

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 394**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 14/82** (2006.01)  
**C07K 16/32** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03791418 .1**  
96 Fecha de presentación: **29.08.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1536006**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

54 Título: **ANTÍGENOS DE CÁNCER Y SU UTILIZACIÓN.**

30 Prioridad:  
**30.08.2002 JP 2002255668**  
**25.11.2002 JP 2002341168**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.12.2011**

73 Titular/es:  
**Medinet Co., Ltd.**  
**Usui Bldg 9F 2-5-14, Shin-Yokohama Kohoku-ku**  
**Yokohama-shi**  
**Kanagawa 222-0033, JP**

72 Inventor/es:  
**NAKATSURA, Tetsuya y**  
**NISHIMURA, Yasuharu**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 394 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

Antígenos de cáncer y su utilización

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un nuevo antígeno de cáncer humano que es útil para el diagnóstico de varios tipos de cánceres tales como cáncer pancreático o cáncer de colon y para inmunoterapia, y su uso.

**Antecedentes de la técnica**

10 En la actualidad, el cáncer es la causa número uno de muerte. Se han desarrollado mecanismos de aparición, procedimientos diagnósticos, y procedimientos terapéuticos para el cáncer. Sin embargo, una gran cantidad de cánceres avanzados aún no se han tratado en las presentes circunstancias. A fin de mejorar la situación actual, se considera necesario desarrollar un nuevo procedimiento de diagnóstico precoz y procedimiento terapéutico

15 Hace tiempo que se ha considerado a la inmunoterapia como un procedimiento para tratar cánceres, y se han realizado diversos intentos respecto de tal terapia. Sin embargo, aun no se han mostrado efectos antitumorales suficientes. En forma convencional, la inmunoterapia para los cánceres se ha centrado específicamente en la inmunoterapia no específica. En años recientes, sin embargo, se ha esclarecido que las células T cumplen un papel importante en el rechazo del tumor en los organismos vivos. Como resultado, los esfuerzos se han centrado en el aislamiento de un antígeno de cáncer que reconoce células T que es capaz de inducir a los linfocitos T citotóxicos (CTL) y la determinación de un epitopo de unión al MHC clase I.

20 Hasta la fecha, muchos antígenos de cáncer se han aislado por el procedimiento de clonación de ADNc convencional, por medio de los CTL. Este procedimiento requiere el establecimiento de una línea celular del tumor y el establecimiento de los CTL. En consecuencia, es difícil aislar un antígeno tumoral de los carcinomas diferentes de los melanomas. Además, a fin de aumentar los efectos de la inmunoterapia, se considera que un procedimiento de tratamiento que involucra la mezcla de muchos péptidos es efectivo. A fin de establecer tal procedimiento de tratamiento, es necesario aislar una gran cantidad de antígenos. En consecuencia, el procedimiento de clonación de la expresión del ADNc convencional es problemático ya que lleva mucha mano obra y tiempo para aislar incluso un solo antígeno.

25 En 1995, Pfreundschuh et al. en Alemania y Old et al. en U.S.A. han informado el procedimiento SEREX, que detecta una proteína del antígeno de cáncer reconocida por un anticuerpo en el suero de un paciente de cáncer (Serological Identification of Recombinant cDNA Expression Cloning; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11810-11813, 1995). Se han aislado muchos antígenos de tumores por este procedimiento. Entre los antígenos aislados por este procedimiento, también se han incluido antígenos tales como MAGe-1 o tirosinasa que inducen los CTL. Por consiguiente, se señala que este procedimiento también es útil como un procedimiento para detectar un antígeno reconocido por la inmunidad mediada por células. Además, se ha informado que un antígeno de cáncer reconocido por este anticuerpo IgG de un paciente fue aislado con el procedimiento descrito anteriormente (Int. J. Cancer 72, 965-971, 1997; Cancer Res. 58, 1034-1041, 1998; Int. J. Cancer 29, 652-658, 1998; Int. J. Oncol. 14, 703-708, 1999; Cancer Res. 56, 4766-4772, 1996; y Hum. Mol. Genet 6, 33-39, 1997).

30 El documento WO99/04265 desvela un gran cantidad de secuencias de péptidos/proteínas que se hallan expresados en las células tumorales. El abordaje usado para la prueba parece haber sido respaldado por anticuerpos autólogos que reconocen el antígeno respectivo. En el Ejemplo 7 se desvela que HSP105 es expresado por las células tumorales y reconocido por los anticuerpos autólogos. Sin embargo, el documento completo no proporciona ninguna evidencia de que HSP105 tiene efectivamente algún efecto en la prevención y/o tratamiento de los tumores.

35 El documento Nakatsura et al. (Biochem. Biophys. Res. Comm, vol. 281, 936-944 (2001)) se refiere a estudios de antígenos inmunogénicos sobreexpresados en un cáncer pancreático por medio del procedimiento SEREX. Los autores de este documento hallaron 18 proteínas diferentes sobreexpresadas en las respectivas células cancerosas, que incluyen HSP105. En la sección de discusión de las páginas 941 a 943 los autores afirman que las observaciones realizadas durante sus estudios pueden sugerir la posible utilidad de hsp105 para la inmunoterapia del cáncer.

**Divulgación de la invención**

40 Un objeto de la presente invención es proporcionar: un antígeno de cáncer pancreático humano y/o un antígeno de cáncer de colon humano que se pueden aplicar en el diagnóstico y/o tratamiento de varios tipos de cánceres o tumores que incluyen cáncer pancreático y cáncer de colon como ejemplos representativos; un gen que codifica los mismos; y una vacuna anti-cáncer que usa los mismos.

45 La presente invención proporciona un antígeno de cáncer para usar en prevención y/o tratamiento terapéutico de cánceres, tal antígeno de cáncer es un péptido de cualquiera de los siguientes (A) o (B):

(A) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 3 a 29,

(B) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 3 a 22 y una adición de uno a 5 aminoácidos, y tiene actividad inmunoestimuladora y activa los linfocitos T citotóxicos que reconocen una proteína del antígeno de cáncer;

5 en el que el antígeno de cáncer tiene actividad estimuladora de las células T que estimula los linfocitos T citotóxicos.

La presente invención proporciona un péptido como antígeno de cáncer que tiene actividad inmunoestimuladora. El péptido de la presente invención preferentemente puede activar los linfocitos T citotóxicos que reconocen una proteína del antígeno de cáncer. El péptido de la presente invención consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOS: 3 a 29.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un péptido, que consiste en una secuencia de aminoácidos con una adición de uno a 5 aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOS: 3 a 22, y también tiene actividad inmunoestimuladora. El péptido descrito anteriormente preferentemente puede activar los linfocitos T citotóxicos que reconocen una proteína del antígeno de cáncer.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un agente inmunoestimulante usado para los cánceres, que comprende cualquiera de los péptidos descritos anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona ADN que codifica el antígeno de cáncer mencionado anteriormente de la presente invención.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona células T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que comprende estas células, que son inducidas por la estimulación *in vitro* por medio del antígeno o péptido del cáncer mencionado anteriormente de la presente invención, o una mezcla de ellos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona células T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que comprende estas células, que son inducidas por la estimulación *in vitro* por medio del antígeno o péptido del cáncer mencionado anteriormente de la presente invención, o una mezcla de ellos, y un activador inmunológico. El activador inmunológico es preferentemente un factor de crecimiento celular o citoquina.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona antígenos de cáncer para usar en un procedimiento para suprimir un tumor, que comprende introducir las células T auxiliares, linfocitos T citotóxicos descritos anteriormente, o una población de inmunocitos que comprende estas células en un organismo. El procedimiento descrito anteriormente preferentemente se usa para prevenir y/o tratar cánceres.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona una solución del cultivo celular usada para producir las células T auxiliares o linfocitos T citotóxicos de la presente invención o una población de inmunocitos que comprende estas células, que comprende el antígeno o péptido del cáncer mencionado anteriormente de la presente invención, o una mezcla de ellos.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit del cultivo celular para producir las células T auxiliares o linfocitos T citotóxicos de la presente invención o una población de inmunocitos que comprende estas células, que comprende la solución del cultivo celular descrito anteriormente y un recipiente del cultivo celular.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una vacuna para el cáncer que comprende el antígeno de cáncer mencionado anteriormente y/o al menos un tipo de péptido de la presente invención. La vacuna para el cáncer descrita anteriormente preferentemente también comprende un adyuvante.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona una vacuna para el cáncer, que comprende el ADN mencionado anteriormente de la presente invención, o virus recombinante o bacteria recombinante que comprende el ADN descrito anteriormente. La vacuna para el cáncer descrita anteriormente preferentemente también comprende un adyuvante.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un agente para prevenir y/o tratar cánceres, que comprende antígeno de cáncer, péptido, y/o células T auxiliares, linfocitos T citotóxicos mencionados anteriormente, o una población de inmunocitos que comprende estas células de la presente invención.

En la presente invención, cáncer es preferentemente cáncer pancreático, cáncer de colon, tumor cerebral, melanoma maligno, leucemia mielocítica crónica, leucemia mielocítica aguda, linfoma, cáncer esofágico, cáncer renal, cáncer prostático, cáncer de pulmón, cáncer de mamas, cáncer de estómago, cáncer hepático, cáncer de vesícula, cáncer testicular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer tiroideo, cáncer de vejiga, o sarcoma.

#### 50 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una microfotografía que muestra los resultados de un análisis inmunohistoquímico en hsp105 en cáncer pancreático. En la figura, los símbolos tienen los siguientes significados:

A: una porción de cáncer pancreático y una porción no cancerosa periférica teñida con hematoxilina y eosina, CA: una porción cancerosa, NP: una porción no cancerosa

B: una proteína hsp105 está altamente expresada en células cancerosas. También se expresa débilmente en una porción no cancerosa.

5 C: Una porción no cancerosa está significativamente expandida. Una proteína hsp105 se expresa débilmente en el citoplasma.

D: Una porción cancerosa está significativamente expandida. Una proteína hsp105 se expresa en forma elevada principalmente en el citoplasma de células cancerosas.

10 La Figura 2 es una microfotografía que muestra los resultados de un análisis inmunohistoquímico en la hsp105 en el cáncer de colon. En la figura, los símbolos tienen los significados siguientes:

A: una porción de cáncer de colon y una porción no cancerosa periférica teñida con hematoxilina y eosina, CA: una porción cancerosa, NP: una porción no cancerosa

B: Una proteína hsp105 está altamente expresada en células cancerosas. También se expresa débilmente en una porción no cancerosa.

15 C: Una porción no cancerosa está significativamente expandida. Una proteína hsp105 se expresa débilmente en el citoplasma.

D: Una porción cancerosa está significativamente expandida. Una proteína hsp105 se expresa en forma elevada principalmente en el citoplasma de células cancerosas. Asimismo, la proteína hsp105 se expresa débilmente en el núcleo de esta.

20 La Figura 3 es un gráfico que muestra los efectos anticáncer de una vacuna de ADN de hsp105, una vacuna de péptido de hsp105, y un control en células de cáncer de colon de ratón Colon-26. A representa el área de una porción cancerosa, B representa la proporción de los ratones en que se ha desarrollado el cáncer, y C representa la proporción de los ratones sobrevivientes.

25 La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos por la medición del ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr, las actividades citotóxicas sobre Colon-26 de varios tipos de vacunas peptídicas derivadas de las proteínas hsp105, o las actividades citotóxicas de las vacunas de ADN que codifican tales proteínas hsp105.

La Figura 5 muestra los resultados de un análisis inmunohistoquímico sobre hp105 en los tejidos.

La Figura 6 muestra los resultados obtenidos por el análisis de la actividad antitumoral *in vivo* de una línea celular T auxiliar positiva CD4 de ratón inducida por hsp105.

30 La Figura 7 muestra los resultados obtenidos por la inducción con hsp105, la línea celular T auxiliar positiva CD4 de un paciente con cáncer de colon.

La Figura 8 muestra los resultados obtenidos al examinar si los linfocitos T citotóxicos (CTL) de ratón BALB/c inducidos por un péptido derivado de hsp105 pueden reducir o no una masa tumoral de la línea celular de cáncer de colon Colon-26 que expresa altamente hsp105.

35 La Figura 9 muestra los resultados obtenidos al examinar si los linfocitos T citotóxicos (CTL) de un paciente con cáncer de colon pueden reducir o no una masa tumoral del cáncer de colon sw620, que expresa altamente hsp105.

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

Las formas de realización de la presente invención se describirán en detalle a continuación.

40 La frase "proteína que tiene actividad inmunoestimuladora" se usa en la presente memoria descriptiva para significar una proteína que tiene actividad de inducir una respuesta inmune tal como generación de un anticuerpo o inmunidad mediada celular. Entre ellos, se prefiere particularmente la actividad estimuladora de células T de estimular los linfocitos T citotóxicos (células T citolíticas/CTL).

45 La hsp105 es una proteína de choque térmico con un alto peso molecular, que pertenece a la familia hsp110/105, y está compuesta de hsp105 $\alpha$  y 105 $\beta$ . La 105 $\alpha$  es una proteína de choque térmico de 105 kDa, y es inducida por varios estreses. La 105 $\beta$  es una proteína generada por el empalme de ARNm de 105 $\alpha$ , y tiene un peso molecular menor que el de 105 $\alpha$ . La hsp105 que es un antígeno del cáncer pancreático o cáncer de colon de la presente invención se puede detectar, por ejemplo, por el procedimiento SEREX como se describe posteriormente en los ejemplos de la presente memoria descriptiva.

50 En la presente invención, el alcance de "uno a 5" en "una secuencia de aminoácidos que comprende una adición de uno a 5 aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NOs 3-22" por

ejemplo, significa 1 a 5, y preferentemente 1 a 3 aminoácidos.

Un procedimiento de obtener o producir la proteína del antígeno de cáncer de la presente invención no es particularmente limitado. Se puede usar una proteína natural, una proteína sintetizada químicamente, o una proteína recombinante producida por manipulación genética. Desde el punto de vista de que se puede producir en gran volumen por operaciones relativamente fáciles, es preferente una proteína recombinante.

Cuando se obtiene una proteína natural, se puede aislar de células o tejidos que expresan la proteína por el uso combinado apropiado de procedimientos de aislamiento y purificación de proteína. Cuando se obtiene una proteína sintetizada químicamente, la proteína de la presente invención se puede sintetizar por procedimientos de síntesis química tales como el procedimiento de Fmoc (procedimiento de fluorenilmetiloxycarbonilo) o el procedimiento de tBoc (procedimiento de t-butiloxycarbonilo). Además, la proteína de la presente invención también se puede sintetizar por medio de varios tipos de sintetizadores de péptidos disponibles en el comercio.

Cuando la proteína del antígeno de cáncer de la presente invención se produce en la forma de una proteína recombinante, se puede producir por la obtención del ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2), una mutante de esta o un homólogo de esta y su introducción en un sistema de expresión preferido.

Se puede usar cualquier vector de expresión, a condición de que se pueda replicar en forma autónoma en las células huésped o se puede incorporar en los cromosomas de las células huésped. Se usa vector de expresión que contiene un promotor en un sitio que es capaz de expresar el gen de la presente invención. Un transformante que tiene un gen que codifica la proteína de la presente invención se puede producir por la introducción del vector de expresión mencionado anteriormente en un huésped. Tal huésped usado en la presente puede incluir una bacteria, levadura o células de animal y células de insecto. Además, un vector de expresión se puede introducir en un huésped por procedimientos conocidos, que dependen del tipo de huésped.

En la presente invención, se cultiva el transformante que tiene el gen de la presente invención producido como se describió anteriormente, y la proteína de la presente invención se genera y acumula en el producto de cultivo. A partir de este momento, la proteína de la presente invención se recolecta del producto de cultivo, de este modo se aísla una proteína recombinante.

Cuando el transformante de la presente invención es procariota tal como *Escherichia coli* o eucariota tal como levadura, se puede usar un medio natural o medio sintético como medio en que se cultivan los microorganismos, a condición de que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas que pueden ser asimiladas por los microorganismos, y el cultivo del transformante se puede llevar a cabo de modo eficiente en este. Además, el cultivo se puede llevar a cabo en condiciones que se usan comúnmente para el cultivo de microorganismos. Después de completar el cultivo, la proteína de la presente invención se puede aislar y purificar del producto de cultivo del transformante por procedimientos de aislamiento y purificación de proteína comunes.

Una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, supresión, inserción, y/o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1, puede ser producida y obtenida apropiadamente por los expertos en la técnica sobre la base de la información respecto de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, que es un ejemplo de la secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Es decir, un gen (gen mutante) que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, supresión, inserción, y/o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, se puede producir por cualquiera de los procedimientos dados que son conocidos por los expertos en la técnica, tales como síntesis química, procedimientos de manipulación genética, o mutagénesis. En forma específica, se introduce una mutación en el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, de modo de obtener el ADN mutante.

Por ejemplo, se puede aplicar un procedimiento de dejar que el ADN se ponga en contacto con un agente que actúa como mutágeno, un procedimiento de irradiación con rayos ultravioleta, un procedimiento de manipulación genética, y similares, al ADN que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. La mutagénesis dirigida al sitio, uno de los procedimientos de manipulación genética, es útil porque es capaz de introducir una mutación específica en un sitio específico. La mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos descriptos en publicaciones tales como Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989 (de aquí en adelante abreviado como Molecular Cloning 2nd Ed.); y Current Protocols in Molecular Biology, Supplements 1 a 38, John Wiley & Sons (1987-1997) (de aquí en adelante abreviado como Current Protocols in Molecular Biology).

La presente invención también se refiere a un péptido que es una porción de la proteína anteriormente mencionada de la presente invención y tiene actividad inmunoestimuladora. El péptido de la presente invención preferentemente puede activar linfocitos T citotóxicos que reconocen una proteína del antígeno de cáncer. Los ejemplos específicos de tal péptido consisten en cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos:

Asn-Tyr-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu (SEQ ID NO: 3)

Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu (SEQ ID NO: 4)

Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile (SEQ ID NO: 5)

Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu (SEQ ID NO: 6)

5 Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile (SEQ ID NO: 7)

Thr-Phe-Leu-Arg-Arg-Gly-Pro-Phe-Glu-Leu (SEQ ID NO: 8)

Glu-Tyr-Val-Tyr-Glu-Phe-Arg-Asp-Lys-Leu (SEQ ID NO: 9)

His-Tyr-Ala-Lys-Ile-Ala-Ala-Asp-Phe (SEQ ID NO: 10)

Lys-Tyr-Asn-His-Ile-Asp-Glu-Ser-Glu-Met (SEQ ID NO: 11)

10 Ser-Leu-Asp-Glu-Lys-Pro-Arg-Ile-Val-Val (SEQ ID NO: 12)

Arg-Leu-Tyr-Gln-Glu-Cys-Glu-Lys-Leu (SEQ ID NO: 13)

Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Asn-Ser-Thr-Asp-Leu (SEQ ID NO: 14)

Leu-Met-Ser-Ser-Asn-Ser-Thr-Asp-Leu (SEQ ID NO: 15)

Ser-Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu (SEQ ID NO: 16)

15 Lys-Ile-Gly-Arg-Phe-Val-Val-Gln-Asn-Val (SEQ ID NO: 17)

Tyr-Val-Tyr-Glu-Phe-Arg-Asp-Lys-Leu (SEQ ID NO: 18)

Leu-Leu-Thr-Glu-Thr-Glu-Asp-Trp-Leu (SEQ ID NO: 19)

Trp-Leu-Tyr-Glu-Glu-Gly-Glu-Asp-Gln-Ala (SEQ ID NO: 20)

Glu-Leu-Met-Lys-Ile-Gly-Thr-Pro-Val (SEQ ID NO: 21)

20 Val-Met-Asn-Ala-Gln-Ala-Lys-Lys-Ser-Leu (SEQ ID NO: 22)

Un ejemplo preferido de tal péptido puede ser un péptido capaz de activar linfocitos T citotóxicos que reconocen una proteína del antígeno de cáncer.

25 En la presente invención, el alcance de "uno a 5" en "una secuencia de aminoácidos que comprende una adición de uno a 5 aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las anteriores SEQ ID NOS: 3 a 22" es 1 a 5, preferentemente 1 a 4, más preferentemente 1 a 3, además preferentemente 1 o 2, y en particular preferentemente 1.

30 El péptido de la presente invención se puede sintetizar por procedimientos de síntesis química tales como el procedimiento de Fmoc (procedimiento de fluorenilmetiloxicarbonilo) o el procedimiento de tBoc (procedimiento de t-butiloxicarbonilo). Además, el péptido de la presente invención también se puede sintetizar por medio de varios tipos de sintetizadores de péptido disponibles en el comercio.

El péptido del antígeno de cáncer mencionado anteriormente de la presente invención puede inducir inmunidad contra los cánceres, como se describió posteriormente en los ejemplos. Por consiguiente, la presente invención proporciona un agente inmuno-estimulador contra los cánceres, que comprende la proteína o péptido del antígeno de cáncer de la presente invención.

35 El agente inmunoestimulante contra los cánceres de la presente invención se usa *in vitro* o *in vivo*, y preferentemente *in vitro*, de modo que induce a las células T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que contiene estas células, de este modo proporciona la inmunidad contra cánceres.

(2) ADN de la presente invención

40 El ADN de la presente invención codifica el antígeno de cáncer de la presente invención descrito en el punto (1) anterior.

El ADN incluye el ADN que se está hibridando con el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos descrito en (1) en condiciones rigurosas, y que codifica el péptido que tiene actividad inmunoestimuladora como se define en la reivindicación 1.

La frase anterior "ADN que hibrida con ... en condiciones rigurosas" se usa para significar la secuencia de nucleótidos de ADN obtenido por el procedimiento de hibridación de la colonia, el procedimiento de hibridación de la placa o el procedimiento de hibridación Southern, por medio del ADN como una sonda. Por ejemplo, tal ADN se puede identificar por la hibridación de un filtro, sobre el cual se ha inmovilizado ADN derivado de la colonia o placa o un fragmento de ADN de este, a 65°C en presencia de 0,7 a 1,0 M de NaCl, y después se lava el filtro a 65°C con una solución 0,1 a 2 x SSC (en el que una solución de 1 x SSC consiste en 150 mM de cloruro de sodio y 15 mM de citrato de sodio). La hibridación se puede llevar por el procedimiento descrito en el Molecular Cloning 2nd Ed.

El ADN que tiene un nivel determinado de homología con la secuencia de nucleótidos de ADN usado como una sonda es un ejemplo de la hibridación del ADN anterior en condiciones rigurosas. Tal ADN tiene homología de, por ejemplo 70% o más, preferentemente 80% o más, más preferentemente 90% o más, también preferentemente 93% o más, con particular preferencia 95% o más, y con máxima preferencia 98% o más, con el ADN usado como una sonda.

Un procedimiento de obtener el ADN de la presente invención no está particularmente limitado. Se preparan sondas o cebadores adecuados sobre la base de la información con respecto a la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NOS: 1 y 2 en el listado de secuencias en la presente memoria descriptiva, y la biblioteca de ADNc de un ser humano y similares se seleccionan por medio de tales sondas o cebadores, de modo de aislar el ADN de la presente invención. Tal biblioteca de ADNc se produce preferentemente de una célula, órgano o tejido, que expresa el ADN de la presente invención.

También es posible producir el ADN que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 por el procedimiento de PCR. Por medio de un ADN cromosómico humano o biblioteca de ADNc como un molde, se realiza la PCR con un par de cebadores que se han diseñado para amplificar la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. La condiciones de reacción de la PCR se pueden determinar según sea apropiado. Por ejemplo, un procedimiento de reacción consiste en 94°C y 30 segundos (desnaturalización), 55°C y 30 segundos a 1 minuto (apareamiento), y 72°C y 2 minutos (elongación) se define como 1 ciclo. Tal procedimiento de reacción se lleva a cabo 30 ciclos, y a partir de este momento, se lleva a cabo una reacción que consiste en 72°C y 7 minutos. A partir de este momento, el fragmento de ADN amplificado se clona en un vector adecuado capaz de replicar en un huésped tal como *Escherichia coli*.

La preparación de cebadores o sondas anteriormente mencionados, la construcción de una biblioteca de ADNc, selección de una biblioteca de ADNc, y clonación de un gen de interés ya son conocidos por los expertos en la técnica. Estas operaciones se pueden llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos descritos en Molecular Cloning 2nd Ed., Current Protocols in Molecular Biology, y similares.

### (3) Anticuerpo

Un anticuerpo se puede preparar por el reconocimiento de una porción o el total del péptido mencionado anteriormente de la presente invención como un epitopo (antígeno), y linfocitos T citotóxicos (citotíficos) inducido por la estimulación in vitro por medio del péptido descrito anteriormente. En general, CTL exhibe actividad antitumoral más fuerte que un anticuerpo.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Se puede producir por procedimientos comunes.

Por ejemplo, un anticuerpo policlonal se puede obtener por la inmunización de un mamífero con el péptido de la presente invención como un antígeno, recolección de la sangre del mamífero, y después la separación y purificación de un anticuerpo de la sangre recolectada. Los ejemplos de un mamífero inmunizado pueden incluir un ratón, un hámster, un cobayo, un pollo, una rata, un conejo, un perro, una cabra, una oveja y un bovino. El procedimiento de inmunización es conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un antígeno se puede administrar 2 o 3 veces en intervalos de 7 a 30 días. La dosis se puede ajustar aproximadamente a 0,05 a 2 mg de antígeno por administración. Una vía de administración no está particularmente limitada. Una vía de administración adecuada se puede seleccionar apropiadamente de administración subcutánea, administración intracutánea, administración intraperitoneal, administración intravenosa y administración intramuscular. Además, un antígeno se puede disolver en una solución de buffer adecuada que contiene un adyuvante comúnmente usado tal como adyuvante de Freund completo o hidróxido de aluminio, antes de usar.

Tal mamífero inmunizado se puede criar durante un determinado período de tiempo y cuando su título de anticuerpo comienza a aumentar, se puede realizar un refuerzo por medio de 100 µg a 1.000 µg del antígeno, por ejemplo, 1 o 2 meses después de la administración final, la sangre se recolecta del mamífero inmunizado. La sangre recolectada después se separa y purifica por procedimientos comunes que incluyen centrifugación, precipitación por medio de sulfato de amonio o polietilenglicol, o cromatografía tal como cromatografía por filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, o cromatografía de afinidad y, de modo de obtener un anticuerpo policlonal que reconoce la proteína de la presente invención como un antisuero policlonal.

A la inversa, un anticuerpo monoclonal se puede obtener por la preparación de hibridomas. Los hibridomas se pueden obtener, por ejemplo, por fusión celular entre las células generadoras de anticuerpo y células de mieloma.

Los hibridomas que generan el anticuerpo monoclonal se puede obtener por el siguiente procedimiento de fusión celular.

5 Las células del bazo, células del ganglio linfático, linfocitos B o similares recolectados del animal inmunizado se usan como células generadoras de anticuerpo. El péptido de la presente invención se usa como antígeno. Se puede usar un ratón, una rata, o similares como animal para inmunizar. La administración de un antígeno a tal animal se lleva a cabo por procedimientos comunes. Por ejemplo, una suspensión o líquido emulsionado de un adyuvante tal como adyuvante de Freund completo o adyuvante de Freund incompleto y el péptido de la presente invención usado como antígeno se administra por vía intravenosa, subcutánea, intracutánea o interperitoneal a un animal varias veces para la inmunización. Por ejemplo, las células del bazo se obtienen del animal inmunizado de este modo como células generadoras de anticuerpo, y las células obtenidas se fusionan con las células del mieloma por un procedimiento conocido (G. Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975)), de modo de producir hibridomas.

10 Los ejemplos de una línea celular de mieloma usada para la fusión celular pueden incluir P3X63Ag8 de ratón, línea P3U1 de ratón, y línea Sp2/0 de ratón. Para la fusión celular, se usan agentes de promoción de fusión tal como polietilenglicol o virus Sendai. Para la selección de los hibridomas después de completar la fusión celular, se usa el medio de hipoxantina aminopterina timidina (HAT) de acuerdo con procedimientos comunes. Los hibridomas por fusión celular se clonan por dilución limitante o similares. A partir de este momento, según sea necesario, se realiza una selección por inmunoensayo enzimático por medio del péptido de la presente invención, de modo de obtener una línea celular que genera un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente el péptido de la presente invención.

15 A fin de producir un anticuerpo monoclonal de interés a partir del hibridoma así obtenido, el hibridoma se puede cultivar por el procedimiento de cultivo celular común o procedimiento de formación de ascitis y el anticuerpo monoclonal se puede purificar del sobrenadante del cultivo o ascitis. El anticuerpo monoclonal se puede purificar del sobrenadante del cultivo o ascitis por procedimientos comunes. Por ejemplo, se puede usar apropiadamente en combinación fraccionamiento del sulfato de amonio, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, o cromatografía de afinidad y similares.

Más aún, se puede preparar fragmentos del anticuerpo mencionado anteriormente. Los ejemplos de tal fragmento de anticuerpo puede incluir un fragmento F(ab')<sub>2</sub> y un fragmento Fab'.

20 Además, se puede preparar un anticuerpo marcado obtenido por el anticuerpo mencionado anteriormente. Es decir, el anticuerpo producido como se describió anteriormente se puede marcar antes de usar. El tipo de una sustancia usada para marcar el anticuerpo de la presente invención y un procedimiento de marcación son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de tal procedimiento de marcación puede incluir: marcación enzimática con peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina; marcación fluorescente con FITC (isotiocianato de fluoresceína) o TRITC (isotiocianato de tetrametilrodamina B); marcación con sustancias colorantes tales como metal coloidal o látex coloreado; marcación de afinidad con biotina; y marcación isotópica con <sup>125</sup>I. El análisis o medición del péptido de la presente invención (que es un antígeno de cáncer) con el anticuerpo marcado se puede realizar de acuerdo con procedimientos ampliamente conocidos en la técnica, tales como la técnica de anticuerpo enzimático, tinción inmunohistológica, inmunotransferencia, el procedimiento del anticuerpo fluorescente directo o el procedimiento del anticuerpo fluorescente indirecto.

(4) Células T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, o población de inmunocitos que contienen estas células

30 La presente invención también se refiere a células T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que contienen estas células, que son inducidas por la estimulación *in vitro* por medio del antígeno de cáncer o péptido de la presente invención o una mezcla de ellos. Por ejemplo, cuando los linfocitos de sangre periférica o linfocitos de infiltración en el tumor se estimulan *in vitro* con el péptido de la presente invención, se inducen las células T activadas receptoras del tumor. Las células T activadas se pueden usar efectivamente para la inmunoterapia adoptiva. Más aún, el antígeno de cáncer o péptido de la presente invención se deja expresar en células dendríticas que son células que presentan antígenos fuertes *in vivo* o *in vitro*, de este modo realiza la estimulación inmunológica por la administración de las células dendríticas en las que se ha expresado el antígeno.

45 Preferentemente, las células T auxiliares, los linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que contiene estas células se inducen con estimulación *in vitro* por medio del antígeno de cáncer o péptido de la presente invención o una mezcla de ellos y un activador inmunológico. Los ejemplos de un activador inmunológico que se usan en la presente pueden incluir un factor de crecimiento celular y citoquina.

Las células T auxiliares, los linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que contiene estas células obtenidas como se describió anteriormente se transfieren en un cuerpo para suprimir el tumor, de este modo se previenen y/o tratan los cánceres.

55 Además, las células T auxiliares, los linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que contiene estas células, que pueden suprimir el tumor como se describió anteriormente, se pueden producir usando el antígeno de cáncer o péptido de la presente invención o una mezcla de ellos. Por consiguiente, la presente invención proporciona una solución del cultivo celular que contiene el antígeno de cáncer o péptido de la presente invención o



una mezcla de ellos. Por medio de tal solución del cultivo celular, se pueden producir las células T auxiliares, los linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que contiene estas células, que pueden suprimir el tumor. Además, la presente invención proporciona un kit de cultivo celular para producir las células T auxiliares, los linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que contiene estas células, que comprenden la solución del cultivo celular anteriormente mencionada y un recipiente del cultivo celular.

(5) Vacuna para el cáncer de la presente invención

Debido a que el ADN, antígeno de cáncer, y péptido de la presente invención puede inducir linfocitos T citotóxicos específicos de las células cancerosas, se prevé que ellos se pueden usar como agentes terapéuticos y/o preventivos para los cánceres. Por ejemplo, la bacteria BCG transformada por el ADN recombinante obtenida por la incorporación del ADN de la presente invención en un vector adecuado o virus tales como virus vaccinia en el genoma del cual se ha incorporado el ADN de la presente invención, se puede usar efectivamente como vacuna de virus vivo para tratar y/o prevenir los cánceres humanos. La dosis y el procedimiento de administración de la vacuna para el cáncer son los mismos que los de la vacunación ordinaria o vacuna BCG.

A saber, el ADN de la presente invención (como tal, o en forma de ADN plásmido que se incorpora en un vector de expresión), y el virus recombinante o la bacteria recombinante que contienen el ADN anterior se administran como una vacuna para el cáncer a mamíferos que incluyen un ser humano, directamente o en un estado en que se dispersan en un adyuvante. Asimismo, el péptido de la presente invención se puede administrar a estas como una vacuna para el cáncer, en un estado dispersado en un adyuvante.

Los ejemplos de un adyuvante usados en la presente invención pueden incluir Adyuvante de Freund incompleto, BCG, dimicolato de trehalosa (TDM), lipopolisacárido (LPS), adyuvante de alumbre, y adyuvante de sílice. Desde el punto de vista de la capacidad de inducir anticuerpos, se usa preferentemente el adyuvante de Freund incompleto (FIA).

(6) Sonda para diagnosticar cánceres, agente para diagnosticar cánceres, y agente preventivo y/o terapéutico contra los cánceres

El ADN de la presente invención se puede usar como una sonda de diagnóstico, en que se extraen los ADN de diversos tipos y posteriormente se examina la homología entre ellos. Más aún, esta sonda el anticuerpo descrito anteriormente también se puede usar como un agente para diagnosticar cánceres.

Es decir, una sonda se puede preparar para diagnosticar cánceres, que comprende el total o una parte de la cadena antisentido de ADN o ARN que codifica el péptido de la presente invención. Se puede preparar un agente para diagnosticar cánceres, que comprende la sonda descrita anteriormente para diagnosticar cánceres o un anticuerpo que reacciona con el péptido de la presente invención. La sonda para diagnosticar cánceres es preferentemente el total o una parte de la cadena antisentido de ADN (cADN) o ARN (ARNc) que codifica el péptido de la presente invención, que preferentemente tiene una longitud demasiado larga como sonda (al menos 20 bases). Por ejemplo, el ARNm del péptido (antígeno de cáncer) de la presente invención obtenida de un analito se detecta por medio de la cadena antisentido descrita anteriormente, de este modo permite el diagnóstico de los cánceres. Los ejemplos de un analito usado para la detección puede incluir el ADN genómico que se puede obtener por la biopsia de las células de un sujeto, tal como sangre, orina, saliva, o tejidos; ARN y ADNc, pero los ejemplos no se limitan a estos. Cuando se usa tal analito, también pueden usar los amplificados por PCR y similares.

El tipo de cáncer no está particularmente limitado en la presente memoria descriptiva. Los ejemplos específicos de cáncer pueden incluir cáncer pancreático, cáncer de colon, tumor cerebral, melanoma maligno, leucemia mielocítica crónica, leucemia mielocítica aguda, linfoma, cáncer esofágico, cáncer renal, cáncer prostático, cáncer de pulmón, cáncer de mamas, cáncer de estómago, cáncer hepático, cáncer de vesícula, cáncer testicular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer tiroideo, cáncer de vejiga, y sarcoma.

La respuesta inmune de un paciente de cáncer a las células cancerosas es inesperadamente activa y se halla que se generan anticuerpos IgG en varios tipos de proteínas. Como se describió posteriormente en los ejemplos, la proteína del antígeno hsp105α está altamente expresada específicamente en el cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de mamas, cáncer esofágico, linfoma maligno, feocromocitoma, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga y seminoma.

El péptido de la presente invención puede inducir linfocitos T citotóxicos específicos de la célula cancerosa como los epitopos de las células T. En consecuencia, es útil como agente preventivo y/o terapéutico usado para los cánceres humanos. Además, el anticuerpo preparado es también efectivo como un agente preventivo y/o terapéutico usado para los cánceres humanos, a condición de que pueda inhibir la actividad del péptido de la presente invención que es un antígeno de cáncer. Como uso práctico, el péptido de la presente invención se puede administrar directamente, o en conjunto con un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, o también en conjunto con los agentes auxiliares mencionados más adelante, según sea necesario, de modo de crear una inyección. Por otra parte, también se puede administrar por absorción percutánea por medio de la mucosa de acuerdo con un procedimiento tal como pulverización. El término "portador" que se usa en la presente significa, por ejemplo, albúmina sérica humana. Los ejemplos de un diluyente pueden incluir PBS y agua destilada.

Como dosificación, el antígeno de cáncer o péptido de la presente invención se puede administrar dentro de un intervalo entre 0,01 mg y 100 mg por una vez por adulto. Sin embargo, una dosis no se limita a al intervalo anterior. Asimismo, la forma de dosis no está particularmente limitada. También se puede usar un producto liofilizado, o gránulos producidos por la adición de un excipiente tal como azúcar al antígeno de cáncer, péptido, o anticuerpo de la presente invención.

Los ejemplos de un agente auxiliar que se puede añadir al agente de la presente invención para aumentar la actividad de inducir los linfocitos T citotóxicos pueden incluir componentes fúngicos de la bacteria BCG o similares, ISCOM descrito en Nature, vol. 344, p. 873 (1990), QS-21 de saponinas descrito en J. Immunol, vol. 148, p.1438 (1992), liposoma, e hidróxido de aluminio. Además, también pueden usar activadores inmunológicos tales como lentinano, esquizofilano, o Picibanilo como agentes auxiliares. Además, también se pueden usar citoquinas que promueven el crecimiento o diferenciación de las células T, tales como IL-2, IL-4, IL-12, IL-1, IL-6, o TNF, como agentes auxiliares.

Además, el péptido antigénico descrito anteriormente se añade a las células recolectadas de un paciente o células que tienen el mismo haplotipo HLA en un tubo de ensayo, de modo de permitir que las células presenten un antígeno. A partir de este momento, se administra en el vaso sanguíneo del paciente, de modo que los linfocitos T citotóxicos pueden ser inducidos efectivamente en el organismo del paciente. Más aún, el péptido descrito anteriormente se añade a los linfocitos de sangre periférica de un paciente, y posteriormente se cultiva en un tubo de ensayo, de modo que se pueden inducir los linfocitos T citotóxicos en el tubo de ensayo y después retornar a los vasos sanguíneos del paciente. Tal tratamiento que involucra una transferencia celular ya se ha realizado como tratamiento de cáncer y en consecuencia, es bien conocido por los expertos en la técnica.

En la inmunoterapia antitumoral específica se requiere que un antígeno diana sea un antígeno reconocido por los linfocitos T citotóxicos (células T citolíticas/CTL). El antígeno de la presente invención ha aumentado la actividad estimulante de las células T citolíticas *in vitro* sobre HLA-A24 ampliamente hallado en los japoneses, o en HLA-A2 ampliamente hallado en todo el mundo. En consecuencia, la inyección del antígeno de la presente invención en un organismo induce la activación de CTL, y como resultado, se puede prever la obtención de efectos antitumorales. Además, cuando los linfocitos se estimulan con el antígeno de la presente invención *in vitro*, se inducen las células T activadas. Las células T activadas de este modo se inyectan en un área afectada. En consecuencia, este procedimiento se puede usar efectivamente como una inmunoterapia adoptiva.

### Ejemplos

El antígeno de la presente invención, su procedimiento de producción y sus efectos se describirán en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1

##### Recolección de suero

El suero se recolectó de un paciente con cáncer pancreático. El suero recolectado se conservó a -80°C. A partir de esta muestra de suero, se eliminaron un anticuerpo que reacciona con *Escherichia coli* y el fago  $\lambda$  por medio de una columna que se llenó con materia disuelta de *Escherichia coli* y fago y sefarosa 4B. A partir de este momento, el suero resultante se diluyó 100 a 800 veces y posteriormente se usó.

##### Biblioteca de ADNc y producción de proteína

Una biblioteca de ADNc de fago producida por la inserción de ADNc de una línea celular de cáncer pancreático CFPAC-1 en un vector de expresión  $\lambda$ ZAP se adquirió en Stratagene, La Jolla, CA. *Escherichia coli* se infectó con esta biblioteca de ADNc de fago  $\lambda$  y posteriormente se cultivó en un medio de placa NZY a 42°C durante 6 horas, de modo de producir placas. A partir de este momento, la placa se cubrió con una membrana de nitrocelulosa en la que se ha infiltrado isopropil  $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG) a 37°C durante 3 horas, de modo de producir una proteína codificada por el ADNc que se ha incorporado en el fago  $\lambda$  en las placas.

##### Inmunoselección

La proteína producida por el procedimiento mencionado anteriormente se transfirió en una membrana de nitrocelulosa. Después del bloqueo, la nitrocelulosa se lavó, y después se dejó reaccionar con el suero descrito anteriormente a 4°C durante 15 horas. Después de lavar, se usó un anticuerpo IgG anti-humano de ratón marcado con peroxidasa de rábano (HRP) como anticuerpo secundario, y se dejó reaccionar con la membrana. Después del lavado, se detectó la quimioluminiscencia en una película de rayos X, y se comparó con la placa en una fotografía, de modo que se eligieron las placas positivas junto con las placas negativas periféricas. Las placas correspondientes a los sitios positivos en una reacción de color se recolectaron de una placa de agarosa NZY de 15 cm. Las placas recolectadas posteriormente se disolvieron en una solución buffer SM (100 mM de NaCl, 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, 50 mM de Tris-HCl, y 0,01% de gelatina; pH 7,5). Las placas de positivas a la reacción de color se sometieron a una segunda selección y una tercera selección por el mismo procedimiento anterior, hasta que fueron una colonia única, de este modo se obtiene un clon de fago único con el cual reacciona un anticuerpo IgG en el suero. Por el

procedimiento descrito anteriormente, se aislaron 63 clones positivos del ADNc derivado de la línea celular de cáncer pancreático.

Búsqueda de homología del gen del antígeno aislado

5 El ADN inserto se amplificó por el procedimiento de PCR, y se usó para el análisis posterior. El producto de PCR obtenido se secuenció por medio del kit de secuenciación de ADN Big Dye (PE Biosystems, CA), para determinar una secuencia de nucleótidos de este. Por medio del programa de búsqueda de homología BLAST (Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico), se compararon cada una de las secuencias de nucleótidos así determinadas de 63 tipos de genes con la información génica registrada en el banco de datos de NCBI

hsp105

10 Como resultado, se hallaron 18 clones positivos que se muestran en la Tabla 1. Uno de los clones positivos fue hsp105.

**TABLA 1**

Genes aislados por SEREX de una línea celular de adenocarcinoma ductal pancreático

Nombre del gen	Gen/identidad de secuencia	Búsqueda de base de datos SEREX <sup>a</sup>
KM-PA-1	apg-2 (familia de proteína de choque térmico 110)	NGO-St-81, NY-CO-40, NY-CO-32
KM-PA-2	EST (KIAA0124)	-
KM-PA-3	β-actina	-
KM-PA-4	Proteína tipo coactosina (CLP)	-
KM-PA-5	HALPHA44 (alfa-tubulina)	-
KM-PA-6	desconocido	-
KM-PA-7	Quinasa tipo CDC (CLK3)	-
KM-PA-8	citoqueratina 18	-
KM-PA-9	Proteína de unión poliA	-
KM-PA-10	acil-CoA-deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD)	-
KM-PA-11	desconocido	-
KM-PA-12	Cadena pesada de HLA-Cw (MHC Clase 1)	LONY-BR-26
KM-PA-13	desconocido	-
KM-PA-14	Proteína CGI 55	-
KM-PA-15	Factor inhibidor de la glicosilación(GIF)	Mz19-16a, Hom-HD1-21
KM-PA-16	desconocido	NGO-St-95, NGO-St-103
KM-PA-17	Proteína A de unión al ADN (dbpA)	-
KM-PA-18	proteína de choque térmico 105 (KIAA0201)	NY-CO-25

<sup>a</sup> El guión significa sin homología fuerte

15 Confirmación de la expresión de hsp105

La presencia o ausencia de la expresión de una proteína de hsp105 se analizó por inmunohistoquímica en varios tipos de tejidos de cáncer y en tejidos normales. Como resultado, se halló que hp105 se expresa en tejidos de cáncer pancreático en tejidos de cáncer de colon, como se muestra en las Figuras 1 y 2.

**Ejemplo 2**

<Péptido que constituye hsp105>

Un motivo de unión para HLA-A24, para el cual el 60% de las personas japonesas son positivas, es casi idéntico a un motivo, se une el Kd del ratón BALB/c. Un péptido es compartido por hsp105 humano y hsp105 de ratón y se predice que se une a ambos HLA-A24 y Kd se selecciona de la secuencia de hsp105, por medio de la predicción de unión del péptido HLA ([http://bimas/dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)). Se sintetizaron nueve tipos de péptidos que consisten en 9 o 10 aminoácidos por el procedimiento de Fmoc/PyBOP. Las secuencias de los péptidos y los valores de unión estimados para Kd se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Péptidos derivados de hsp105

Péptidos derivados de hsp105			
No.	Posición	Secuencia	Puntuación de unión
1	hsp105180-188	NYGIYKQDL	2400
2	hsp105 214-223	AFNKGKLV	960
3	hsp105 251-260	KYKLDKSKI	2880
4	hsp105 305-313	QFEELCAEL	1382
5	hsp105 433-442	TFLRRGPFEL	1920
6	hsp105 570-579	MYIETEGKMI	4800
7	hsp105 597-606	ECVYEFKDL	80
8	hsp105 682-690	HYAKIAADF	60
9	hsp105 696-705	KYNHIDSEEM	432

**Ejemplo 3**

Vacuna de ADN

El ADN del plásmido producido por la incorporación del ADNc de hsp105 de ratón en un vector de expresión pCAGGS se ajustó a una concentración adecuada. Posteriormente se usó como vacuna para la siguiente prueba de evaluación de rendimiento. Con respecto a esta vacuna de ADN hsp105 de ratón-pCAGGS, se cultivó *Escherichia coli* y a partir de este momento, se extrajo el plásmido ADN de *Escherichia coli* y se purificó, de modo de producir la vacuna en gran escala.

Efectos anticáncer de la vacuna del péptido y la vacuna de ADN

Las siguientes muestras se inyectaron en el músculo de cada ratón BALB/c: (1) una solución salina normal, (2) solo un vector, (3) un vector de ADNc de hsp105, (4) solo un adyuvante, (5) un adyuvante + un péptido. A partir de este momento, a línea celular de cáncer de colon Colon-26 derivada de un ratón singeneico, que expresa altamente hsp105, se trasplantó en forma subcutánea en el lomo del ratón. A partir de este momento, se evaluó el desarrollo del cáncer en los siguientes puntos: (1) el área de una porción cancerosa, (2) la proporción de los ratones en que se desarrolló el cáncer, y (3) la proporción de los ratones sobrevivientes. Los resultados se muestran en las Figuras 3A, 3B, y 3C.

Como se muestra en las Figuras 3A, 3B, y 3C, cuando se trasplantaron  $3 \times 10^4$  células de Colon-26, hasta 13 días después de la inmunización, se desarrolló un tumor en los 5 ratones inmunizados con solución salina normal y en los 5 ratones inmunizados solo con pCAGGS. A la inversa, en el caso de los 5 ratones inmunizados con la vacuna hsp105-ADN, se desarrolló un tumor en un ratón 20 días después de la inmunización y en otro ratón 24 días después de la inmunización. Sin embargo, los 3 ratones restantes rechazaron completamente el desarrollo de un tumor. En el caso del grupo de administración con adyuvante, desarrolló un tumor en los 5 ratones hasta 24 días después de la inmunización. Se observó una diferencia significativa entre los grupos de administración con la vacuna de ADN, vacuna de péptido y adyuvante, y los grupos de administración con solución salina normal y vector (Figura 3B). Los mismos resultados se obtuvieron con respecto al área de tumor promedio (Figura 3A).

A partir de estos resultados, es evidente que la vacuna de péptido y la vacuna de ADN tienen efectos como agentes

anticáncer. En consideración de una curva de supervivencia, 2 de los 5 ratones aún sobrevivieron 45 días después de la inmunización en los grupos de administración de solución salina normal, vector y adyuvante. Además, los 5 ratones sobrevivieron en el grupo de administración de la vacuna de ADN. El grupo de la vacuna de ADN presentó diferencias significativas de los otros 4 grupos. El grupo de la vacuna de péptido presentó un período de supervivencia significativamente más prolongado que los grupos de administración de solución salina normal, vector y adyuvante (Figura 3C). Por otra parte, los ratones que rechazaron el desarrollo de un tumor se observaron patológicamente y se confirmó que no hubo daño en los órganos normales y que una gran cantidad de células inflamatorias se filtraron en los sitios que rechazaron el desarrollo de un tumor.

Determinación del péptido del epitopo CTL de hsp105

10 A fin de identificar un péptido del epitopo CTL, se recuperaron células pancreáticas de los ratones, en las que ha actuado la vacuna de ADN-vacuna de péptido. Las células recuperadas se estimularon una vez con los 9 tipos de péptidos mostrados en la Tabla 2, y se analizó la actividad citotóxica de Colon-26 por el ensayo de liberación de 51Cr. Como resultado, se halló que entre los 9 tipos de péptidos descritos anteriormente, los siguientes 5 tipos de péptidos 1, 2, 3, 4, y 5 son útiles (Figura 4).

15 B1Asn-Tyr-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu (1)

Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu (2)

Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile (3)

Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu (4)

Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile (5)

20 Agente para diagnosticar cánceres

Por medio del anticuerpo hsp105, se puede realizar el diagnóstico patológico de los siguientes cánceres: cáncer pancreático, cáncer de colon, tumor cerebral, melanoma maligno, leucemia mielocítica crónica, leucemia mielocítica aguda, linfoma, cáncer esofágico, cáncer renal, cáncer prostático, cáncer de pulmón, cáncer de mamas, cáncer de estómago, cáncer hepático, cáncer de vesícula, cáncer testicular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer tiroideo, cáncer de vejiga, y sarcoma.

Agente terapéutico del cáncer CTL

En el caso de los ratones, se clarificó que las células T citolíticas que reconocen hsp105 y/o un péptido constituye la hsp105 como un antígeno no alteran las células normales y tienen actividad citotóxica solo en cáncer de colon de ratón. En consecuencia, existe una posibilidad de que los CTL se puedan usar como un agente terapéutico o preventivo de cáncer con pocos efectos secundarios en los cánceres pancreáticos y de colon humanos en los que hsp105 se expresa en forma elevada.

**Ejemplo 4:** Identificación del péptido del epitopo de los CTL de HLA-A24 de hsp105 en los seres humanos

A fin de determinar el péptido del epitopo de los CTL de HLA-A24 de la hsp105 en seres humanos, los linfocitos de sangre periférica recolectados de dos pacientes con cáncer de color con HLA-A24 se estimularon 4 veces con 9 tipos de péptidos mostrados en la Tabla 3. A partir de este momento, se analizó la actividad citotóxica en una línea celular de cáncer de colon humano sw620, que expresa altamente hsp105 y también expresa HLA-A24, por el ensayo de liberación de 51Cr.

En forma específica, los monocitos se separaron de la sangre periférica. Se cultivaron dos millones de monocitos por pocillo en una placa de 24 pocillos en 2 ml de solución de cultivo que contiene 10% de autosuero, IL-2 (100 IU/ml), y 10  $\mu$ M de cada péptido durante 1 semana. A partir de este momento, cada semana, el producto del cultivo anterior se estimuló con 200.000 células dendríticas (DC), que han sido inducidas durante 1 semana, pulsadas con 10 mM del péptido anterior y se expusieron a los rayos radiactivos, en forma repetida 3 veces. Seis días después, se analizó su actividad citotóxica. En la presente, se cultivaron dos millones de monocitos en presencia de GM-CSF (100 ng/ml) e IL-4 (100 U/ml) durante 5 días, y posteriormente se añadió TNF- $\alpha$  (20 ng/ml), seguido por el cultivo durante 2 días. El producto del cultivo obtenido se usó como DC.

Los CTL que alteran las células C1RA2402 estimuladas con el péptido anterior más que las que no se estimularon con el péptido anterior se definieron como positivos para el péptido específico. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Las figuras en negrita de la Tabla 3 indican que se pueden inducir los CTL que son específicos para el péptido y tienen citotoxicidad para las células cancerosas.

50

Tabla 3: Péptidos que pueden inducir las células T citotóxicas específicas del péptido ycitotóxicas para las células cancerosas por la estimulación de los linfocitos de sangre periférica humana de HLA-A24

Péptido derivado de hsp105	Posición	Secuencia	Puntuación de unión a HLA-A2402	% de lisis para			péptido 10 µM		
				Cada CTL inducido por péptido de Pt1 (HLA- A2402/) Cada CTL inducido por péptido de Pt 2 (HLA-A2402/)					
				sw620	C1RA2402	C1RA2402		sw620	C1RA2402
A24-1	180-188	NYGIYKQDL	240	16	42	31	32	13	26
A24-2	214-223	AFNKGKLVL	30	0	42	49	40	20	64
A24-3	251-260	KYKLDAKSKI	110	50	29	46	21	33	44
A24-4	305-313	QFEELCAEL	48	48	22	43	16	40	30
A24-5	433-442	TFLRRGPFEL	33	53	33	33	26	33	46
A24-6	613-622	MYIETEGKMI	90	49	22	47	29	28	52
A24-7	640-649	EYVYEFDRDKL	330	40	22	45	8	26	31
A24-8	725-733	HYAKIAADF	140	41	25	37	66	28	43
A24-9	739-748	KYNHIDSESEM	83	19	36	43	33	24	45

**Ejemplo 5:** Identificación del péptido del epitopo de CTL de HLA-A2 de hsp105 en seres humanos

5 A fin de determinar el péptido del epitopo de los CTL de HLA- A2 de hsp105 en seres humanos, los linfocitos de sangre periférica de un paciente con cáncer de colon con HLA-A2 y los de un sujeto sano con HLA-2 se estimularon 4 veces con 30 tipos de péptidos que se muestran en la Tabla 4. A partir de este momento, se analizó la actividad citotóxica sobre una línea celular de cáncer de colon humano sw620, que expresa altamente hsp105 y también expresa HLA-A2. Los procedimientos experimentales específicos fueron los mismos que en el Ejemplo 4.

10 Además, las células sw620, cuyo nivel de expresión de hsp105 fue reducido por ARNi, se definieron como las células sw620 hsp105-ARNi. Si los CTL no alteraron las células sw620 hsp105-ARNi, por lo tanto se consideró que tenían actividad citotóxica específica para hsp105. Además, los CTL que alteran las células sw620 hsp105-ARNi estimuladas con el péptido anterior más que las que no estimularon con el péptido anterior se definieron como positivas específicas del péptido. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Las cifras en negrita de la Tabla 4 indican que se pueden inducir los CTL que son específicos para el péptido y tienen citotoxicidad para las células cancerosas

15 Tabla 4: Péptidos que pueden inducir las células T citolíticas específicos del péptido y citotóxicas para las células cancerosas por la estimulación de los linfocitos de sangre periférica humana de HLA-A2

Péptido derivado de hsp105	Posición	Secuencia	Puntuación de unión a HLA-A0201	Cada CTL inducido por péptido de Pt1 (HLA-A0207/3301)			Cada CTL inducido por péptido de HD 1 (HLA-A0201/0207)		
				% de lisis para			% de lisis para		
				sw620 (HLA-A0201)	sw620 hsp105-RNAI	sw620 hsp105-RNAI péptido 10µM	sw620 (HLA-A0201)	sw620 hsp105 RNAI	sw620 hsp105-RNAI péptido 10µM
A2-1	06-94	NLSYDLVPL	49	5	68	56	-	-	-
A2-2	103-111	VMYMGEEHL	41	20	41	36	-	-	-
A2-3	105-114	YMGEEHLFSV	12637	5	0	0	-	-	-
A2-4	120-120	MLLTKLKET	107	0	0	1	6	35	3
A2-5	141-149	VISVPSFFT	55	4	0	5	-	-	-
A2-6	155-163	SVLCAAQIV	37	5	7	18	4	0	13
A2-7	169-177	RLMNDMTAV	591	4	0	8	2	29	32
A2-8	190-199	SLDEKPRIVV	46	30	18	0	29	9	40
A2-9	202-210	DMGHSAFQV	21	26	0	3	-	-	-
A2-10	222-231	VLGTAFDPFL	759	0	29	20	2	0	0
A2-11	265-273	RLYQECEKL	33	18	0	28	15	0	17
A2-12	275-284	KLMSSNSTDL	276	10	1	13	10	28	58
A2-13	276-284	LMSSNSTDL	26	11	0	21	11	0	14
A2-14	300-309	KMNRSQFEEL	50	11	0	0	44	61	9
A2-15	304-313	SQFEELCAEL	32	12	0	4	21	0	9
A2-16	313-321	LLQKIEVPL	36	10	21	8	-	-	-
A2-17	323-332	SLLEQTHLKV	1055	1	76	34	32	0	0
A2-10	381-389	AILSPAFKV	205	50	0	0	22	28	9
A2-19	434-422	FLRRGPFEL	43	8	39	3	-	-	-

(continuación)

Péptido derivado de hsp105	Posición	Secuencia	Puntuación de unión a HLA-A0201	Cada CTL inducido por péptido de Pt1 (HLA-A0207/3301)			Cada CTL inducido por péptido de HD 1 (HLA-A0201/0207)		
				% de lisis para			% de lisis para		
				sw620 (HLA-A0201)	sw620 hsp105-RNAI	sw620 hsp105-RNAI péptido 10µM	sw620 (HLA-A0201)	sw620 hsp105-RNAI	sw620 hsp105-RNAI péptido 10µM
A2-20	458-467	KIGRFVVQNV	76	24	0	9	32	9	4
A2-21	601-610	NLVWQLGKDL	21	7	0	4	5	0	4
A2-22	602-610	LVWQLGKDL	26	19	0	3	-	-	-
A2-23	641-649	YVYEFRDKL	210	26	2	13	0	9	23
A2-24	848-657	KLCGPYEKFI	200	9	0	0	42	0	9
A2-25	668-676	LLTETEDWL	401	32	0	27	23	42	27
A2-26	675-684	WLYEEGEDQA	146	18	0	41	11	21	3
A2-27	694-702	ELMKIGTPV	19	14	0	13	22	0	0
A2-27	694-702	ELMKIGTPV	19	14	0	13	22	0	0
A2-28	714-723	KMFEELGQRL	819	11	2	0	5	0	0
A2-29	757-765	EVMEWMNNV	15	1	0	0	-	-	-
A2-30	765-774	VMNAQAKKSL	26		0		0	11	26

**Ejemplo 6:** Resultados del análisis inmunohistoquímico de hsp105 en tejidos

5 Se analizó inmunohistoquímicamente la expresión de hsp105 en varios tejidos. En forma específica, se prepararon secciones finas con un tamaño de 3 mm a partir de los bloques obtenidos por la inmovilización de varios tejidos con formalina y su inclusión en parafina. A partir de este momento, mediante el uso del kit ABC-PO coloración VECTOR (IgG de conejo) (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA), estas secciones se sometieron al análisis inmunohistoquímico por el procedimiento ABC (técnica de peroxidasa inmune del complejo avidina-biotina). Se adquirió Ab HSP105 anti-humano policlonal de conejo (SANTACRUZ, Santa Cruz, CA) y posteriormente se diluyó 200 veces. El producto obtenido se usó como un anticuerpo primario.

15 La Figura 5 es una microfotografía que muestra los resultados del análisis inmunohistoquímico anterior. En la Figura 5, los símbolos tienen los siguientes significados. A: cáncer de colon, B: cáncer de colon en pólipo del colon, C: metástasis hepática del cáncer de colon, D: cáncer pancreático, E: insulinoma, F: adenocarcinoma papilar en cáncer de mamas, G: cáncer escirro de cáncer de mamas, H: cáncer esofágico, I: cáncer de tiroides, J: linfoma maligno gástrico, K: feocromocitoma, L: cáncer de vejiga, M: testículos, y N: seminoma. Tal como evidente a partir de los resultados que se muestran en la Figura 5, se observó un alto nivel de expresión de hsp105 en A, B, C, D, E, F, H, I, J, K, L, M, y N, es decir, tumores diferentes de G, y también en testículos.

**Ejemplo 7:** Actividad antitumoral *in vivo* de la línea de células T auxiliares positivas a CD4 de ratón inducidas por hsp105

20 Se recolectó el bazo de un ratón BALB/c y se trituró para separar las células del bazo. Se cultivaron 200.000 células del bazo por pocillo en una placa plana de 96 pocillos en 200 µl de una solución de cultivo que contiene IL-2 (100 IU/ml) y 2 µg/ml de proteína de hsp105 recombinante durante 1 semana. A partir de este momento, cada semana, el producto de cultivo se estimuló repetidamente con 200.000 células del bazo, que se habían pulsado con 2 µg/ml de proteína de hsp105 recombinante y posteriormente se expusieron a los rayos radiactivos, de modo de establecer

25 múltiples líneas de células T auxiliares positivas a CD4 (Th). La expresión de CD4 y CD8 en la superficie de las células se confirmó por la realización de la tinción inmunofluorescente con el anticuerpo monoclonal CD4-FITC de ratón, CD8-FITC (IMMUNOTECH, Marseille, Francia), y posteriormente se analizó con FACS (Figura 6A). Se examinó por el ingreso de [<sup>3</sup>H] timidina, reaccione o no específicamente Th con la proteína hsp105 y se cultive. En forma específica, se colocaron 150.000 células del bazo en cada pocillo de una placa plana de 96 pocillos, y varios



pocillos se pulsaron con la proteína hsp105 toda la noche, y los otros pocillos no se pulsaron con esta. A ambos tipos de pocillos, se añadieron 30.000 células Th, seguido por la reacción durante 72 horas (se añadió 1  $\mu$ Ci de [ $^3$ H] timidina a cada pocillo durante las últimas 16 horas). A partir de este momento, se midió el ingreso de [ $^3$ H] timidina con un contador de centelleo líquido. Las células Th reaccionaron específicamente con la proteína hsp105 y crecieron (Figura 6B). Por otra parte, 24 horas después de la adición de Th, se guardó el sobrenadante. En consecuencia, se midieron IFN- $\gamma$  e IL-4 secretadas de Th como resultado de la reacción con ELISA Ready-SET-Go! con IFN- $\gamma$  de ratón, IL-4 (eBioscience). La Th fue del tipo Th1, que genera una gran cantidad de IFN- $\gamma$  como resultado de la reacción específica con la proteína hsp105 (Figura 6C). Se implantó en forma subcutánea Colon-26 en el lomo de un ratón BALB/c para formar un tumor con un tamaño de 3 mm. A partir de este momento, la Th anterior se inyectó en el sitio local, seguido por la observación de la progresión. Como resultado, después de tal tratamiento, el crecimiento del tumor Colon-26 se retardó claramente (Figura 6D).

A partir de los resultados descritos anteriormente, se halló que la línea de células T auxiliares positivas a CD4 de ratón BALB/c inducido por la proteína hsp105 crece específicamente en la proteína hsp105 y que retarda el crecimiento de la masa tumoral de la línea celular de cáncer de colon Colon-26 que expresa altamente la hsp105.

#### **Ejemplo 8:** Línea de células T auxiliares positivas a CD4 de pacientes con cáncer de colon inducida por hsp105

Los monocitos se separaron de la sangre periférica. Se cultivaron 200.000 monocitos por pocillo en una placa plana de 96 pocillos en 200  $\mu$ l de una solución de cultivo que contiene IL-2 (100 IU/ml) y 2  $\mu$ g/ml de proteína de hsp105 recombinante durante 1 semana. A partir de este momento, cada semana, el producto de cultivo se estimuló repetidamente con 200.000 monocitos, que se habían pulsado con 2  $\mu$ g/ml de proteína de hsp105 recombinante y posteriormente se expusieron a los rayos radiactivos, de modo de establecer múltiples líneas de células T auxiliares positivas a CD4 (Th). La expresión de CD4 y CD8 en la superficie de las células se confirmó por la realización de la tinción inmunofluorescente por medio del uso CD4 anti-humana Pharmingen, CD8-FITC y posteriormente se analizó con FACS. Se examinó de la misma manera que en el Ejemplo 7, reaccione o no específicamente Th con la proteína hsp105 y se cultive. Las células Th reaccionaron específicamente con la proteína hsp105 y crecieron (Figura 7A). Además, de la misma manera que en el Ejemplo 7, se midieron IFN- $\gamma$  e IL-4 secretadas de Th como resultado de la reacción mediante el kit de ELISA US IFN- $\gamma$  humana, IL-4 (BIOSOURCE, Camarillo, CA). La Th fue del tipo Th1, que genera una gran cantidad de IFN- $\gamma$  como resultado de la reacción específica con la proteína hsp105 (Figura 7B). En general, se ha sabido que Th1 actúa de forma favorable para la inducción de los CTL y la inmunidad antitumoral. Se halló que tal Th1 también se puede inducir en los seres humanos por la estimulación de los linfocitos de sangre periférica con la proteína hsp105.

#### **Ejemplo 9:** Actividad antitumoral *in vivo* de los linfocitos T citotóxicos estimulados con el péptido hsp105

Se examinó si los linfocitos T citotóxicos (CTL) de ratón BALB/c inducidos por un péptido derivado de hsp105 Asn-Tyr-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu (SEQ ID NO: 3) reducen o no una masa tumoral de la línea celular de cáncer de colon Colon-26 que expresa altamente la hsp105. En forma específica, se implantó en forma subcutánea Colon-26 en el lomo de un ratón BALB/c para formar un tumor con un tamaño de 5 mm. A partir de este momento, se inyectaron CTL en el sitio local. Una semana más tarde, el ratón se sometió a examen de anatomía, y el sitio se observó patológicamente por tinción con HE. Los resultados se muestran en la Figura 8. Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Figura 8, el tumor se redujo claramente por la administración de los CTL inducidos por el péptido derivado de hsp105.

Asimismo, se examinó si los linfocitos T citotóxicos (CTL) de un paciente con cáncer de colon inducidos por un péptido derivado de hsp105 Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Asn-Ser-Thr-Asp-Leu (SEQ ID NO: 14) reducen o no una masa tumoral de la línea celular de cáncer de colon sw620 que expresa altamente la hsp105. En forma específica se implantó en forma subcutánea sw620 en el lomo de un ratón desnudo para formar un tumor con un tamaño de 5 mm, y a partir de este momento, se inyectaron los CTL en el sitio local.

Una semana más tarde después de la inyección de los CTL, el tumor se redujo. Dos semanas después del tratamiento, el ratón se sometió a examen de anatomía, y el sitio se observó patológicamente por tinción con HE. Los resultados se muestran en la Figura 9. Como es evidente a partir de los resultados mostrados en la Figura 9, el aumento del tumor se retardó claramente por la administración de los CTL.

#### Aplicabilidad industrial

La proteína del antígeno de cáncer y el péptido antigénico de la presente invención, o ADN que codifica la proteína o péptido de la presente invención, se pueden usar como una excelente vacuna anticáncer que tiene pocos efectos secundarios tales como auto-lesión. Además, un anticuerpo se puede usar como un agente diagnóstico. Más aún, las células T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que contiene estas células, que se estimulan y activan con el antígeno de la presente invención, se pueden usar como agentes anticáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Kumamoto Technology & Industry Foundation
- <120> Antígenos de cáncer y su utilización
- <130> P21550EP
- 5 <140> EP 03 791 418.1
- <141> 2003-08-29
- <150> JP2002-255668
- <151> 2002-08-30
- <150> JP2002-341168
- 10 <151> 2002-11-25
- <160> 41
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 858
- 15 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

Met Ser Val Val Gly Leu Asp Val Gly Ser Gln Ser Cys Tyr Ile Ala
1          5          10          15

Val Ala Arg Ala Gly Gly Ile Glu Thr Ile Ala Asn Glu Phe Ser Asp
          20          25          30

Arg Cys Thr Pro Ser Val Ile Ser Phe Gly Ser Lys Asn Arg Thr Ile
          35          40          45

Gly Val Ala Ala Lys Asn Gln Gln Ile Thr His Ala Asn Asn Thr Val
50          55          60

Ser Asn Phe Lys Arg Phe His Gly Arg Ala Phe Asn Asp Pro Phe Ile
65          70          75          80

Gln Lys Glu Lys Glu Asn Leu Ser Tyr Asp Leu Val Pro Leu Lys Asn
          85          90          95

Gly Gly Val Gly Ile Lys Val Met Tyr Met Gly Glu Glu His Leu Phe

```

ES 2 371 394 T3

	100							105							110
Ser	Val	Glu	Gln	Ile	Thr	Ala	Met	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu	Lys	Glu	Thr
		115					120					125			
Ala	Glu	Asn	Ser	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Thr	Asp	Cys	Val	Ile	Ser	Val
	130					135					140				
Pro	Ser	Phe	Phe	Thr	Asp	Ala	Glu	Arg	Arg	Ser	Val	Leu	Asp	Ala	Ala
145					150					155					160
Gln	Ile	Val	Gly	Leu	Asn	Cys	Leu	Arg	Leu	Met	Asn	Asp	Met	Thr	Ala
				165					170					175	
Val	Ala	Leu	Asn	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Lys	Gln	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Asp
			180					185					190		
Glu	Lys	Pro	Arg	Ile	Val	Val	Phe	Val	Asp	Met	Gly	His	Ser	Ala	Phe
		195					200					205			
Gln	Val	Ser	Ala	Cys	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Lys	Leu	Lys	Val	Leu	Gly
	210					215					220				
Thr	Ala	Phe	Asp	Pro	Phe	Leu	Gly	Gly	Lys	Asn	Phe	Asp	Glu	Lys	Leu
225					230					235					240
Val	Glu	His	Phe	Cys	Ala	Glu	Phe	Lys	Thr	Lys	Tyr	Lys	Leu	Asp	Ala
				245					250					255	
Lys	Ser	Lys	Ile	Arg	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	Tyr	Gln	Glu	Cys	Glu	Lys
			260					265					270		
Leu	Lys	Lys	Leu	Met	Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Asn	Ile
		275					280					285			
Glu	Cys	Phe	Met	Asn	Asp	Lys	Asp	Val	Ser	Gly	Lys	Met	Asn	Arg	Ser
	290					295					300				
Gln	Phe	Glu	Glu	Leu	Cys	Ala	Glu	Leu	Leu	Gln	Lys	Ile	Glu	Val	Pro
305					310					315					320

ES 2 371 394 T3

Leu Tyr Ser Leu Leu Glu Gln Thr His Leu Lys Val Glu Asp Val Ser  
 325 330 335  
 Ala Val Glu Ile Val Gly Gly Ala Thr Arg Ile Pro Ala Val Lys Glu  
 340 345 350  
 Arg Ile Ala Lys Phe Phe Gly Lys Asp Ile Ser Thr Thr Leu Asn Ala  
 355 360 365  
 Asp Glu Ala Val Ala Arg Gly Cys Ala Leu Gln Cys Ala Ile Leu Ser  
 370 375 380  
 Pro Ala Phe Lys Val Arg Glu Phe Ser Val Thr Asp Ala Val Pro Phe  
 385 390 395 400  
 Pro Ile Ser Leu Ile Trp Asn His Asp Ser Glu Asp Thr Glu Gly Val  
 405 410 415  
 His Glu Val Phe Ser Arg Asn His Ala Ala Pro Phe Ser Lys Val Leu  
 420 425 430  
 Thr Phe Leu Arg Arg Gly Pro Phe Glu Leu Glu Ala Phe Tyr Ser Asp  
 435 440 445  
 Pro Gln Gly Val Pro Tyr Pro Glu Ala Lys Ile Gly Arg Phe Val Val  
 450 455 460  
 Gln Asn Val Ser Ala Gln Lys Asp Gly Glu Lys Ser Arg Val Lys Val  
 465 470 475 480  
 Lys Val Arg Val Asn Thr His Gly Ile Phe Thr Ile Ser Thr Ala Ser  
 485 490 495  
 Met Val Glu Lys Val Pro Thr Glu Glu Asn Glu Met Ser Ser Glu Ala  
 500 505 510  
 Asp Met Glu Cys Leu Asn Gln Arg Pro Pro Glu Asn Pro Asp Thr Asp  
 515 520 525

ES 2 371 394 T3

Lys Asn Val Gln Gln Asp Asn Ser Glu Ala Gly Thr Gln Pro Gln Val  
 530 535 540

Gln Thr Asp Ala Gln Gln Thr Ser Gln Ser Pro Pro Ser Pro Glu Leu  
 545 550 555 560

Thr Ser Glu Glu Asn Lys Ile Pro Asp Ala Asp Lys Ala Asn Glu Lys  
 565 570 575

Lys Val Asp Gln Pro Pro Glu Ala Lys Lys Pro Lys Ile Lys Val Val  
 580 585 590

Asn Val Glu Leu Pro Ile Glu Ala Asn Leu Val Trp Gln Leu Gly Lys  
 595 600 605

Asp Leu Leu Asn Met Tyr Ile Glu Thr Glu Gly Lys Met Ile Met Gln  
 610 615 620

Asp Lys Leu Glu Lys Glu Arg Asn Asp Ala Lys Asn Ala Val Glu Glu  
 625 630 635 640

Tyr Val Tyr Glu Phe Arg Asp Lys Leu Cys Gly Pro Tyr Glu Lys Phe  
 645 650 655

Ile Cys Glu Gln Asp His Gln Asn Phe Leu Arg Leu Leu Thr Glu Thr  
 660 665 670

Glu Asp Trp Leu Tyr Glu Glu Gly Glu Asp Gln Ala Lys Gln Ala Tyr  
 675 680 685

Val Asp Lys Leu Glu Glu Leu Met Lys Ile Gly Thr Pro Val Lys Val  
 690 695 700

Arg Phe Gln Glu Ala Glu Glu Arg Pro Lys Met Phe Glu Glu Leu Gly  
 705 710 715 720

Gln Arg Leu Gln His Tyr Ala Lys Ile Ala Ala Asp Phe Arg Asn Lys  
 725 730 735

ES 2 371 394 T3

Asp Glu Lys Tyr Asn His Ile Asp Glu Ser Glu Met Lys Lys Val Glu  
 740 745 750

Lys Ser Val Asn Glu Val Met Glu Trp Met Asn Asn Val Met Asn Ala  
 755 760 765

Gln Ala Lys Lys Ser Leu Asp Gln Asp Pro Val Val Arg Ala Gln Glu  
 770 775 780

Ile Lys Thr Lys Ile Lys Glu Leu Asn Asn Thr Cys Glu Pro Val Val  
 785 790 795 800

Thr Gln Pro Lys Pro Lys Ile Glu Ser Pro Lys Leu Glu Arg Thr Pro  
 805 810 815

Asn Gly Pro Asn Ile Asp Lys Lys Glu Glu Asp Leu Glu Asp Lys Asn  
 820 825 830

Asn Phe Gly Ala Glu Pro Pro His Gln Asn Gly Glu Cys Tyr Pro Asn  
 835 840 845

Glu Lys Asn Ser Val Asn Met Asp Leu Asp  
 850 855

<210> 2

<211> 3611

35 <212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

gaggaagtgg gacctcccct tttgggtcgg tagttcagcg ccggcgccgg tgtgcgagcc  
 60

gcggcagagt gaggcaggca acccgaggtg cggagcgacc tgcggaggct gagccccgct  
 120

ttctcccagg gtttcttata gccagccgc cgctgtcccc gggggagtag gaggtcctg  
 180

acaggccgcg gctgtctgtg tgtccttctg agtgtcagag gaacggccag accccgcggg  
 240

ccggagcaga acgcggccag ggcagaaagc ggccggcagga gaagcaggca gggggccgga  
 300

ES 2 371 394 T3

ggacgcagac cgagacccga ggcggaggcg gaccgcgagc cggccatgtc ggtggtgggg  
360

ttggacgtgg gctcgcagag ctgctacatc gcggtagccc gggccggggg catcgagacc  
420

atcgccaatg agttcagcga ccggtgcacc ccgtcagtca tatcatttgg atcaaaaaat  
480

agaacaatcg gagttgcagc caaaaatcag caaatcactc atgcaaaca tacggtgtct  
540

aacttcaaaa gatttcatgg ccgagcattc aacgaccctc tcattcaaaa ggagaaggaa  
600

aacttgagtt acgatttggg tccattgaaa aatggtggag ttggaataaa ggtaatgtac  
660

atgggtgaag aacatctatt tagtgtggag cagataacag ccatgttgtt gactaagctg  
720

aaggaaactg ctgaaaacag cctcaagaaa ccagtaacag attgtgttat ttcagtcccc  
780

tccttcttta cagatgctga gaggcgatct gtgtagatg ctgcacagat tgttggccta  
840

aactgtttaa gacttatgaa tgacatgaca gctgttgctt tgaattacgg aatttataag  
900

caggatctcc caagcctgga tgagaaacct cggatagtgg tttttgttga tatgggacat  
960

tcagcttttc aagtgtctgc ttgtgctttt aacaagggaa aattgaaggt actgggaaca  
1020

gcttttgatc ctttcttagg aggaaaaaac ttcgatgaaa agttagtgga acatttctgt  
1080

gcagaattta aaactaagta caagttggat gcaaaatcca aaatacgagc actcctacgt  
1140

ctgtatcagg aatgtgaaaa actgaaaaag ctaatgagct ctaacagcac agaccttcca  
1200

ctgaatatcg aatgctttat gaatgataaa gatgtttccg gaaagatgaa caggtcacia  
1260

tttgaagaac tctgtgctga acttctgcaa aagatagaag tacccttta ttcactgttg  
1320

gaacaaactc atctcaaagt agaagatgtg agtgcagttg agattgttgg aggcgctaca  
1380

ES 2 371 394 T3

cgaattccag ctgtgaagga aagaattgcc aaattctttg gaaaagatat tagcacaaca  
1440

ctcaatgcag atgaagcagt agccagagga tgtgcattac agtgtgcaat actttccccg  
1500

gcatttaaag ttagagaatt ttccgtcaca gatgcagttc cttttccaat atctctgatc  
1560

tggaaccatg attcagaaga tactgaaggt gttcatgaag tcttttagtcg aaaccatgct  
1620

gctcctttct ccaaagttct cacctttctg agaagggggc cttttgagct agaagctttc  
1680

tattctgatc cccaaggagt tccatatcca gaagcaaaaa taggccgctt tgtagttcag  
1740

aatgtttctg cacagaaaga tggagaaaaa tctagagtaa aagtcaaagt gcgagtcaac  
1800

accatggca ttttcaccat ctctacggca tctatggtg agaaagtccc aactgaggag  
1860

aatgaaatgt cttctgaagc tgacatggag tgtctgaatc agagaccacc agaaaacca  
1920

gacactgata aaaatgtcca gcaagacaac agtgaagctg gaacacagcc ccaggtacaa  
1980

actgatgctc aacaaacctc acagtctccc cttcacctg aacttacctc agaagaaaac  
2040

aaaatcccag atgctgacaa agcaaatgaa aaaaaagttg accagcctcc agaagctaaa  
2100

aagcccaaaa taaaggtggt gaatgttgag ctgcctattg aagccaactt ggtctggcag  
2160

ttagggaaag accttcttaa catgtatatt gagacagagg gtaagatgat aatgcaagat  
2220

aaattgaaa aagaaaggaa tgatgctaaa aatgcagttg aggaatatgt gtatgagttc  
2280

agagacaagc tgtgtggacc atatgaaaaa tttatatgtg agcaggatca tcaaaatttt  
2340

ttgagactcc tcacagaaac tgaagactgg ctgtatgaag aaggagagga ccaagctaaa  
2400

caagcatatg ttgacaagtt ggaagaatta atgaaaattg gcaactccagt taaagttcgg



ES 2 371 394 T3

2460

tttcaggaag ctgaagaacg gccaaaaatg tttgaagaac taggacagag gctgcagcat  
2520

tatgccaaga tagcagctga cttcagaaat aaggatgaga aatacaacca tattgatgag  
2580

tctgaaatga aaaaagtgga gaagtctggt aatgaagtga tggaatggat gaataatgtc  
2640

atgaatgctc aggctaaaaa gagtcttgat caggatccag ttgtacgtgc tcaggaaatt  
2700

aaaacaaaaa tcaaggaatt gaacaacaca tgtgaaccg ttgtaacaca accgaaacca  
2760

aaaattgaat cacccaaact ggaaagaact ccaaatggcc caaatattga taaaaaggaa  
2820

gaagatttag aagacaaaaa caatthtgggt gctgaacctc cacatcagaa tggatgaatgt  
2880

taccctaatag agaaaaattc tgthtaatatg gactthggact agataacctt aaattggcct  
2940

attccttcaa ttaataaaat atthtttgcca tagtatgtga ctctacataa catactgaaa  
3000

ctatttatat tttctthttt aaggatattt agaaattthg tgtatttatat ggaaaaagaa  
3060

aaaaagctta agtctgtagt cthttatgatc cthaaaggga aaattgcctt ggtaactthc  
3120

agattcctgt ggaattgtga attcactacta agctthtctgt gcagtctcac catttgcac  
3180

actgaggatg aaactgactt thgtctthttg gagaaaaaaa actgtactgt tgttcaagag  
3240

ggctgtgatt aaaatctthta agcattthgtt cctgccaagg tagthttctt gcattthgct  
3300

ctccattcag catgtgtgtg ggtgtggatg thtataaaca agactaagtc tgacttcata  
3360

agggtthtct aaaaccattt ctgtccaaga gaaatgact thttgctthg atattaaaaa  
3420

thcaatgagt aaaacaaaag ctagtcaaat gtgttagcag catgcagaac aaaaactthta  
3480

ES 2 371 394 T3

aactttctct ctactatac agtatattgt caatgtgaaa gtgtggaatg gaagaaatgt  
3540

cgatcctggt gtaactgatt gtgaacactt ttatgagctt taaaataaag ttcaccttat  
3600

ggtgtcattt t  
3611

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 3

Asn Tyr Gly Ile Tyr Lys Gln Asp Leu  
1 5

10 <210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido sintético

<400> 4

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

<210> 5

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 5

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

25

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

5 <400> 6

Gln Phe Glu Glu Leu Cys Ala Glu Leu  
1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 7

Met Tyr Ile Glu Thr Glu Gly Lys Met Ile  
1 5 10

15

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido sintético

<400> 8

Thr Phe Leu Arg Arg Gly Pro Phe Glu Leu  
1 5 10

<210> 9

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

30 <400> 9

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

ES 2 371 394 T3

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> péptido sintético

<400> 10

His Tyr Ala Lys Ile Ala Ala Asn Phe  
1 5

<210> 11

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

15 <400> 11

Lys Tyr Asn His Ile Asp Glu Ser Glu Met  
1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 12

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

25 <210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> péptido sintético

<400> 13

Arg Leu Tyr Gln Glu Cys Glu Lys Leu  
 1 5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 14

Lys Leu Met Ser Ser Asn Ser Thr Asp Leu  
 1 5 10

10 <210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido sintético

<400> 15

Leu Met Ser Ser Asn Ser Thr Asp Leu  
 1 5

<210> 16

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 16

Ser Gln Phe Glu Glu Leu Cys Ala Glu Leu  
 1 5 10

25 <210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> péptido sintético

ES 2 371 394 T3

<400> 17

Lys Ile Gly Arg Phe Val Val Gln Asn Val  
1 5 10

<210> 18

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 18

Tyr Val Tyr Glu Phe Arg Asp Lys Leu  
1 5

10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido sintético

<400> 19

Leu Leu Thr Glu Thr Glu Asp Trp Leu  
1 5

<210> 20

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

25 <400> 20

Trp Leu Tyr Glu Glu Gly Glu Asp Gln Ala  
1 5 10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 21

Glu Leu Met Lys Ile Gly Thr Pro Val  
1 5

5 <210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> péptido sintético

<400> 22

Val Met Asn Ala Gln Ala Lys Lys Ser Leu  
1 5 10

<210> 23

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 23

Val Ile Ser Val Pro Ser Phe Phe Thr  
1 5

20

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> péptido sintético

<400> 24

Ser Val Leu Asp Ala Ala Gln Ile Val  
1 5

<210> 25

30 <211> 9

<212> PRT

ES 2 371 394 T3

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 25

Arg Leu Met Asn Asp Met Thr Ala Val  
1 5

5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> péptido sintético

<400> 26

Asp Met Gly His Ser Ala Phe Gln Val  
1 5

<210> 27

15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

20

<400> 27

Asn Leu Val Trp Gln Leu Gly Lys Asp Leu  
1 5 10

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 28

Leu Val Trp Gln Leu Gly Lys Asp Leu

1

5



<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> péptido sintético

<400> 29

Lys Leu Cys Gly Pro Tyr Glu Lys Phe Ile  
 1 5 10

<210> 30

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

15 <400> 30

Asn Leu Ser Tyr Asp Leu Val Pro Leu  
 1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 31

Val Met Tyr Met Gly Glu Glu His Leu  
 1 5

25 <210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> péptido sintético

<400> 32

ES 2 371 394 T3

Tyr Met Gly Glu Glu His Leu Phe Ser Val  
1 5 10

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 33

Met Leu Leu Thr Lys Leu Lys Glu Thr  
1 5

10 <210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido sintético

<400> 34

Val Leu Gly Thr Ala Phe Asp Pro Phe Leu  
1 5 10

<210> 35

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 35

Lys Met Asn Arg Ser Gln Phe Glu Glu Leu  
1 5 10

25 <210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> péptido sintético

ES 2 371 394 T3

<400> 36

Leu Leu Gln Lys Ile Glu Val Pro Leu  
1 5

<210> 37

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 37

Ser Leu Leu Glu Gln Thr His Leu Lys Val  
1 5 10

10

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido sintético

<400> 38

Ala Ile Leu Ser Pro Ala Phe Lys Val  
1 5

<210> 39

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

25 <400> 39

Phe Leu Arg Arg Gly Pro Phe Glu Leu  
1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

ES 2 371 394 T3

<223> péptido sintético

<400> 40

Lys Met Phe Glu Glu Leu Gly Gln Arg Leu  
1 5 10

<210> 41

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

10 <400> 41

Glu Val Met Glu Trp Met Asn Asn Val  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Antígeno de cáncer para usar en la prevención y/o tratamiento terapéutico de cánceres, tal antígeno de cáncer es un péptido de cualquiera de los siguientes (A) o (B):

(A) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 29,

5 (B) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 22 y a una adición de uno a 5 aminoácidos, y tiene actividad inmunoestimuladora y activa los linfocitos T citotóxicos que reconocen una proteína del antígeno de cáncer;

en el que el antígeno de cáncer tiene actividad estimuladora de células T de estimulación de los linfocitos T citotóxicos.

10 2. Un ADN que codifica el antígeno de cáncer de la reivindicación 1 para usar en la prevención y/o tratamiento terapéutico del cáncer, en el que el antígeno de cáncer tiene actividad estimuladora de células T de estimulación de los linfocitos T citotóxicos.

3. Las células T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que comprende estas células, que son inducidas por la estimulación *in vitro* mediante el antígeno de cáncer de la reivindicación 1.

15 4. Las células T auxiliares, linfocitos T citotóxicos, o la población de inmunocitos que comprende estas células de acuerdo con la reivindicación 3, que adicionalmente comprende un activador inmunológico.

5. Células dendríticas o una población de inmunocitos que comprende estas células, que se pulsan *in vitro* con el antígeno de cáncer de la reivindicación 1.

20 6. Las células dendríticas o una población de inmunocitos que comprende estas células de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente un activador inmunológico.

7. Un kit de cultivo celular para producir las células T auxiliares de los linfocitos T citotóxicos o una población de inmunocitos que comprende estas células de la reivindicación 3 a 6, que comprende una solución de cultivo celular y un recipiente del cultivo celular, en el que la solución del cultivo celular usada para producir las células T auxiliares o linfocitos T citotóxicos, o una población de inmunocitos que comprende estas células de cualquiera de las  
25 reivindicaciones 3 a 6, que comprende el antígeno de cáncer de la reivindicación 1.

8. Un medicamento para usar en la prevención y/o tratamiento de los cánceres, que comprende el péptido de la reivindicación 1, y las células T auxiliares, los linfocitos T citotóxicos, las células dendríticas o la población de inmunocitos que comprende estas células de las reivindicación 3 a 6.

30 9. Un medicamento para usar en la prevención y/o tratamiento de los cánceres, que comprende las células T auxiliares, los linfocitos T citotóxicos, las células dendríticas o la población de inmunocitos que comprende estas células de la reivindicación 3 a 6.

Fig. 1

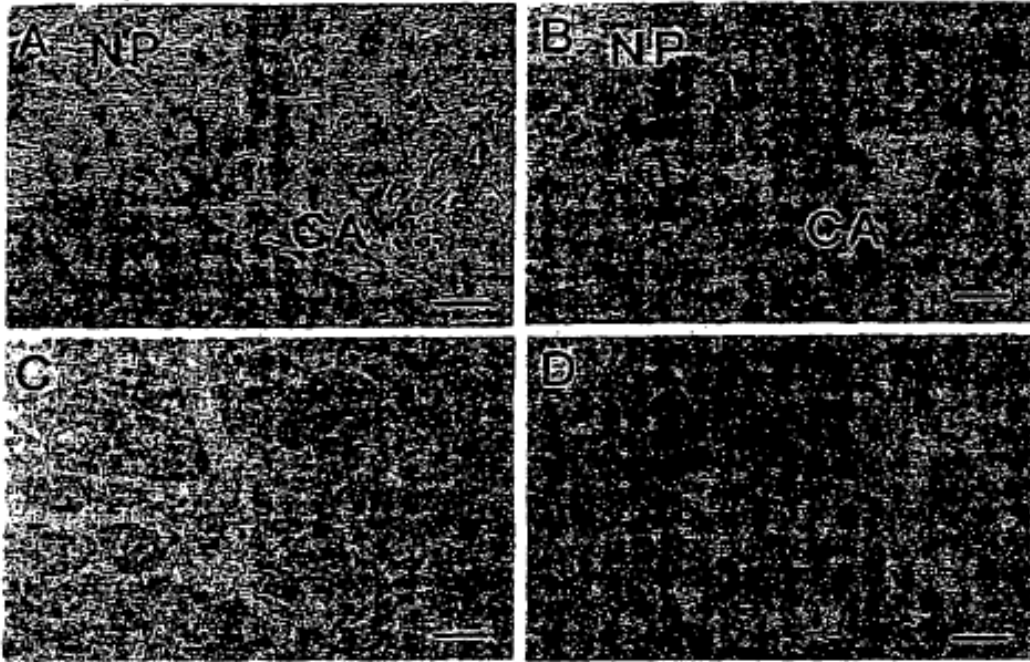


Fig. 2

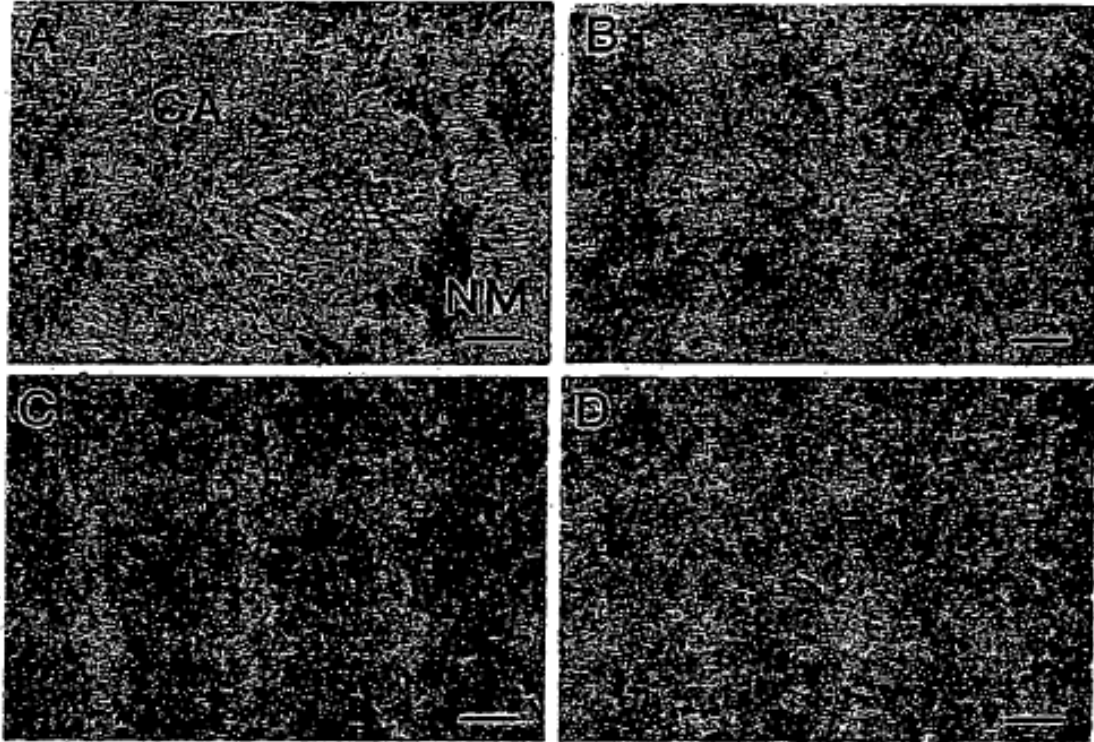


Fig. 3

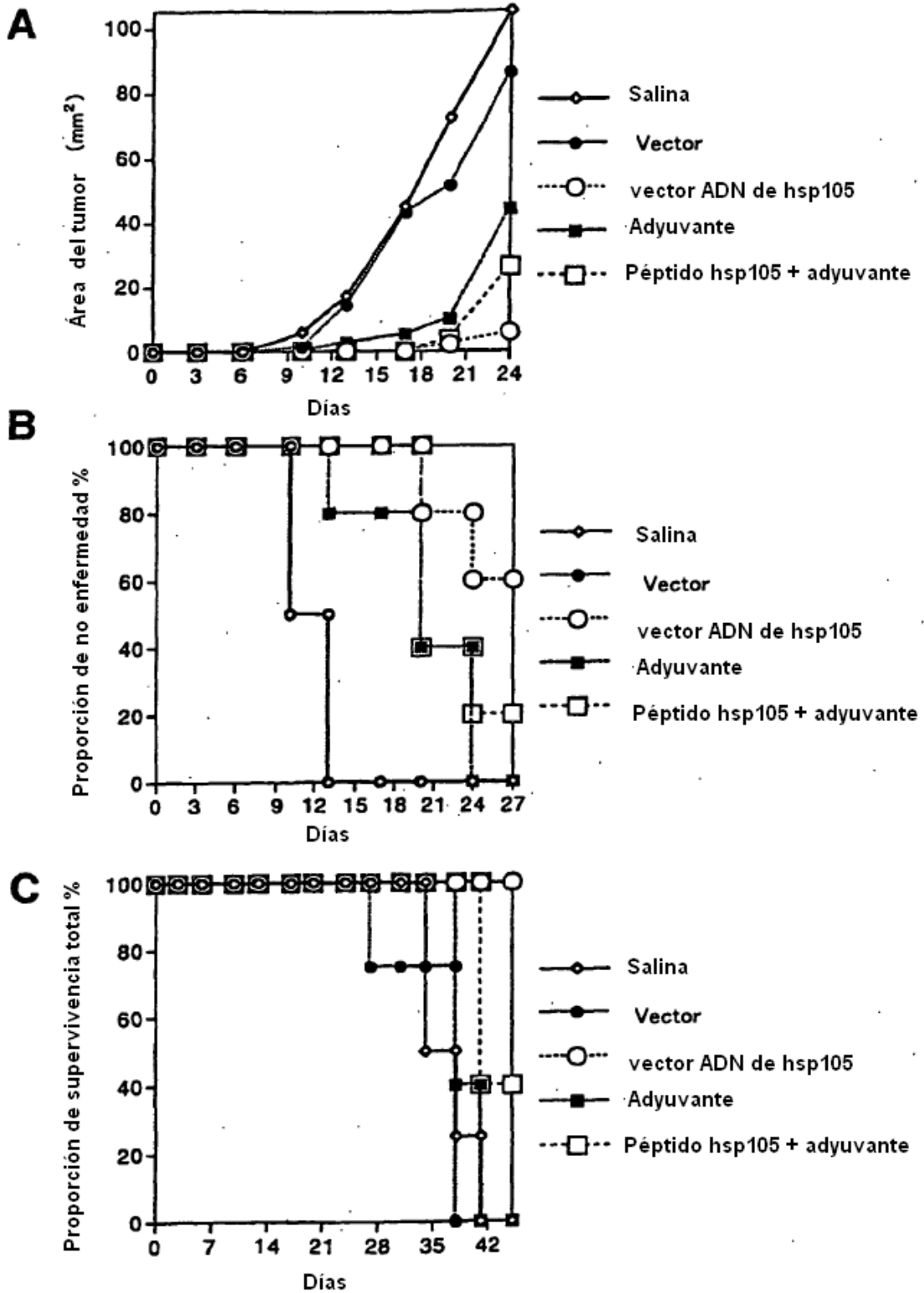




Fig. 4

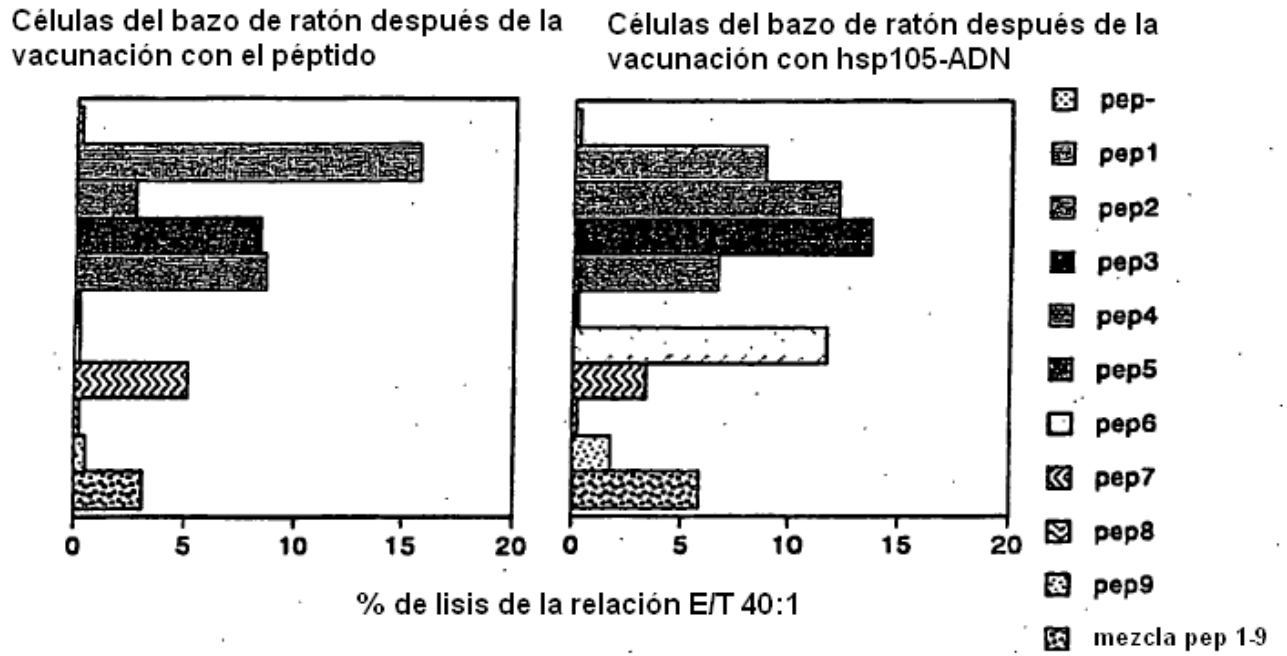


Fig. 5

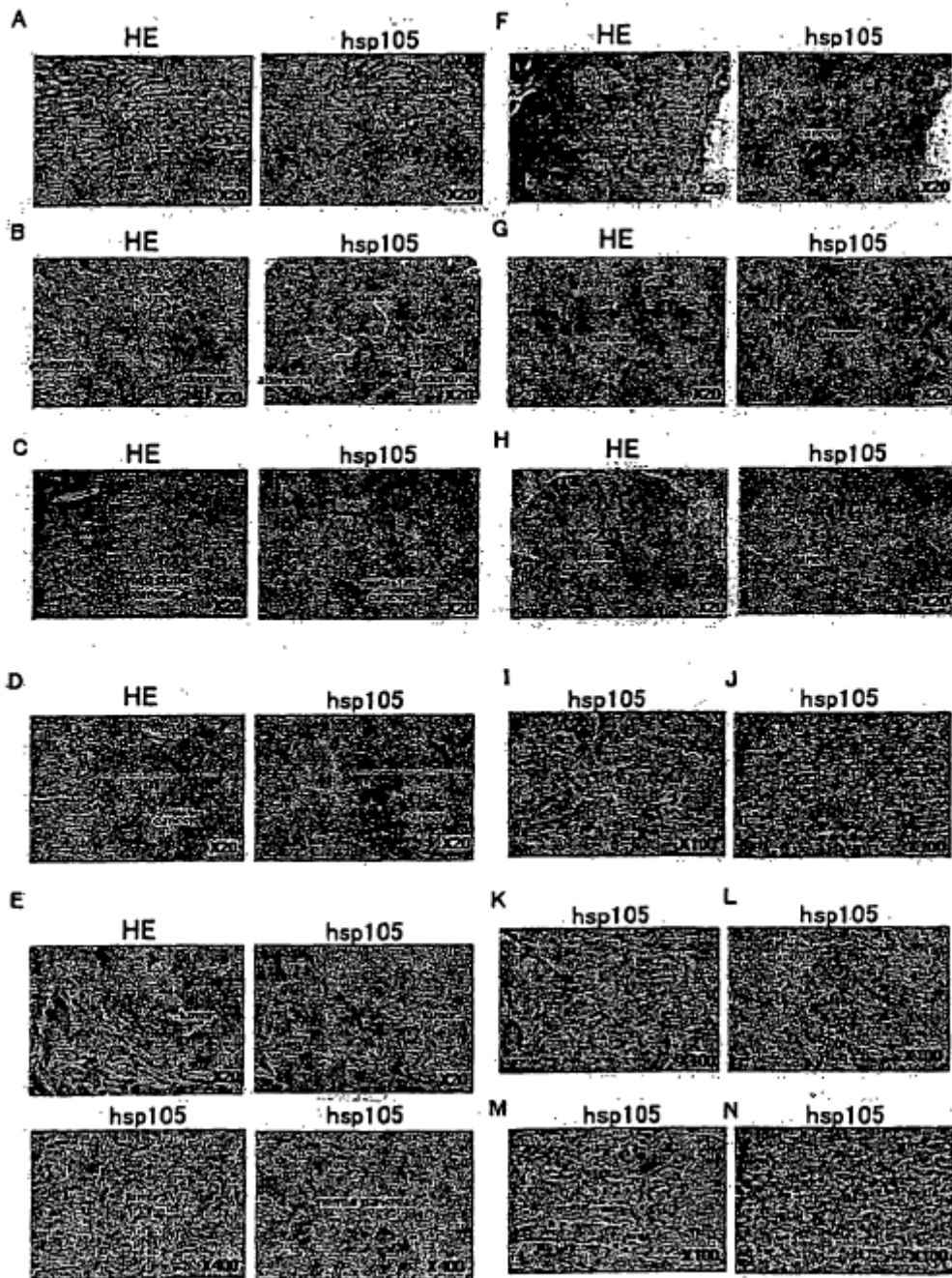


Fig. 6

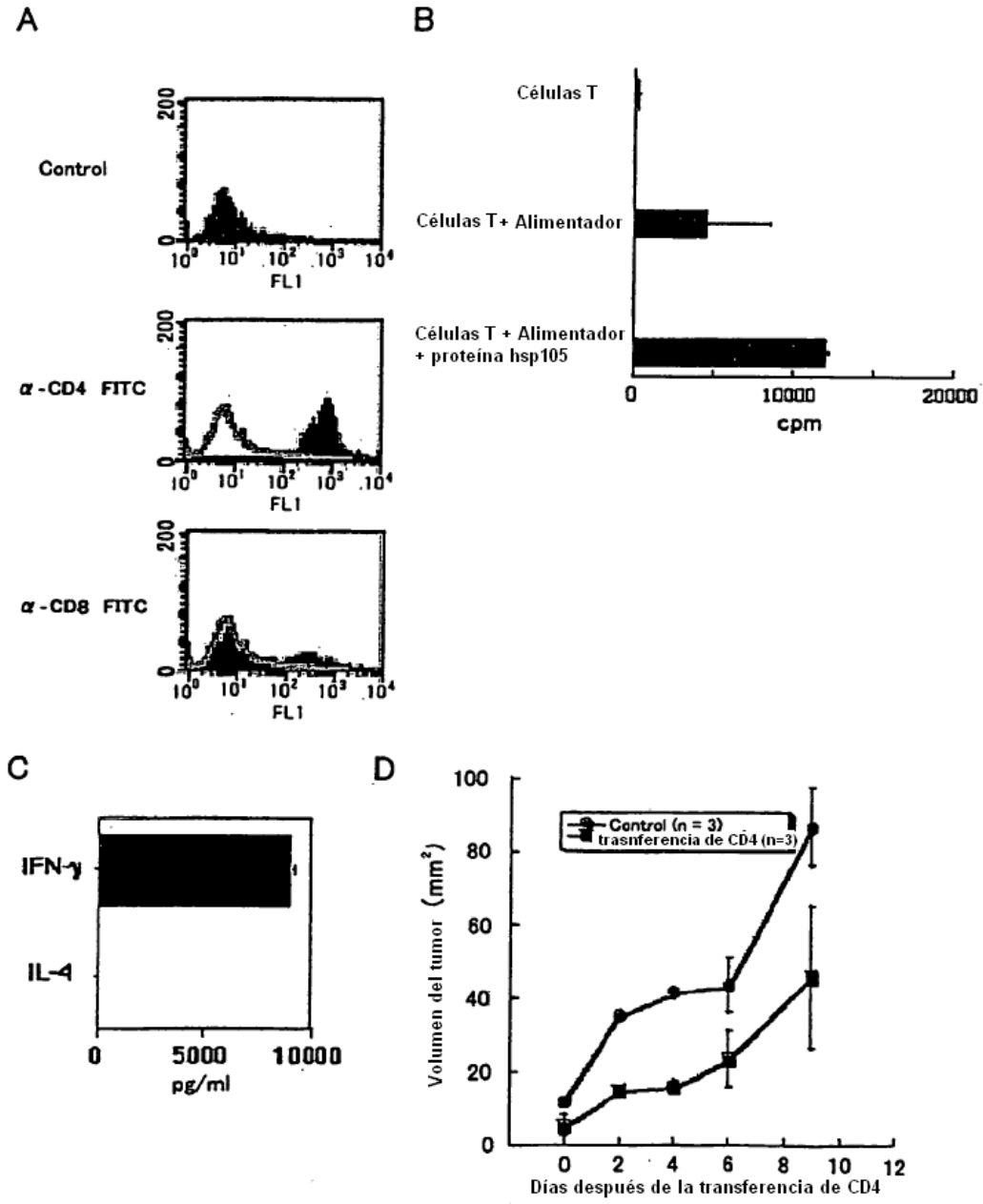


Fig. 7

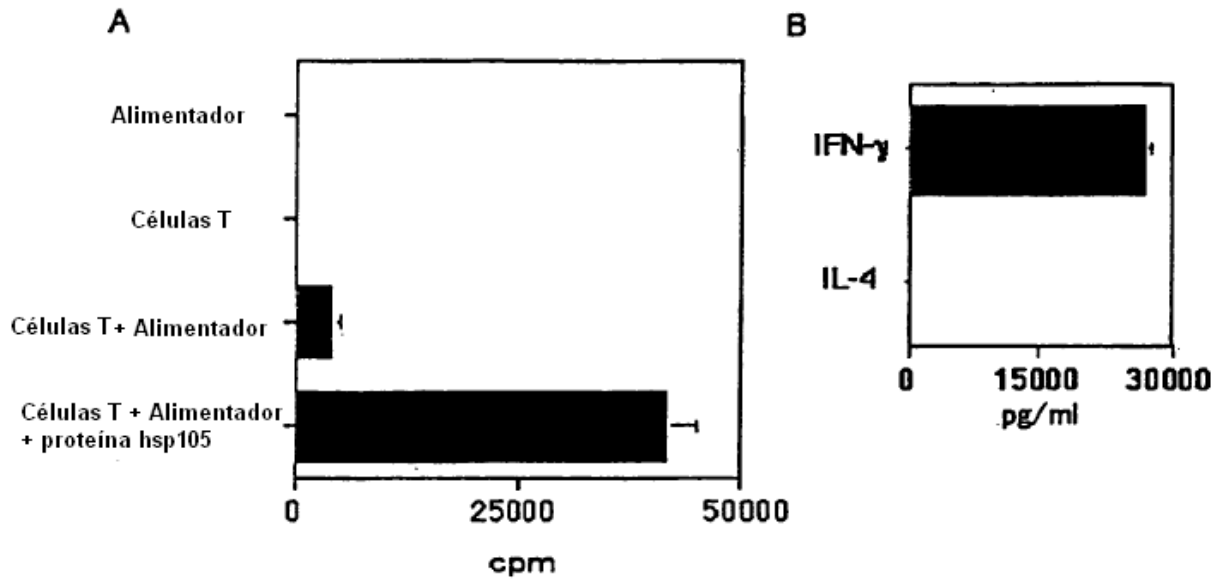
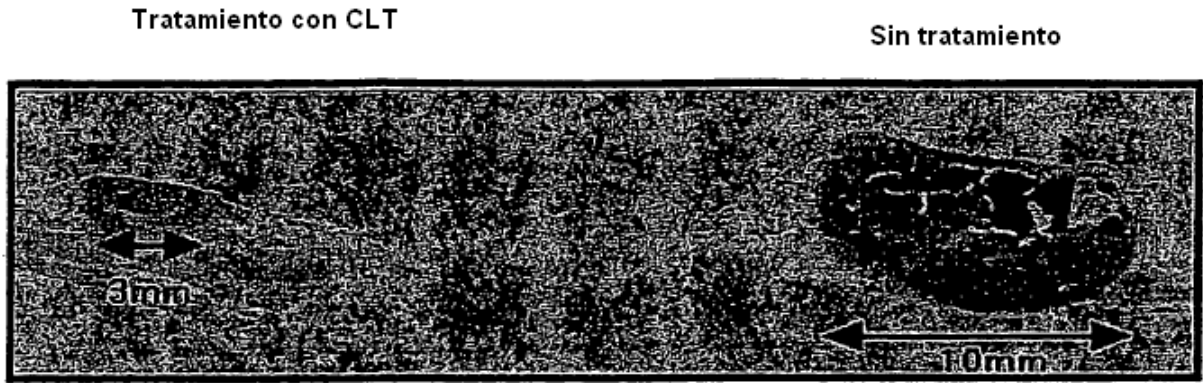


Fig. 8



5 Fig. 9

