC de ratón se suprime y el tiempo de supervivencia de los ratones se prolonga o no. Además, se examinó también si aparece o no un fenómeno nocivo junto con la aparición de un fenómeno autoinmunitario en ratones inmunizados con péptido. Como resultado, se encontró que el péptido que tiene la

secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ. ID. nº 1 a 3 es capaz de producir linfocitos T matadores que destruyen las células cancerosas expresan SPARC. Por otra parte, el crecimiento de las células cancerosas trasplantadas de ratón que expresan SPARC se suprime en los ratones inmunizados con el péptido mencionado y por lo tanto el tiempo de supervivencia de los ratones se prolonga. La presente invención se ha llevado a cabo sobre la base de estos resultados.

La presente invención proporciona la siguiente invención.

(1) Un péptido de entre cualquiera de los siguientes:

(A) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a nº 3; o

(B) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o dos aminoácidos con respecto al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a 3, y que tiene capacidad para producir linfocitos T citotóxicos (matadores).

(2) Un agente inmunológico para cánceres, que comprende al menos un tipo de péptido de (1).

(3) Un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de tumores, que comprende al menos un tipo de péptido de (1).

(4) Un péptido para la inducción de células presentadoras de antígeno que tiene gran capacidad de inducir a los linfocitos T reactivos con el tumor, que comprende al menos un tipo de péptido de (1).

(5) Un péptido para la inducción de linfocitos T reactivos con el tumor, que comprende al menos un tipo de péptido de (1).

(6) Un agente para la inducción de células presentadoras de antígeno que tiene gran capacidad de inducir linfocitos T reactivos con el tumor, que comprende un gen que codifica para un péptido de cualquiera de los siguientes:

(A) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC. ID. nº 1 a 3, o

(B) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o dos aminoácidos con respecto al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a nº 3, y que tiene capacidad para inducir linfocitos T matadores.

(7) Un linfocito T matador, un linfocito T colaborador, o una población inmunocitos que comprende dichas células, que se induce utilizando con el péptido de (1).

(8) Una célula presentadora de antígeno, que presenta un complejo de una molécula HLA y el péptido de (1).

(9) La célula presentadora de antígeno de (9), que se induce utilizando el agente de (4) o (6).

### **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

(1) Péptido de la presente invención, y el agente inmunológico para cánceres que comprende el mismo

El péptido de la invención se describe a continuación:

(A), un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a 3, o

(B) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a 3, y que tiene capacidad para inducir linfocitos T matadores.

La expresión de un péptido con actividad para estimular linfocitos T matadores reactivos con el tumor.

Un procedimiento para la obtención/producción del péptido de la invención no está particularmente limitado. Puede utilizarse un péptido sintetizado químicamente, o un péptido recombinante producido por recombinación genética.

Cuando se obtiene un péptido sintetizado químicamente, el péptido de la invención pueden sintetizarse por un método de síntesis química tal como un método Fmoc (método fluorenilmetiloxycarbonilo) o un método tBoc (método t-butiloxycarbonilo), por ejemplo. Además, el péptido de la invención también pueden sintetizarse utilizando varios tipos de sintetizadores de péptidos disponibles en el mercado.

Cuando el péptido de la invención se produce en forma de proteína recombinante, el ADN con una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido mencionado anteriormente, se obtiene un mutante del mismo o un homólogo del mismo, y entonces se introduce en un sistema de expresión preferido, para producir el péptido de la presente invención.

Como vector de expresión, puede utilizarse preferentemente un vector capaz de replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora o susceptible de ser incorporado en el cromosoma de una célula hospedadora. Se utiliza un vector de expresión que comprende un activador en una posición capaz de expresar un gen que codifica el péptido. Además, un transformante que tiene un gen que codifica el péptido de la presente invención puede producirse introduciendo el vector de expresión mencionado anteriormente en un hospedador. Como hospedador,

puede utilizarse cualquiera entre una bacteria, la levadura, una célula animal y una célula de insecto. Un vector de expresión se puede introducir en un hospedador de acuerdo con un método conocido, en función del tipo de dicho hospedador.

5 En la presente invención, se cultiva el transformante producido anteriormente, y el péptido de la invención se genera entonces y se acumula en un cultivo. Después, el péptido de la invención se recoge del cultivo, a fin de aislar un péptido recombinante.

10 Cuando dicho transformante es un procarionta tales como *Escherichia coli* o un eucariota tal como la levadura, un medio utilizado para el cultivo de tales microorganismos, pueden ser un medio natural o de un medio sintético, siempre y cuando contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y similares que puedan ser asimilados por los microorganismos antes mencionados, y es capaz de llevar a cabo eficazmente el cultivo del transformante. Por otra parte, dicho cultivo puede llevarse a cabo en condiciones que se aplican habitualmente para el cultivo de los microorganismos mencionados anteriormente. Una vez terminado el cultivo, el péptido de la presente invención puede aislarse y purificarse a partir del cultivo del transformante de acuerdo con un método habitual de aislamiento y purificación de péptidos.

15 La expresión "uno o varios aminoácidos" se utiliza en la presente memoria en el sentido generalmente de 1 a 10 aminoácidos, preferentemente de 1 a 8 aminoácidos, más preferentemente de 1 a 5 aminoácidos, y en particular preferentemente de 1 a 3 aminoácidos (por ejemplo, 1, 2 o 3 aminoácidos).

20 Un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o varios aminoácidos con respecto al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a nº 3 puede ser producido o adquirido apropiadamente por personas expertas en la materia basándose en la información sobre la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a nº 3. Es decir, un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEC. ID. nº 1 a nº 3, y que tiene capacidad para inducir a linfocitos T citotóxicas, puede ser producido por cualquier método conocido por personas expertas en la materia, tal como la síntesis química mencionada anteriormente, medios de ingeniería genética o mutagénesis. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida, que es un medio de ingeniería genética es útil porque es un medio para la introducción de una mutación específica en una posición específica. Dicha mutagénesis dirigida al sitio puede realizarse por un método descrito en la Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (en adelante abreviado como Molecular Cloning 2ª ed.), Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 1 a 38, John Wiley & Sons (1987-1997) (en adelante abreviado como Current Protocols in Molecular Biology), etc.

25 Como se describe más adelante en los ejemplos, el péptido ya mencionado de la presente invención es capaz de inducir inmunidad contra el cáncer. Por lo tanto, la presente invención proporciona un agente inmunológico para cánceres, que comprende el péptido de la presente invención.

35 El agente inmunológico de la presente invención utilizado para cánceres se utiliza *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, y con preferencia *ex vivo*, de modo que pueda inducir linfocitos T matadores, linfocitos T cooperadores, o una población de inmunocitos que comprende dichas células, impartiendo de este modo inmunidad contra el cáncer.

(3) Linfocitos T matadores, linfocitos T cooperadores, o una población de inmunocitos que comprende dichas células

40 La presente invención se refiere también a linfocitos T matadores, linfocitos T cooperadores o a una población de inmunocitos que comprende dichas células, que es inducida por estimulación *in vitro* utilizando el péptido de la presente invención. Por ejemplo, cuando los linfocitos de la sangre periférica o los linfocitos infiltrantes en el tumor se estimulan *in vitro* con el péptido de la presente invención, se inducen linfocitos T activados que presentan reactividad en el tumor. Por lo tanto los linfocitos T activados pueden utilizarse eficazmente para una inmunoterapia adoptiva del cáncer. Además, el péptido de la presente invención se deja que se exprese en los dendrocitos que son células fuertes presentadoras de antígeno *in vivo* o *in vitro*, y dendrocitos que expresan el péptido antigénico arc se administran a continuación para provocar una respuesta inmunitaria a los tumores.

45 Preferentemente, un linfocito T matador, un linfocito T colaborador o una población de inmunocitos que comprende dichas células pueden ser inducidos por estimulación *ex vivo* o *in vitro* utilizando el péptido de la presente invención y un inmunestimulante. Ejemplos de dicho inmunestimulante utilizado en la presente memoria incluyen un factor de crecimiento celular y una citocina.

50 El linfocito T matador, el linfocito T colaborador, o de la población de inmunocitos así obtenidos que comprende dichas células se transfiere a un cuerpo, de modo que el tumor puede suprimirse y el cáncer se puede prevenir y/o tratar.

55 Además, utilizando el péptido de la presente invención, se pueden producir un linfocito T matador, un linfocito T colaborador o una población de inmunocitos que comprende dichas células, que es capaz de suprimir el crecimiento tumoral como se describió anteriormente. Por consiguiente, la presente invención proporciona una solución de cultivo celular que comprende linfocitos T reactivos en el tumor y el péptido de la presente invención. Utilizando

dicha solución de cultivo celular, se pueden producir linfocitos T matadores, linfocitos T colaboradores o una población de inmunocitos que comprende dichas células, que es capaz de suprimir el crecimiento del tumor. Aún más, la presente invención también proporciona un kit de cultivo celular para producir linfocitos T matadores, linfocitos T colaboradores o una población de inmunocitos que comprende dichas células, que comprende la solución de cultivo celular mencionada anteriormente y un recipiente para el cultivo celular.

(4) Medicamento de la presente invención para tratamiento y/o prevención de tumores (vacuna contra el cáncer)

Dado que el péptido de la invención es capaz de inducir linfocitos T matadores específicos de células cancerosas, se puede esperar como agente para el tratamiento y/o prevención del cáncer. Por ejemplo, las bacterias tales como el BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), que se transformó con el ADN recombinante producido por la incorporación de un gen que codifica el péptido de la invención en un vector adecuado, o virus como el virus de la vacuna, en cuyo genoma se ha incorporado el ADN que codifica el péptido de la presente invención, puede utilizarse con eficacia como vacuna viva para el tratamiento y/o prevención de cánceres humanos. Cabe señalar que la dosis y el método de administración de una vacuna contra el cáncer son los mismos que en el caso de la vacuna contra la viruela ordinaria o la vacunación contra el BCG.

Es decir, el ADN que codifica el péptido de la invención (que se utiliza tal cual, o está en forma de ADN plásmido incorporado en un vector de expresión), o un virus recombinante o una bacteria recombinante que comprende el ADN mencionado anteriormente, se puede administrar como una vacuna contra el cáncer a mamíferos incluyendo un ser humano, directamente o en un estado en el que se dispersa en un adyuvante. Del mismo modo, el péptido de la invención también se puede administrar como una vacuna contra el cáncer en un estado en el que se dispersa en un adyuvante.

Ejemplos de un adyuvante utilizado en la presente invención incluyen un adyuvante incompleto de Freund, BCG, dimicolato de trehalosa (TDM), lipopolisacárido (LPS), un adyuvante de alumbre y un adyuvante de sílice. Desde el punto de vista de la capacidad de inducir anticuerpos, se utiliza preferentemente un adyuvante incompleto de Freund (AIF).

El tipo de cáncer no está particularmente restringido en la presente memoria. Ejemplos específicos de cáncer incluyen cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer hepático, cáncer de vesícula biliar, colangiocarcinoma, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de tiroides, melanoma (melanoma maligno), cáncer de piel, osteosarcoma, feocromocitoma, cáncer de cabeza y cuello, tumor cerebrales, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, linfoma maligno, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer uterino, cáncer de ovario y el sarcoma de tejidos blandos. De estos, los cánceres que expresan mucho a SPARC, tal como el cáncer de estómago (en particular el cáncer infiltrante difuso de estómago), cáncer de páncreas y melanoma (melanoma maligno), son ejemplos típicos.

El péptido de la presente invención actúa como un epítipo de linfocito T para inducir linfocitos T matadores específicos de células cancerosas o linfocitos T colaboradores. Así, el péptido de la presente invención es útil como agente para la prevención y/o el tratamiento de cánceres humanos. Como utilización real, el péptido o anticuerpo de la presente invención puede administrarse como producto inyectable, directamente o junto con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, y cuando sea necesario, también junto con las sustancias auxiliares mencionadas a continuación. Por otra parte, el péptido o anticuerpo de la presente invención también puede administrarse por un método tal como atomización, por absorción transdérmica a través de la mucosa. La expresión "vehículo" se utiliza aquí en el sentido de la albúmina de suero humano, por ejemplo. Además, como diluyente, puede utilizarse PBS, agua destilada o similares.

Como dosis, el péptido de la presente invención puede administrarse en el intervalo entre 0,01 y 100 mg por adulto y por administración. Sin embargo, la dosis no se limita al intervalo ya mencionado. La forma farmacéutica no está particularmente limitada, tampoco. Un producto liofilizado, o un gránulo producido añadiendo un excipiente tal como azúcar, también pueden estar disponibles.

Ejemplos de una sustancia auxiliar, que puede añadirse al agente de la invención para aumentar la actividad inductora de linfocitos T reactivos en el tumor, incluyen: muramilo-dipéptido (MDP); componentes bacterianos, tales como bacterias BCG; ISCOM descrito en *Nature*, vol. 344, p. 873 (1990); saponina QS-21 descrito en *J. Immunol.* vol. 148, pág. 1438 (1992); liposomas; y óxido de aluminio. Además, también pueden utilizarse como sustancias auxiliares inmunoestimulantes, tales como el lenthinan, schizophyllan o Picibanil. Otros ejemplos de productos utilizados en la presente memoria como sustancias auxiliares incluyen: citocinas para aumentar el crecimiento o la diferenciación de los linfocitos T, como la IL-2, IL-4, IL-12, IL-1, IL-6 o FNT; galactosilceramida  $\alpha$  para activar las células NKT; CpG que se une a un receptor tipo Toll para activar el sistema inmunitario natural; y lipopolisacárido (LPS).

Por otra parte, el péptido antígeno antes mencionado se añade *in vitro* a las células obtenidas de un paciente de HLA-A24 positivo o células alogénicas aisladas de cualquier otra persona que sea positiva a HLA-A24, seguido de la presentación de antígeno de las células. Después, las células se administran en el vaso sanguíneo del paciente, de modo que los linfocitos T matadores pueden ser efectivamente inducidos en el cuerpo del paciente. Además, el

presente péptido se agrega a los linfocitos de sangre periférica de un paciente, y la mezcla obtenida se cultiva a continuación *in vitro*. De este modo, los linfocitos T matadores puede ser inducidos *in vitro*, y pueden luego retornarse al vaso sanguíneo del paciente. Dicha terapia que incluye la transferencia de células ya se ha llevado a cabo como un método para el tratamiento de cánceres, y por lo tanto es un método bien conocido por las personas expertas en la materia.

Al introducir el péptido de la invención en un cuerpo, los linfocitos T reactivos en el tumor son inducidos, y, en consecuencia, un efecto antitumoral puede preverse. Por otra parte, cuando los linfocitos son estimulados por el péptido de la presente invención *ex vivo* o *in vitro* presente, los linfocitos T activados son inducidos. Los linfocitos T activados se inyectan en la zona afectada. Por lo tanto, esta técnica puede ser utilizada con eficacia para una inmunoterapia adoptiva.

La presente invención se describirá con más detalle en los siguientes ejemplos.

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1**

##### (1) Análisis de chips de ADNc

En lo que respecta a los tejidos cancerosos extirpados de un paciente con cáncer de estómago infiltrante difuso, un tejido canceroso se distinguió de los tejidos no cancerosos por microdissección por captura con láser, y tanto las partes cancerosas como las no cancerosas se cortaron a continuación. Posteriormente, se extrajo el ARN de cada tejido. Cuando ADNc se sintetizó a partir de dicho ARN mediante una reacción de transcripción inversa, el ADNc generado a partir de tejido canceroso se marcó por fluorescencia con Cy5, y el ADNc generado a partir de tejido no canceroso se marcó por fluorescencia con Cy3. Posteriormente, las dos preparaciones de ADNc se mezclaron para obtener ADN diana. La hibridación se llevó a cabo en un vidrio portaobjetos en el que el ADNc de la sonda se ha desplegado, y las uniones no específicos se eliminaron a continuación por lavado. Después, las imágenes de fluorescencia obtenidas tras la hibridación se capturaron con una cámara CCD o un escáner de fluorescencia, y se mostraron a continuación, con colores falsos (Cy5: rojo; Cy3: verde). Al mismo tiempo, se calculó la relación entre los dos tipos de intensidad de fluorescencia (R/G), y se indicó como perfil de expresión génica. Por otra parte, la expresión de 23.040 tipos de genes en las partes cancerosas y no cancerosas, de 20 pacientes con cáncer de estómago infiltrante difuso se sometió a investigación comparativa, y 15 tipos de genes cuya relación de expresión en el tejido canceroso/tejido no canceroso era de 5 o más se seleccionaron (Figura 1).

Posteriormente, se analizó el perfil de expresión de los 23.040 tipos de genes en los tejidos normales de 29 órganos (incluidos los cuatro órganos embrionarios) y los genes cuyo nivel de expresión era bajo en dichos órganos normales se seleccionaron. En el caso de SPARC, el cual los autores seleccionaron como antígeno tumoral en este experimento, la relación de expresión de porciones cancerosas/no cancerosas fue de 5 o superior (133.359 veces de promedio) en 11 de cada 20 pacientes con cáncer de estómago infiltrante difuso. SPARC se expresó en algunos tejidos normales, pero los niveles de expresión en dichos tejidos no cancerosos fueron significativamente menores que en los tejidos cancerosos (figura 2).

#### **Ejemplo 2**

##### (2) Selección de repertorios de péptido SPARC restringido a HLA-A24 humano y ratón K<sup>d</sup>

En SPARC humano y de ratón que presenta una homología del 95%, se seleccionaron los péptidos siguientes a partir del fragmento de SPARC cuyas secuencias de aminoácidos fueron compartidos entre seres humanos y ratones. La totalidad de las secuencias de aminoácidos de las moléculas de SPARC se investigaron basándose en en la información conocida sobre secuencias de aminoácidos frecuentemente observadas en péptidos que tienen fuerte afinidad de unión tanto para HLA-A24 humanos como moléculas K<sup>d</sup> de ratón. Los repertorios de péptidos que se supusieron que tienen alta afinidad de unión para los dos tipos de moléculas se seleccionaron utilizando un programa informático. Como resultado, se seleccionaron 4 tipos de péptidos como péptidos candidatos (Tabla 1).

**Tabla 1. Péptidos derivados de SPARC que posiblemente tienen afinidad de unión tanto para HLA-A24 humanos como para las moléculas K<sup>d</sup> de ratón**

Péptido	Secuencia	Posición inicial	Puntuación de enlace	
			A24	K <sup>d</sup>
SPARC-K <sup>d</sup> -1	DYIGPCKYI	143	75	400
SPARC-K <sup>d</sup> -2	HFFATKCTL	123	20	1382
SPARC-K <sup>d</sup> -3	EFPLMRDWL	161	30	960
SPARC-K <sup>d</sup> -4	MYIFPVHWQF	125	210	120

Previstas por [http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/kon\\_parker\\_comboform](http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/kon_parker_comboform)  
 SPARC-K<sup>d</sup>-1: SEC. ID. nº 1  
 SPARC-K<sup>d</sup>-3: SEC. ID. nº 2  
 SPARC-K<sup>d</sup>-4: SEC. ID. nº 3

(3) Vacuna de dendrocitos (DC)

5 Se produjeron dendrocitos procedentes de la médula ósea (BM-DC) en células de la médula ósea procedentes de la médula ósea de BALBc utilizando GM-CSF como describieron anteriormente los autores (Nakatsura, T. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 10, 8630-8640, 2004). Así, los BM-DC obtenidos se cultivaron con una mezcla de los 4 tipos de péptidos seleccionados como se describió anteriormente a una concentración de 10 mM durante 2 horas, y los BM-DC (5 × 10<sup>5</sup> células) pulsados con péptido se administraron a continuación, por vía intraperitoneal a cada ratón. Después de un intervalo de 1 semana, los mismos BM-DC pulsados con péptido se administraron al ratón en dos ocasiones, de modo que el ratón se inmunizó fuertemente. A continuación, los esplenocitos de los ratones se recuperaron y se evaluó la inducción de linfocitos T matadores. Con el fin de analizar estrictamente la inducción de linfocitos T matadores procedentes de los linfocitos T CD8+, después de la recogida del bazo, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se eliminaron de los esplenocitos recogidas, utilizando granos de MACS, y las células restantes se utilizaron para el análisis.

Se utilizaron los siguientes protocolos para la generación y caracterización de los linfocitos T matadores específicos de SPARC (el día de la recuperación de los esplenocitos del ratón inmunizado se definió como el día 0).

Día 21 (1) Se añadió GM-CSF a las células de la médula ósea de un ratón BALB/c, a fin de iniciar la inducción de dendrocitos procedentes de la médula ósea (denominados en lo sucesivo BM-DC).

20 Día-14 (2) Una mezcla de los 4 tipos de péptidos SPARC se añadió a los BM-DC inducidos, y 2 horas más tarde, 5 × 10<sup>5</sup> células se administraron por vía intraperitoneal a cada ratón.

Los pasos (1) y (2) se repitieron dos veces cada dos semanas.

25 Día 0 Los esplenocitos del ratón BALB/c inmunizado se recuperaron. Las células se cultivaron junto con BM-DC pulsados previamente con cada péptido SPARC durante 2 horas. Después, las células resultantes se cultivaron conjuntamente durante 6 días.

Día 6 A fin de detectar los linfocitos T matadores que reconocen específicamente los péptidos SPARC, se llevó a cabo un ensayo de liberación de Cr. Se seleccionaron células T2K<sup>d</sup>, una estirpe celular RL de macho 1, una estirpe celular Meth A y una estirpe celular Balb/3T3 como células tumorales diana para linfocitos T matadores.

30 (4) Análisis de los efectos citotóxicos de los linfocitos T matadores específicos de SPARC en células tumorales mediante ensayo de liberación de Cr

35 La actividad citotóxica de los linfocitos T matadores específicos para SPARC inducidos se analizó de la siguiente manera. La célula T2K<sup>d</sup> es una estirpe celular obtenida mediante la introducción de un gen K<sup>d</sup> en una estirpe de células T2 de ratón que carece de la expresión de un gen TAP. Sólo en un caso en el que un péptido añadido desde fuera se une a una molécula MHC de clase I, debido a la insuficiencia de TAP, la expresión de un complejo de la molécula MHC de clase I y el péptido se expresa de forma estable en la superficie celular. Una estirpe celular RL masculina 1 son las células leucémicas linfocitos T procedentes de ratón BALB-c y no expresan SPARC. Los dos tipos de células anteriores no expresan SPARC. Por otra parte, una estirpe celular Meth A y una estirpe celular BALB/3T3 son la estirpe celular de fibrosarcoma procedente de ratón BALB/c y la estirpe celular de fibroblastos, respectivamente. Estas dos estirpes de células expresan SPARC. Las estirpes celulares antes mencionadas se marcaron con cromo radiactivo (Cr), y se cultivaron a continuación, con los linfocitos T matadores mencionados anteriormente durante 4 horas. A continuación, se recuperó un sobrenadante del cultivo, y la cantidad de Cr radiactivo liberado de las células muertas se cuantificó, por lo que se detectó actividad citotóxica.

Como resultado, no se observó citotoxicidad a las células T2K<sup>d</sup> ni a las células RL células masculinas 1, que no expresaban a SPARC. Sin embargo, se observó citotoxicidad específicamente a los linfocitos T2K<sup>d</sup>, que expresaron

péptidos SPARC en el contexto de la molécula de K<sup>d</sup> en la superficie por la carga de los péptidos SPARC K<sup>d</sup> 1, 3 y 4, y también a Meth A y BALB/3T3, que expresaron de forma espontánea SPARC (Figura 3).

### Ejemplo 3

(5) Inducción de inmunidad antitumoral en ratones BALB/C por inmunización con péptido SPARC

5 (Procedimiento)

BM-DC se cultivó con una mezcla de 1, 3 y 4 péptidos K<sup>d</sup> SPARC (10 µM para cada uno) durante 2 horas. Después, 5 x 10<sup>5</sup> células se administraron por vía intraperitoneal a cada ratón. Después de un intervalo de una semana, un BM-DC cargado con péptido se administró a los ratones de la misma manera, de modo que el ratón se inmunizó dos veces en total. Siete días más tarde, una estirpe celular de fibrosarcoma de ratón, Meth A (1 x 10<sup>6</sup> células), que es expresa en gran medida SPARC de ratón, se trasplantó por vía subcutánea al ratón. Así, el crecimiento del tumor y el tiempo de supervivencia del ratón se examinaron.

(Resultados)

15 Los resultados se muestran en la figura. 4. La administración preventiva de BM-DC pulsado con péptido SPARC podría inducir la inhibición del crecimiento de la METH A trasplantada por vía subcutánea e indujo una prolongación del tiempo de supervivencia del ratón.

### Aplicación industrial

20 HLA-A24 (A\*2402) es el alelo de HLA de clase I más frecuente, que poseen aproximadamente el 60% de los japoneses. Los motivos estructurales de los péptidos unidos a las moléculas K<sup>d</sup> de ratón BALB/c es bastante similar a los de los péptidos unidos a las moléculas HLA-A24 humanas. Por consiguiente, se puso de manifiesto que, cuando un ratón BALB/c es inmunizado con un péptido determinado, si el péptido se une a la molécula K<sup>d</sup> y de este modo produce linfocitos T matadores, y si los linfocitos T matadores destruyen las células cancerosas que expresan un complejo de la péptido y la molécula K<sup>d</sup>, es muy posible que el péptido también se una a HLA-A24 y produzca linfocitos T matadores humanos que pueden destruir las células cancerosas. Por lo tanto, el péptido de la presente invención puede aplicarse a una inmunoterapia para pacientes con cáncer gástrico infiltrante difuso, cáncer de páncreas y melanoma, que poseen HLA-A24. Se prevé que la calidad de vida de los pacientes puede ser mejorada suprimiendo el crecimiento o el avance de dichos cánceres mediante inmunoterapia del cáncer basada en el péptido SPARC.

### Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 muestra el grado de expresión de los 15 genes sobresalientes que se expresaron en tejidos de cáncer de estómago en un nivel superior que en la membrana de la mucosa normal del estómago, que fueron identificados a realizar el análisis del chip de ADN en 20 pacientes con cáncer de estómago infiltrante difuso. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, así como los resultados de los análisis del chip de ADN de los tejidos normales como se describe a continuación, a partir de los 15 genes anteriores, proteínas segregadas ácida y rica en cisteína (SPARC) específicamente sobreexpresadas en un tejido canceroso se seleccionó como el antígeno específico del cáncer más ideal en el cáncer de estómago infiltrante difuso.

35 La figura 2 muestra los resultados obtenidos al analizar la expresión de SPARC en 25 tipos de los principales órganos de adultos y en 4 tipos de órganos embrionarios, utilizando un chip de ADN. La expresión del gen SPARC se observó incluso en algunos tejidos normales, pero el nivel de expresión en dichos tejidos normales fue significativamente menor que en un tejido canceroso.

40 La figura 3 muestra la citotoxicidad de las células del tumor positivas SPARC por CTL que se indujo utilizando un péptido epítipo SPARC K<sup>d</sup>-1, K<sup>d</sup>-3 o K<sup>d</sup>-4 restringido a K<sup>d</sup> de ratón en ratones BALB/c.

45 La figura. 4 muestra la supresión del crecimiento de las células de cáncer Meth A trasplantadas por vía subcutánea un cáncer de las células y la prolongación del tiempo de supervivencia de ratones BALB/c por administración previa de dendrocitos procedentes de la médula ósea (BM-CC) cargados con una mezcla de los péptidos SPARC K<sup>d</sup>-1, K<sup>d</sup>-3 y K<sup>d</sup>-4.

### Listado de secuencias

<110> Universidad de Kumamoto

<120> Péptido antigénico de rechazo del cáncer derivado de SPARC y producto farmacéutico que comprende el mismo

50 <130> P2290EP

<140> EP07745372.8

<141> 15-06-2007

<150> JP 20060167724  
 <151> 16-06-2006  
 <160> 4  
 <170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> Péptido sintético  
 <400> 1

Asp Tyr Ile Gly Pro Cys Lys Tyr Ile  
 1 5

<210> 2  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 2

Glu Phe Pro Leu Arg Met Arg Asp Trp Leu  
 1 5 10

<210> 3  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 2

Met Tyr Ile Phe Pro Val His Trp Gln Phe  
 1 5 10

<210> 4  
 30 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 4

His Phe Phe Ala Thr Lys Cys Thr Leu  
1 5

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido de cualquiera de los siguientes:

(A) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a nº 3; o

5 (B) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o dos aminoácidos con respecto al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a 3, y que tiene capacidad para producir linfocitos T citotóxicos (matadores); o

10 (C) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una adición de uno a 10 aminoácidos con respecto al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a 3, y que tiene capacidad para producir linfocitos T citotóxicos (matadores).

2. Al menos un tipo del péptido de la reivindicación 1 para producir inmunidad dirigida contra cánceres, para su utilización en el tratamiento y prevención de tumores.

3. El péptido de la reivindicación 1 para su utilización en el tratamiento y prevención de tumores.

15 4. Al menos un tipo del péptido de la reivindicación 1 para producir células presentadoras de antígeno que tiene gran capacidad de producir linfocitos T reactivos con un tumor, para su utilización en el tratamiento y prevención de tumores.

5. Al menos un tipo del péptido de la reivindicación 1 para producir linfocitos T reactivos con un tumor, para su utilización en el tratamiento y prevención de tumores.

20 6. Un ADN para la inducción de células presentadoras de antígeno que tiene gran capacidad de inducir linfocitos T reactivos con un tumor, que comprende un gen que codifica para un péptido de cualquiera de los siguientes:

(A), un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a 3; o

25 (B) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o dos aminoácidos con respecto al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a nº 3, y que tiene capacidad para producir linfocitos T matadores; o

(C) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una adición de uno a 10 aminoácidos con respecto al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. nº 1 a 3, y que tiene capacidad para producir linfocitos T citotóxicos (matadores).

30 7. Un linfocito T matador, un linfocito T colaborador, o una población de inmunocitos que comprende dichas células, que se produce utilizando con el péptido de la reivindicación 1.

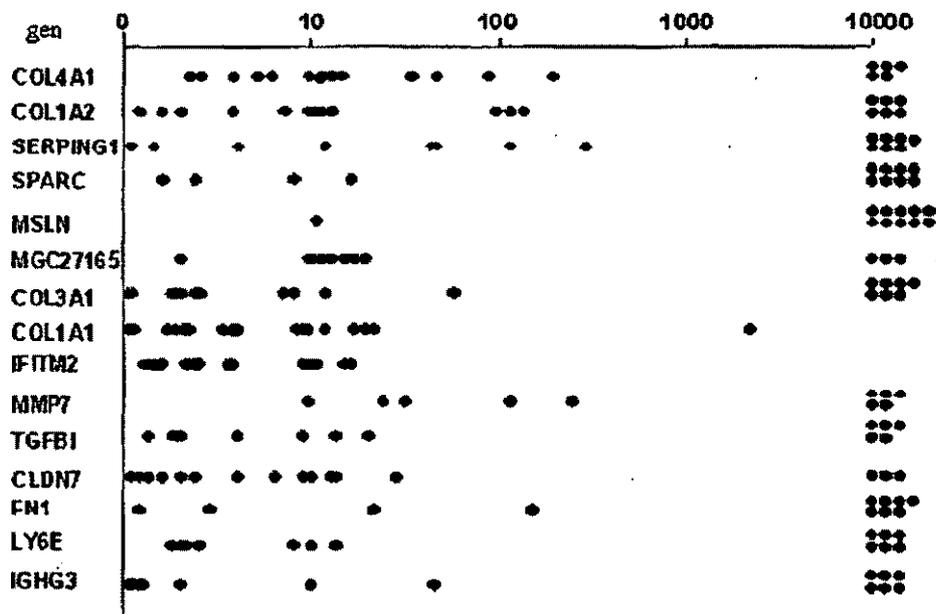
8. Una célula presentadora de antígeno, que presenta un complejo de una molécula HLA y el péptido de la reivindicación 1.

9. La célula presentadora de antígeno de la reivindicación 8, que se produce utilizando el péptido de la reivindicación 1.

**Fig. 1**

Fig. 1 Genes que se identificaron por análisis del chip de ADNc y se sobreexpresaron en cáncer de estómago infiltrante difuso

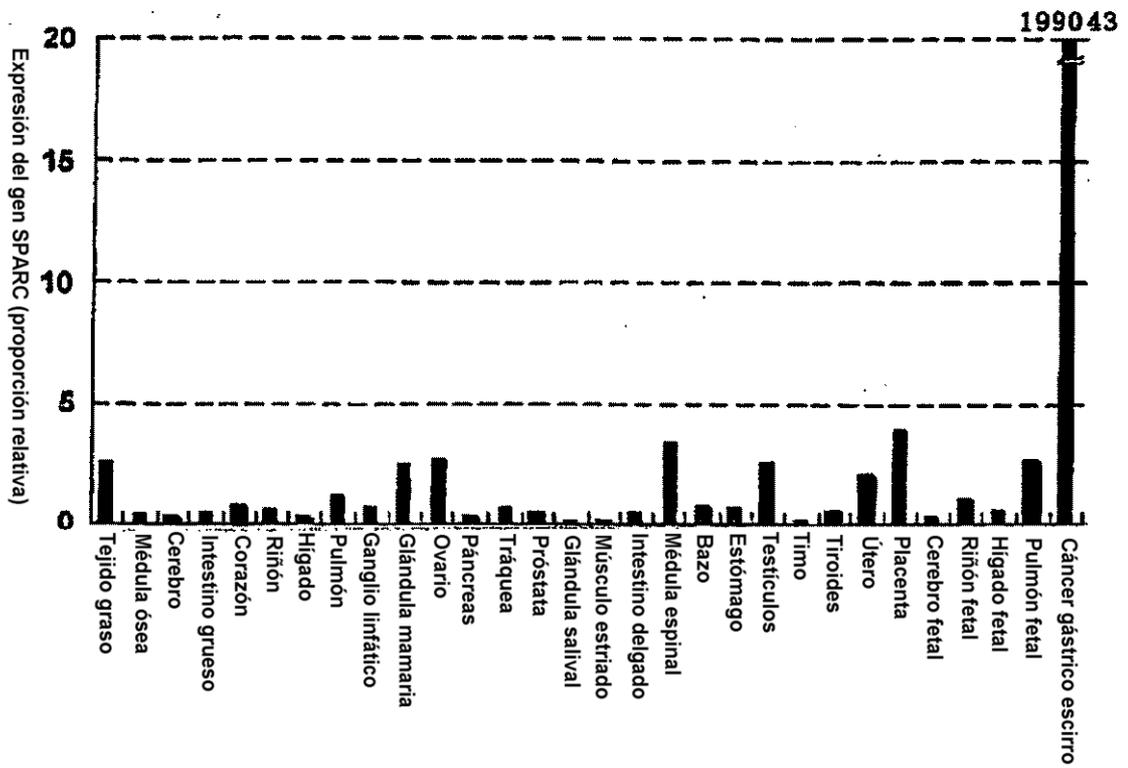
Relación de expresión de ARNm en cáncer de estómago/membrana de la mucosa de estómago normal



SPARC: En 11 de entre 20 pacientes, la expresión génica en el cáncer fue 5 veces superior o más en comparación con la del tejido normal (promedio: 133.359 veces)

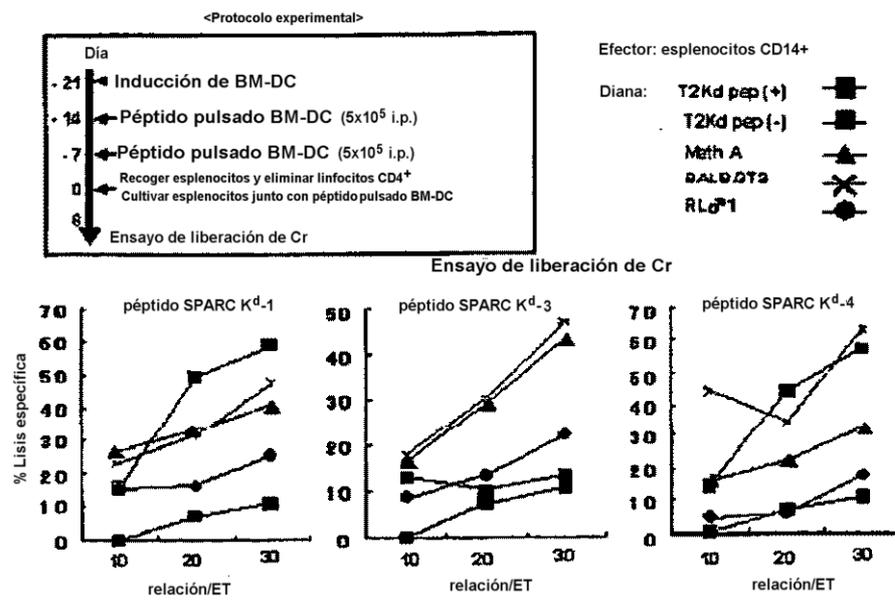
Fig. 2

Fig. 2 Expresión de ARNm de SPARC en tejido de adulto y fetal normal



**Fig. 3**

Fig. 3 Identificación de péptido de epítipo de SPARC restringido a Kd (= HLA-A24) de ratón en ratón BALB/c, y daño de las células del tumor positivas a SPARC por CTL inducidos



**Fig. 4**

Fig. 4 Inhibición del crecimiento y prolongación del tiempo de supervivencia de células cancerosas Meth A por administración previa de dendrocitos procedentes de médula ósea (BM-DC) que se cargaron con una mezcla de SPARC Kd-péptidos 1, 3 y 4 al ratón BALB/c

