

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 323**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C12N 5/0784** (2010.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008 E 08777198 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2186889**

54 Título: **Péptido CDCA1 y agente farmacéutico que lo comprende**

30 Prioridad:

**20.08.2007 JP 2007214000**

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

**05.06.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NISHIMURA, YASUHARU;  
HARAO, MICHIKO;  
TSUNODA, TAKUYA y  
NAKAMURA, YUSUKE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 537 323 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 CDCA1 y agente farmacéutico que lo comprende

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos que son eficaces como vacunas frente a cánceres que expresan altamente el péptido asociado al ciclo de división celular 1 (CDCA1), tales como cáncer de pulmón y carcinoma colangiocelular, y a fármacos que incluyen estos péptidos para el tratamiento y prevención de tumores.

Técnica antecedente

10 En años recientes, el número de pacientes con cáncer de pulmón continúa aumentando alrededor del mundo, y aproximadamente un millón de personas mueren actualmente de cáncer de pulmón a nivel mundial cada año. También en Japón, las muertes por cáncer de pulmón están aumentando, y se estima que alcanzarán 123.000 en 2015. El cáncer de pulmón es más prevalente entre hombres, y la relación hombre-mujer es tres a uno. El cáncer de pulmón sobrepasó al cáncer de estómago en 1993 como la causa principal de muerte por cáncer entre los hombres. Además, con un número cada vez mayor de fumadoras, se espera que el número de pacientes femeninos aumente. El cáncer de pulmón ha sido la causa principal de muerte por cáncer desde 2000, y al envejecer la sociedad, se espera que el número de pacientes aumente todavía más en el futuro. Se considera que el tabaquismo es la causa más importante de desarrollo de cáncer de pulmón, y otras causas son la inhalación de asbesto, contaminación del aire, etc. La detección temprana y el tratamiento rápido son importantes para la terapia de cáncer de pulmón. Sin embargo, se ha señalado recientemente que una simple radiografía de tórax y un ensayo de esputo realizados durante un examen médico no son eficaces para la detección temprana de cáncer de pulmón, y no conducen a la reducción de muertes por cáncer. Puesto que se espera que el número de muertes por cáncer de pulmón continúe aumentando en el futuro, es una tarea urgente desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

25 En Japón, el número de muertes por cáncer de las vías biliares está en aumento, y en 2005, 16.586 personas murieron de cáncer de las vías biliares. En la mayoría de los casos de cáncer de vías biliares, no se encontraron síntomas subjetivos en las etapas tempranas. En comparación con cánceres que se forman en la luz del tubo digestivo, tales como cáncer de estómago y cáncer de colon, el cáncer de vías biliares es difícil de encontrar y diagnosticar en etapas tempranas. Por lo tanto, en muchos casos, el cáncer ya ha progresado y no se puede eliminar cuando se encuentra. Además de la terapia quirúrgica, para el cáncer de vías biliares se llevan a cabo la terapia de radiación y la quimioterapia, pero no son terapéuticamente eficaces, y es necesario establecer un nuevo método terapéutico.

30 Por otro lado, el desarrollo reciente en biología molecular e inmunología tumoral ha esclarecido que los linfocitos T citotóxicos (asesinos) y los linfocitos T colaboradores reconocen péptidos generados por la degradación de proteínas que se expresan específica y altamente en células cancerosas, y que se presentan sobre la superficie de células cancerosas o células presentadoras de antígenos vía moléculas de HLA y provocan inmunorreacción para destruir células cancerosas. Además, se han identificado muchas proteínas de antígenos tumorales y péptidos derivados de ellas, que estimulan tal inmunorreacción para atacar el cáncer, y está siendo aplicada clínicamente la inmunoterapia tumoral específica del antígeno.

40 La molécula de HLA clase I se expresa sobre la superficie de todas las células nucleadas del cuerpo. Se une a un péptido generado por la degradación intracelular de proteínas producidas en el citoplasma o núcleo, y expresa el péptido sobre la superficie celular. Sobre la superficie de una célula normal, los péptidos derivados de proteínas autólogas normales se unen a moléculas de HLA clase I, y no son reconocidas ni destruidas por linfocitos T del sistema inmunitario. Por otro lado, en el proceso de convertirse en un cáncer, las células cancerosas expresan algunas veces una gran cantidad de proteínas que apenas se expresan, o se expresan muy poco, en células normales. Cuando las moléculas de HLA clase I se unen a péptidos generados por la degradación intracelular de proteínas expresadas específica y altamente en células cancerosas, y después expresan los péptidos sobre la superficie de células cancerosas, los linfocitos T citotóxicos (asesinos) reconocen y destruyen solamente las células cancerosas. Administrando tales antígenos o péptidos específicos del cáncer a un individuo, se pueden destruir las células cancerosas y se puede suprimir el crecimiento del cáncer sin dañar a las células normales. Esto se denomina inmunoterapia del cáncer, que usa antígenos específicos del cáncer. Las moléculas de HLA clase II se expresan principalmente sobre la superficie de células presentadoras de antígeno. Las moléculas se unen a péptidos derivados de antígenos específicos del cáncer, que se generan por la degradación intracelular de antígenos específicos del cáncer incorporados en células presentadoras de antígeno desde el exterior de las células, y entonces expresa los péptidos sobre la superficie de las células. Los linfocitos T cooperadores que los reconocen se activan e inducen o potencian inmunorreacción frente a tumores al producir diversas citocinas que activan otras células inmunocompetentes.

55 En consecuencia, si se desarrolla una inmunoterapia dirigida a antígenos expresados específica y altamente en cánceres, tal terapia puede eliminar de forma eficaz los cánceres solo sin provocar ningún suceso dañino sobre órganos autólogos normales. También se espera que la terapia se pueda usar para cualesquiera pacientes con cáncer terminal a los que no se pueden aplicar otros tratamientos. Además, administrando con antelación un

antígeno y péptido específico del cáncer como vacuna a individuos con un riesgo elevado de desarrollar cánceres, se puede prevenir el desarrollo del cáncer.

Aunque existen diversos métodos terapéuticos para el cáncer de pulmón, el cáncer de pulmón da como resultado un mal diagnóstico en comparación con otros cánceres, y es uno de los cánceres intratables. La razón es, por ejemplo, la progresión rápida, y en muchos casos, se encuentra que el cáncer ha avanzado con el tiempo. Además, puesto que la cirugía es muy invasiva, los pacientes a los que es aplicable la cirugía son limitados, y es difícil la cura total mediante terapia de radiación o quimioterapia. Si se desarrolla una inmunoterapia dirigida a antígenos que se expresan específica y altamente en cáncer de pulmón, el cáncer solo se puede eliminar eficazmente mediante tal método de terapia sin ningún daño en los órganos autólogos normales. Además, se espera que tal método terapéutico sea aplicable a cualquier paciente con cáncer terminal, y a pacientes a los que no son aplicables otros tratamientos debido a una función pulmonar extremadamente pobre. Además, puesto que el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón es elevado entre fumadores, la inmunoterapia puede ser aplicable para la prevención de cáncer de pulmón en un grupo de alto riesgo de cáncer de pulmón.

Mediante análisis de expresión génica a lo largo de todo el genoma usando micromatrices de ADNc, se ha examinado el perfil de expresión de 27.648 genes humanos en 37 casos clínicos de cáncer de pulmón no microcítico y en órganos embrionarios, y diversos órganos adultos normales. Como resultado, se ha encontrado que el péptido CDCA1 (asociado al ciclo de división celular 1, también conocido como homólogos humanos de Nuf2 (hNuf2)) (nº de acceso de GenBank NM\_145697) estaba altamente expresado en muchos casos de cáncer de pulmón, mientras que apenas se expresaba en el hígado embrionario u órganos adultos normales excepto en el testículo aislado del sistema inmunitario. Además, CDCA1 estaba altamente expresado en todos los casos de carcinoma colangiocelular, cáncer de vejiga, y carcinoma de células renales. También se observó expresión elevada de CDCA1 en los tejidos cancerosos de 40% o más casos de cáncer de próstata, leucemia mielógena crónica, linfoma maligno, cáncer de cuello uterino, osteosarcoma, cáncer de mama, sarcoma de tejidos blandos, y cáncer de colon. Este hecho sugiere que CDCA1 podría servir como un antígeno específico del cáncer en muchos carcinomas.

HLA-A2 se observa frecuentemente en poblaciones humanas independientemente de la raza, y se encuentra en alrededor de 30% de los japoneses. Por lo tanto, si se pudiese identificar un péptido antigénico del cáncer que se presenta a linfocitos T citotóxicos (asesinos) por HLA-A2, se podría aplicar ampliamente no solo a los japoneses sino también a los caucásicos y demás. En consecuencia, es una tarea importante identificar péptidos antigénicos del cáncer que se presenten a linfocitos T asesinos mediante HLA-A2. Sería muy beneficioso si tales péptidos antigénicos del cáncer son aplicables a inmunoterapia para el cáncer de pulmón, que tiene elevada morbimortalidad en todo el mundo.

A continuación se muestran documentos de la técnica anterior relacionados con la presente invención.

[Documento 1 no de patente] DeLuca J.G, Moree, B., Hickey, J.M., Kilmartin, J.V., y Salmon, E.D., hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells J. Cell Biol. 159: 549-555, 2002.

[Documento 2 no de patente] DeLuca, J.G, Dong, Y., Hergert, P, Strauss, J., Hickey, J.M., Salmon, E.D., McEwen, B.F., Hec1 and Nuf2 Are Core Components of the Kinetochore Outer Plate Essential for Organizing Microtubule Attachment Sites., Mol. Biol. Cell 16: 519-531, 2005.

[Documento 3 no de patente] Hayama, S., Daigo, Y., Kato, T., Ishikawa, N., Yamabuki, T., Miyamoto, M., Ito, T., Tsuchiya, E., Kondo, S., y Nakamura, Y., Activation of CDCA1-KNTC2, Members of Centromere Protein Complex, Involved in Pulmonary Carcinogenesis., Cancer Res. 66: 10339-10348, 2006.

[Documento 4 no de patente] Liu, S.T., Rattner, J.B., Jablonski, S.A., y Yen, T.J., Mapping the assembly pathways that specify formation of the trilaminar kinetochore plates in human cells., J.Cell Biol. 175: 41-53, 2006.

[Documento 5 no de patente] DeLuca, J.G., Howell, B.J., Canman, J.C., Hickey, J.M., Fang, G., y Salmon, E.D., et al. Nuf2 and Hec1 Are Required for Retention of the Checkpoint Proteins Mad1 and Mad2 to Kinetochores., Current Biology 13: 2103-2109, 2003.

[Documento 6 no de patente] Liu, D., Ding, D., Du, J., Cai, Xin., Huang, Y., Ward, T., Shaw, A., Yang, Y., Hu, R., Jin, C., y Yao, X., Human NUF2 Interacts with Centromere-associated Protein E and Is Essential for a Stable Spindle Microtubule-Kinetochore Attachment. J.Biol.Chem.282: 21415-21424,2007.

La Solicitud de Patente U.S. número US 2006/0088527 describe centenares de secuencias de moléculas de ADNc que están identificadas como sobreexpresadas en cáncer de pulmón; una de los varios centenares de secuencias descritas se refiere a CDCA1.

Descripción de la invención

[Problemas a resolver por la invención]

Un objetivo a lograr por la presente invención es desarrollar medios para implementar la inmunoterapia que suprime el crecimiento del cáncer al potenciar la inmunidad de pacientes con cáncer frente al cáncer, como un método terapéutico para cánceres metastásicos o intratables que son difíciles de tratar mediante terapia quirúrgica, quimioterapia, y radioterapia para tratar cáncer de pulmón, cáncer de vías biliares, etc. Se han identificado péptidos que derivan de proteínas expresadas específica y altamente en cáncer, y que se presentan a linfocitos T asesinos mediante HLA-A2, permitiendo de ese modo que la inmunoterapia sea aplicable a alrededor de 30% de pacientes japoneses con diversos cánceres que expresan altamente CDCA1.

[Medios para resolver los problemas]

La invención se refiere a las realizaciones como se definen en las reivindicaciones.

10 La invención se refiere a un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en:

(A) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2;

(B) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados, y/o añadidos, y en el que el péptido muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos); y

15 (C) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2.

Se ha identificado el gen de CDCA1 (nº de acceso de GenBank NM\_145697), que está altamente expresado en cáncer de pulmón, a partir de análisis de micromatrices de ADNc para tejidos de cáncer de pulmón. La expresión de CDCA1 en tejidos normales se observa solamente en el testículo aislado del sistema inmunitario. A fin de examinar si la actividad antitumoral es inducida o no por linfocitos T asesinos específicos de CDCA1, se usaron ratones transgénicos para HLA-A2 que expresan HLA-A2 que se encuentran en aproximadamente 30% de los japoneses. Específicamente, aquí, se examinó si se inducen o no linfocitos T asesinos específicos del péptido restringidos a HLA-A2 cuando se inmunizan ratones transgénicos para HLA-A2 con células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón pulsadas con péptidos CDCA1 humanos que tienen un motivo de unión a HLA-A2. Se examinó si se inducen o no linfocitos T asesinos específicos del péptido CDCA1 en las células de bazo de ratones inmunizados usando ensayo ELISPOT para detectar  $\gamma$ -interferón (IFN- $\gamma$ ) producido por linfocitos T asesinos activados por reconocer péptidos presentados por HLA-A2. Como resultado, se identificaron dos tipos de nuevos péptidos CDCA1 que se pueden aplicar a inmunoterapia dirigida a pacientes con cáncer positivo para HLA-A2. Además, se confirmó que los CTLs derivados de pacientes con cáncer y derivados de donantes sanos activados por estos péptidos muestran actividad citolítica frente a células que expresan CDCA1. Esto es, se espera que los péptidos sean reconocidos por linfocitos T asesinos humanos restringidos a HLA-A2 y que sean aplicables a inmunoterapia del cáncer para pacientes con cáncer positivo para HLA-A2.

Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en:

(A) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2;

35 (B) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados, y/o añadidos, y en el que el péptido muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos); y

(C) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2.

[2] el péptido de [1], en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en:

40 (A) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2; y

(B) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados, y/o añadidos, y en el que el péptido muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos);

[3] el péptido de [1] o [2], en el que el segundo aminoácido del término N es leucina o metionina;

45 [4] el péptido de uno cualquiera de [1] a [3], en el que el aminoácido C-terminal es valina o leucina;

[5] una vacuna para uso en la inducción de inmunidad frente a cáncer que expresa CDCA1, que comprende uno o más péptidos de uno cualquiera de [1] a [4] como ingrediente activo;

[6] una vacuna para uso en el tratamiento y/o prevención de cáncer que expresa CDCA1, que comprende uno o más péptidos de uno cualquiera de [1] a [4] como ingrediente activo;

- [7] una vacuna para uso en la inducción de una célula presentadora de antígeno que muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos), en el que dicha vacuna comprende uno o más péptidos de uno cualquiera de [1] a [4] como ingrediente activo;
- 5 [8] una vacuna para uso en la inducción de una célula presentadora de antígeno que muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos), en el que dicha vacuna comprende uno o más polinucleótidos que codifican los péptidos de uno cualquiera de [1] a [4] como ingrediente activo;
- [9] una vacuna para uso en la inducción de un linfocito T citotóxico (asesino), en el que dicha vacuna comprende uno o más péptidos de uno cualquiera de [1] a [4] como ingrediente activo;
- [10] un anticuerpo contra el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];
- 10 [11] un linfocito T cooperador, un linfocito T citotóxico (asesino), o una población inmunocítica que los incluye, que es inducido usando el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];
- [12] una célula que presenta antígeno que presenta un complejo que comprende el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] y un antígeno HLA;
- [13] la célula presentadora de antígeno de [12], que es inducida por la vacuna de [7] u [8];
- 15 [14] un exosoma que presenta un complejo que comprende el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] y un antígeno HLA;
- [15] el exosoma de [14], en el que el antígeno HLA es HLA-A2 (HLA-A\*0201);
- [16] un método in vitro para inducir una célula presentadora de antígeno que muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos), que comprenden la etapa de poner en contacto una célula presentadora de antígeno con el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];
- 20 [17] un método in vitro para inducir una célula presentadora de antígeno que muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos), que comprende la etapa de introducir un polinucleótido que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] en una célula presentadora de antígeno;
- [18] un método in vitro para inducir un linfocito T citotóxico (asesino), que comprende la etapa de cocultivar una célula presentadora de antígeno puesta en contacto con el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] y un linfocito T CD8+;
- 25 [19] uso del péptido de uno cualquiera de [1] a [4] para la fabricación de un agente para inducir inmunidad frente a cáncer que expresa CDCA1;
- [20] uso del péptido de uno cualquiera de [1] a [4] para la fabricación de un agente para tratar y/o prevenir cáncer que expresa CDCA1;
- 30 [21] el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] para uso en la inducción de inmunidad frente a cáncer que expresa CDCA1;
- [22] el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] para uso en el tratamiento y/o prevención de cáncer que expresa CDCA1;
- 35 [23] la vacuna de [5] o [6], o el uso de [19] o [20], o el péptido de [21] o [22], en el que dicho cáncer que expresa CDCA1 se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, carcinoma colangiocelular, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, leucemia mielogenous crónica, linfoma maligno, cáncer de cuello uterino, osteosarcoma, cáncer de mama, sarcoma de tejidos blandos, y cáncer de colon.

40 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1A muestra el protocolo para identificar péptidos CDCA1 reconocidos por linfocitos T asesinos restringidos a HLA-A2. El día en el que las células del bazo se recogen de ratones inmunizados se denomina "Día 0". La Fig. 1B muestra los resultados del ensayo ELISPOT. Se usó el ensayo ELISPOT para examinar si los linfocitos T asesinos obtenidos de ratones inmunizados responden específicamente o no a células pulsadas con el péptido CDCA1 y producen IFN- $\gamma$ . Como resultado, los linfocitos T asesinos inducidos con el péptido CDCA1-1 o CDCA1-4 reconocieron específicamente células T2A2 pulsadas con el péptido CDCA1 y produjeron IFN- $\gamma$ . Sin embargo, no se observó ninguna respuesta inmunitaria de linfocitos T asesinos específicos de CDCA1 en linfocitos T asesinos inducidos con otros péptidos. Por lo tanto, se determinó que los péptidos CDCA1-1 y CDCA1-4 son péptidos epitópicos capaces de inducir linfocitos T asesinos restringidos a HLA-A2 específicos de CDCA1. Los números del péptido CDCA1 mostrados en la Fig. 1B corresponden a los números de los péptidos mostrados bajo "POSICIÓN DEL PÉPTIDO" de la Tabla 1, pero

no a los números de ID de secuencias descritos aquí.

La Fig. 2 muestra el resultado del ensayo ELISPOT para detectar IFN- $\gamma$  producido por linfocitos T asesinos activados como resultado del reconocimiento específico de péptidos CDCA1. La Fig. 2A muestra el resultado de la inducción de linfocitos T asesinos mediante estimulación con células dendríticas pulsadas con el péptido CDCA1<sub>65-73</sub> (No. 1) (SEC ID NO: 1) derivadas de la médula ósea de ratones transgénicos para HLA-A2. Cuando se usaron células T2A2 pulsadas con el péptido CDCA1 como células estimuladoras, el recuento de puntos y el área total de puntos fueron significativamente mayores que aquellos cuando se usaron como células estimuladoras células T2A2 no pulsadas con CDCA1 positivas para HLA-A2. De este modo, se determinó que el péptido CDCA1-1 es un péptido epitópico capaz de inducir linfocitos T asesinos restringidos a HLA-A2. La Fig. 2B muestra el resultado de la inducción de linfocitos T asesinos mediante estimulación con células dendríticas pulsadas con el péptido CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4) (SEC ID NO: 2) derivadas de la médula ósea de ratones transgénicos para HLA-A2. Cuando se usaron células T2A2 pulsadas con el péptido CDCA1 como células estimuladoras, el recuento de puntos y el área total de puntos fueron significativamente mayores que aquellos cuando se usaron como células estimuladoras células T2A2 no pulsadas con CDCA1 positivas para HLA-A2. De este modo, se determinó que el péptido CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4) es un péptido epitópico capaz de inducir linfocitos T asesinos restringidos a HLA-A2.

La Fig. 3 muestra la respuesta inmunitaria específica de CDCA1 de CTLs inducidos de un donante sano. La Fig. 3A muestra el protocolo para la inducción de CTLs específicos de CDCA1 procedentes de PBMCs. Se aislaron PBMCs de un donante sano, y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y las células CD14<sup>+</sup> se separaron usando microperlas. Entonces, se produjeron CTLs CD8<sup>+</sup> reactivos frente al péptido, y se produjeron DCs a partir de células positivas para CD14 cultivando durante cinco días en presencia de GM-CSF e IL-4. Las DCs se cultivaron en presencia de  $\beta$ 2 microglobulina a 37°C durante cuatro horas, y se pulsaron con péptidos que se unen a HLA-A2. Las DCs pulsadas con el péptido se irradiaron entonces y se mezclaron con linfocitos T CD8 positivos autólogos, a una relación 1:20. Las células se cultivaron en AIM-V que contiene 2% de autoserum suplementado con IL-7. Después de tres días, se añadió IL-2 al medio de cultivo. En los días 12 y 19 los linfocitos T se volvieron a estimular con DCs autólogas pulsadas con el péptido. Las DCs se prepararon según se usaron. Se llevó a cabo el ensayo ELISPOT de IFN- $\gamma$  y el ensayo de liberación de Cr cinco y seis días después de la tercera estimulación con el péptido. Las Figs. 3B y C muestran los resultados del ensayo ELISPOT realizado después de cocultivar células diana con CTLs inducidos a partir de un donante usando el péptido CDCA1<sub>65-73</sub> (No. 1) y el péptido CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4), respectivamente. La producción de IFN- $\gamma$  frente a células T2 pulsadas con el péptido fue significativamente mayor que aquella frente a células T2 no pulsadas con el péptido. La Fig. 3D muestra la citotoxicidad de CTLs inducidos a partir de PBMCs de paciente donante 1 con cáncer y donante 1 sano frente a células T2 pulsadas con el péptido CDCA1. La Fig. 3E muestra la respuesta dependiente de la dosis de CTLs derivados del donante 1 sano inducidos por el péptido CDCA1<sub>351-359</sub>. Los CTLs produjeron una gran cantidad de IFN- $\gamma$  en respuesta a células T2 pulsadas con el péptido a 0,2  $\mu$ g/ml o más a una relación E/T de 5.

La Fig. 4 muestra la actividad citotóxica específica de CTLs inducidos a partir de un donante sano frente a células cancerosas positivas para CDCA1. La Fig. 4A muestra la expresión en células COLO201 cuando se introdujo un vector de expresión génica de CDCA1 en las células. Se usó un lentivirus, en el que se indujo la expresión de CDCA1-HA bajo el promotor EF-1 $\alpha$  y el promotor CMV, para infectar la estirpe celular cancerosa (COLO201), que expresa HLA-A2 pero no CDCA1, tres veces. El lisado celular se sometió a análisis de transferencia Western usando un anticuerpo anti-HA (centro) o anticuerpo anti-CDCA1 (parte superior). Las Figs. 4B, C, y D muestran la producción de IFN- $\gamma$  frente a COLO201/CDCA1. La producción de IFN- $\gamma$  fue significativamente mayor para una estirpe celular cancerosa COLO201 transformada que para COLO201 sin transformar. Además, la producción de IFN- $\gamma$  frente a PANC1 que expresa endógenamente tanto CDCA1 como HLA-A2 fue significativamente mayor que aquella frente a A549 que no expresa ni CDCA1 ni HLA-A2. Las Figs. 4E y F muestran los resultados de la liberación de <sup>51</sup>Cr cuando se cocultivaron CTLs inducidos del donante y células diana. Se observó citotoxicidad para PANC1 (CDCA1+, HLA-A2+), pero no para A549 (CDCA1+, HLA-A2-) ni COLO201 (CDCA1-, HLA-A2+). La Fig. 4G muestra la correlación entre los CTLs reactivos frente al péptido CDCA1 y los CTLs positivos para el tetrámero HLA-A2-CDCA1, entre células CD8 positivas. El diagrama de la izquierda muestra el ensayo ELISPOT que usa células T2 pulsadas con el péptido como células diana, y la relación E/T fue 5. El diagrama de la derecha muestra el resultado del análisis de FACS. Las células analizadas en el diagrama de la izquierda son CTLs derivados del donante 1 sano sometidos a una estimulación de tres veces de PBMC con DCs pulsadas con el péptido. Las células analizadas en el diagrama de la derecha con células CD8 positivas sin tratamiento previo separadas a partir de PBMCs de donante 1 sano.

[Modo para llevar a cabo la invención]

Excepto que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por alguien de pericia normal en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Los péptidos de la presente invención son epítomos restringidos a HLA-A2, que es un alelo de HLA encontrado frecuentemente en las poblaciones japonesa y caucásica. Específicamente, usando como índice la afinidad de unión a HLA-A2, se seleccionaron péptidos candidatos que se unen a HLA-A2 derivados de CDCA1. Para los péptidos seleccionados, se evaluó si se indujeron o no linfocitos T asesinos en el cuerpo de ratones transgénicos para HLA-A2 mediante células dendríticas derivadas de células de médula ósea de ratón transgénico para HLA-A2 (BM-DCs) pulsadas con los péptidos seleccionados. Se indujeron *in vivo* linfocitos T citotóxicos (asesinos) en ratones transgénicos para HLA-A2 mediante CDCA1-1 (YMMPVNSEV (SEC ID NO: 1)) y CDCA1-4 (KLATAQFKI (SEC ID NO: 2)). Los linfocitos T asesinos inducidos por estos péptidos mostraron reacción de respuesta inmunitaria a células T2A2 pulsadas con estos péptidos. Sin embargo, estos linfocitos T asesinos no mostraron reacción de respuesta inmunitaria a células T2A2 no pulsadas con el péptido. Además, los CTLs derivados de pacientes con cáncer y derivados de donantes sanos que se indujeron usando CDCA1-1 y CDCA1-4 mostraron actividad citolítica frente a estirpes celulares que expresan CDCA1.

Estos resultados demuestran que los péptidos derivados de CDCA1 son útiles como péptidos que inducen inmunorreacción frente a células que presentan CDCA1, y que los péptidos derivados de CDCA1 son péptidos epítomos restringidos a HLA-A2. Se ha mostrado que CDCA1 está muy expresado en tejidos cancerosos en la mayoría de los casos de cáncer de pulmón, carcinoma colangiocelular, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, leucemia mielogenosa crónica, linfoma maligno, cáncer de cuello uterino, osteosarcoma, cáncer de mama, sarcoma de tejidos blandos, y cáncer de colon. A partir de estos hechos, se considera que CDCA1 es útil como una diana inmunoterapéutica para diversos cánceres.

(1) Péptidos de la presente invención y agentes para inducir inmunidad frente a cáncer que contienen los péptidos

El péptido de la presente invención es uno cualquiera de (A) a (D) a continuación.

(A) un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2.

(B) Un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, en el que uno o dos aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos, y en el que el péptido muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos).

(C) El péptido de (B), en el que el segundo aminoácido del término N es leucina o metionina.

(D) El péptido de (B), en el que el aminoácido C-terminal es valina o leucina.

Aquí, "un péptido que muestra una actividad inductora de linfocitos T asesinos" significa "un péptido que tiene actividad inductora de linfocitos T que estimula linfocitos T asesinos (linfocitos T citotóxicos/CTLs)".

El péptido de la presente invención es un péptido epítomico que tiene menos de alrededor de 15 aminoácidos, y que incluye la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, y que muestra una actividad inductora de linfocitos T asesinos. Además, los péptidos de la presente invención (péptidos epítomicos) pueden incluir un péptido que incluya la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, en el que uno o dos aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados, y/o añadidos, en tanto que se retenga la capacidad para inducir linfocitos T asesinos. El número de restos sustituidos, suprimidos, insertados, y/o añadidos es un aminoácido o dos aminoácidos.

Se sabe que péptidos variantes (es decir, péptidos que incluyen secuencias de aminoácidos obtenidas modificando las secuencias de aminoácidos originales mediante sustitución, supresión, inserción, y/o adición de uno, dos, o varios restos de aminoácidos) retienen la actividad biológica original (Mark DF et al., (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:5662-6; Zoller MJ y Smith M, (1982) Nucleic Acids Res 10:6487-500; Dalbadie-McFarland G et al. (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:6409-13). La modificación de aminoácidos retiene preferiblemente las propiedades de las cadenas laterales de aminoácidos originales. Los ejemplos de las propiedades de cadenas laterales de aminoácidos incluyen: aminoácido hidrófobo (A, I, L, M, F, P, W, Y, V); aminoácido hidrófilo (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T); y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o propiedades en común: cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L, I, P); cadenas laterales que contienen grupos hidroxilo (S, T, Y); cadenas laterales que contienen átomos de azufre (C, M); cadenas laterales que contienen ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); cadenas laterales que contienen bases (R, K, H); y cadenas laterales que contienen anillos aromáticos (H, F, Y, W). Los caracteres en los paréntesis muestran códigos de aminoácidos un carácter.

En una realización preferida, los péptidos de la presente invención (péptidos inmunógenos) son nonapéptidos (9-mero) o decapeptidos (10-mero).

A fin de obtener péptidos con afinidad de unión elevada y actividad inductora de linfocitos T asesinos, la secuencia de aminoácidos de un péptido parcial de CDCA1 de origen natural se puede modificar mediante sustitución, supresión, inserción, y/o adición de uno, dos, o varios aminoácidos. Aquí, el término "varios" se refiere a cinco o menos, preferiblemente tres o menos, más preferiblemente dos o menos. Además, puesto que la regularidad de las secuencias peptídicas que tienen afinidad elevada por antígenos HLA es conocida (Kubo RT, et al., (1994) J. Immunol., 152, 3913-24; Rammensee HG, et al., (1995) Immunogenetics. 41:178-228; Kondo A, et al. (1995) J. Immunol. 155:4307-12), los péptidos de la presente invención (péptidos epítomicos) se pueden modificar en base a la

regularidad a fin de potenciar su afinidad por antígenos HLA. Por ejemplo, los péptidos con una elevada afinidad de unión a HLA-A2 se pueden obtener sustituyendo el segundo aminoácido del término N por leucina o metionina. De forma similar, los péptidos con afinidad de unión a HLA-A2 elevada también se pueden obtener sustituyendo el aminoácido C-terminal por valina o leucina.

5 Cuando la secuencia de un péptido epitópico es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, se pueden provocar efectos secundarios tales como trastornos autoinmunitarios o síntomas de alergia frente a una sustancia específica. A fin de evitar tales efectos secundarios, un péptido epitópico modificado no debería ser idéntico a las secuencias de aminoácidos de proteínas conocidas. Para este fin, es necesario llevar a cabo una búsqueda de homología usando bases de datos disponibles  
10 para confirmar que no hay ninguna proteína endógena o exógena con una función diferente que muestre 100% de homología con el péptido epitópico modificado. Mediante este procedimiento, se pueden evitar riesgos provocados por la modificación de las secuencias de aminoácidos para incrementar la afinidad de unión a antígenos HLA y/o para incrementar la actividad inductora de linfocitos T asesinos.

15 Aunque se espera que los péptidos mencionados anteriormente que tienen afinidad de unión elevada por antígenos HLA sean muy eficaces como vacunas contra el cáncer, es necesario examinar si los péptidos candidatos seleccionados usando como índice la afinidad de unión elevada tienen realmente actividad inductora de linfocitos T asesinos. La actividad inductora de linfocitos T asesinos se puede confirmar: induciendo células presentadoras de antígeno que tienen el antígeno del MHC humano (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos, y células dendríticas), más específicamente, induciendo células dendríticas derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana; estimulándolas con un péptido de interés; mezclándolas entonces con células CD8 positivas; y midiendo la actividad citotóxica frente a las células diana. Como sistema de reacción, se pueden usar animales transgénicos que expresan el antígeno HLA humano (como se describe en, por ejemplo, BenMohamed L, et al. (2000) Hum. Immunol. 61(8):764-79, Related Articles, Books, and Linkout). Por ejemplo, para medir la actividad citotóxica, las células diana se marcan radiactivamente con <sup>51</sup>Cr o similar. La actividad citotóxica en las células diana se puede examinar  
20 midiendo el IFN- $\gamma$  producido y liberado por linfocitos T asesinos en presencia de las células presentadoras de antígeno que tienen un péptido inmovilizado; y visualizando la zona de producción de IFN- $\gamma$  en el medio de cultivo usando un anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ .

25 Como se muestra en los Ejemplos, el resultado de examinar la actividad inductora de linfocitos T asesinos de péptidos mostró que los péptidos que tienen afinidad de unión elevada por el antígeno HLA no tienen necesariamente actividad inductora de linfocitos T asesinos elevada. Sin embargo, los péptidos que contienen las secuencias de aminoácidos de CDCA1-1 (YMMPVNSEV (SEC ID NO: 1)) y CDCA1-4 (KLATAQFKI (SEC ID NO: 2)) mostraron actividad inductora de linfocitos T asesinos particularmente elevada.

30 Como se describe anteriormente, la presente invención proporciona péptidos que muestran actividad inductora de linfocitos T asesinos, más específicamente, péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, y sus variantes (es decir, secuencias de aminoácidos en las que uno o dos aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos). Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de los péptidos que incluyen los nueve aminoácidos de SEC ID NO: 2, o sus variantes, no son idénticas a las de otras proteínas endógenas. Especialmente, los péptidos con afinidad de unión a HLA-A2 elevada se pueden obtener sustituyendo el segundo aminoácido del término N por leucina o metionina, y/o sustituyendo el aminoácido C terminal por valina o leucina.

35 Los péptidos de la presente invención pueden incluir modificaciones tales como glicosilación, oxidación de la cadena lateral, y fosforilación, excepto que los péptidos pierdan su actividad inductora de linfocitos T asesinos. Otras modificaciones incluyen, por ejemplo, D-aminoácidos y otros análogos de aminoácidos que se pueden usar para incrementar la semivida sérica de los péptidos.

40 Los métodos para obtener y producir los péptidos de la presente invención no están particularmente limitados. Hay disponibles péptidos sintetizados químicamente o péptidos recombinantes producidos mediante técnicas de recombinación génica.

45 Los péptidos sintetizados químicamente de la presente invención se pueden sintetizar según métodos de síntesis química, tales como el método de Fmoc (método de fluorenilmetiloxycarbonilo) y el método de t-Boc (método de t-butiloxycarbonilo). Los péptidos de la presente invención también se pueden sintetizar utilizando diversos sintetizadores de péptidos comercialmente disponibles.

50 Los péptidos de la presente invención se pueden producir como proteínas recombinantes obteniendo los ADN que tienen las secuencias nucleotídicas que codifican los péptidos, o sus variantes u homólogos, e introduciéndolos en un sistema de expresión adecuado.

55 Los vectores de expresión usados pueden ser preferiblemente cualesquiera vectores que se pueden duplicar de forma autónoma en células hospedantes, o que se pueden incorporar en el cromosoma de células hospedantes, y contienen un promotor en una posición adecuada para permitir la expresión de un gen que codifica el péptido. Los transformantes que tienen un gen que codifica el péptido de la presente invención se pueden producir introduciendo en un hospedante el vector de expresión mencionado anteriormente. El hospedante puede ser cualquiera de células

bacterianas, de levadura, de animales, y células de insectos, y el vector de expresión se puede introducir en el hospedante usando técnicas conocidas dependiendo del hospedante.

En la presente invención, los péptidos recombinantes se pueden aislar cultivando un transformante preparado como se describe anteriormente, produciendo y acumulando los péptidos en el cultivo, y recogiendo los péptidos de la presente invención a partir del cultivo.

Cuando el transformante es una procarionta tal como *E. coli* o una eucariota tal como levadura, el medio de cultivo para estos microorganismos puede ser medio natural o sintético, en tanto que contenga fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales, y de forma que se pueda utilizar por los microorganismos, y permita el cultivo eficaz del transformante. Las condiciones de cultivo pueden ser las usadas convencionalmente para cultivar los microorganismos. Después del cultivo, los péptidos de la presente invención se pueden aislar y purificar a partir del cultivo del transformante usando métodos convencionales para el aislamiento y purificación de péptidos.

Los péptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados o añadidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 se pueden producir u obtener apropiadamente por una persona experta en la técnica basándose en la información sobre la secuencia nucleotídica de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2. Específicamente, un gen que codifica un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, y que muestra actividad inductora de linfocitos T asesinos, se puede producir mediante cualesquiera métodos conocidos por las personas expertas en la técnica, tales como síntesis química, técnicas de manipulación genéticamente mediante ingeniería, y mutagénesis. Por ejemplo, el método de mutagénesis dirigida al sitio, que es una de las técnicas de ingeniería genética, es útil puesto que puede introducir una mutación específica en una posición específica. Se puede llevar a cabo según los métodos descritos en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (en lo sucesivo denominado Molecular Cloning, 2ª Ed.) y Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 1-38, John Wiley & Sons (1987-1997) (en lo sucesivo denominado Current Protocols in Molecular Biology), etc.

Los péptidos de la presente invención descritos anteriormente pueden inducir inmunidad frente a cáncer, como se muestra más abajo en los Ejemplos. Por lo tanto, la presente invención proporciona agentes para inducir inmunidad frente a cáncer, que incluyen los péptidos de la presente invención.

Los agentes de la presente invención inductores de inmunidad se pueden preparar como una formulación mixta combinada con dos o más péptidos epitópicos. Los agentes inductores de inmunidad formulados combinando múltiples tipos de péptidos pueden ser un cóctel, o se pueden unir mutuamente usando técnicas estándar. Los péptidos epitópicos a combinar pueden ser péptidos que tienen diferentes secuencias de aminoácidos derivadas del mismo gen, o pueden ser péptidos que tienen secuencias de aminoácidos derivadas de genes diferentes. Cuando se administran los péptidos de la presente invención, los péptidos administrados se presentan en antígenos HLA de células presentadoras de antígeno a una densidad elevada, y subsiguientemente se inducen linfocitos T asesinos que reaccionan específicamente frente a los complejos formados con los péptidos administrados y los antígenos HLA. Como alternativa, poniendo en contacto células dendríticas recogidas de un sujeto con los péptidos de la presente invención (es decir, pulsando células dendríticas recogidas de un sujeto con los péptidos de la presente invención), se pueden obtener células presentadoras de antígeno que presentan los péptidos de la presente invención sobre su superficie celular. Administrando estas células presentadoras de antígeno nuevamente al sujeto, se pueden inducir en el cuerpo del sujeto linfocitos T asesinos, y como resultado, se puede potenciar la respuesta inmunitaria a células diana que presentan los péptidos de la presente invención.

Cuando se usan *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente *in vitro*, los agentes para inducir inmunidad frente al cáncer de la presente invención pueden inducir linfocitos T cooperadores, linfocitos T asesinos, o poblaciones inmunocíticas que incluyen estas células, proporcionando de ese modo inmunidad frente al cáncer.

(2) Agentes para el tratamiento y/o prevención de cáncer de la presente invención (vacunas contra el cáncer)

Se mostró en los Ejemplos que los péptidos de la presente invención pueden inducir *in vivo* linfocitos T asesinos específicos de las células cancerosas. Por otro lado, se mostró en la invención previa que CDCA1 estaba altamente expresado en la mayoría de los casos de cáncer de pulmón, carcinoma colangiocelular, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, leucemia mielogenosa crónica, linfoma maligno, cáncer de cuello uterino, osteosarcoma, cáncer de mama, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de colon, y demás. En consecuencia, se espera que los agentes inductores de inmunidad, que incluyen uno o más de los péptidos de la presente invención como ingrediente activo, sean eficaces como agentes para el tratamiento y/o prevención de cáncer. Esto es, se puede esperar inducción y activación de linfocitos T asesinos que atacan el tumor al inyectar en el cuerpo los péptidos de la presente invención junto con un adyuvante adecuado, o pulsando células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, con los péptidos, e inyectándolas entonces en el cuerpo. De este modo, como resultado, se pueden esperar efectos contra el cáncer. Además, se puede incorporar en un vector adecuado un gen que codifica un péptido de la presente invención. Las células presentadoras de antígeno humanas (células dendríticas, etc.) y las bacterias tales como BCG *Mycobacterium tuberculosis* que se transforman con el ADN

recombinante, o los virus tales como los virus de la vacuna que tienen un ADN que codifica el péptido de la presente invención incorporado en su genoma, se pueden usar de forma eficaz como vacunas vivas para el tratamiento y/o prevención de cáncer humano. Las dosis y los métodos de administración para las vacunas contra el cáncer son las mismas que aquellas para las vacunas contra la viruela y vacunas de BCG convencionales.

5 En la presente invención, el término “vacuna” (también denominado “composición inmunógena”) se refiere a una sustancia que induce inmunidad antitumoral o suprime diversos cánceres cuando se inyecta a un animal. Según la presente invención, se sugirió que el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 es un péptido epitópico restringido a HLA-A2 que puede inducir una respuesta inmunitaria fuerte y específica frente a células presentadoras de CDCA1. En consecuencia, la presente invención también incluye métodos para inducir  
10 inmunidad antitumoral usando los péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, o sus variantes que incluyen sustitución, supresión, o adición de uno, dos o varios aminoácidos. En general, la inmunidad antitumoral incluye las siguientes respuestas inmunitarias:

(1) inducción de linfocitos T asesinos frente a tumores que contienen células que expresan CDCA1,

(2) inducción de anticuerpos que reconocen tumores que contienen células que expresan CDCA1, y

15 (3) inducción de la producción de citocinas antitumorales.

Cuando un péptido particular induce una cualquiera de estas respuestas inmunitarias a través de la inoculación a un animal, se determina que el péptido tiene efecto inductor de inmunidad antitumoral. La inducción de la inmunidad antitumoral por el péptido se puede detectar observando *in vivo* o *in vitro* la respuesta del sistema inmunitario en un hospedante frente al péptido.

20 Por ejemplo, los métodos para detectar la inducción de linfocitos T asesinos son bien conocidos. Una sustancia extraña que invade un organismo vivo es presentada a linfocitos T y linfocitos B mediante la acción de células presentadoras de antígeno (APCs). Los linfocitos T que responden a antígenos presentados por células presentadoras de antígeno de una manera específica del antígeno se diferencian en linfocitos T asesinos (también denominados linfocitos T citotóxicos o CTLs) a través de la estimulación por los antígenos, y después proliferan.

25 Aquí, este proceso se denomina “activación” de linfocitos T. La inducción de linfocitos T asesinos por un péptido específico se puede evaluar presentando el péptido a linfocitos T usando células presentadoras de antígeno pulsadas con el péptido, y detectando entonces la inducción de linfocitos T asesinos. Además, las células presentadoras de antígeno tienen un efecto sobre la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, linfocitos T CD8<sup>+</sup>, macrófagos, eosinófilos, y células NK. Puesto que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> también son importantes en la inmunidad antitumoral, la acción del péptido inductora de la inmunidad antitumoral se puede evaluar usando como índice el efecto sobre la  
30 activación de estas células.

Un método para evaluar el efecto de la inducción de linfocitos T asesinos que son inducidos usando células dendríticas (DCs) como células presentadoras de antígeno es bien conocido en la técnica. Entre las células presentadoras de antígeno, las DCs tienen el efecto inductor de linfocitos T asesinos más potente. En este método,  
35 en primer lugar, un péptido de ensayo se pone en contacto con DCs, y entonces las DCs se ponen en contacto con linfocitos T. Los linfocitos T que tienen efecto citotóxico sobre células diana se detectan a partir de los linfocitos T puestos en contacto con DCs. Si los linfocitos T muestran actividad citotóxica frente a las células diana, significa que el péptido de ensayo tiene la actividad para inducir linfocitos T citotóxicos. La actividad de linfocitos T asesinos frente a células diana, tales como tumores, se puede detectar, por ejemplo, usando como índice la lisis de células tumorales marcadas con <sup>51</sup>Cr. Como alternativa, el grado de daño celular tumoral se puede evaluar usando como índice la actividad de captación de <sup>3</sup>H-timidina o la liberación de LDH (lactosa deshidrogenasa).

Los péptidos de ensayo que mediante estos métodos se confirma que tienen actividad inductora de linfocitos T asesinos son péptidos que tienen efecto activador de DCs y la subsiguiente actividad inductora de linfocitos T asesinos. Por lo tanto, los péptidos que inducen linfocitos T asesinos frente a células tumorales son útiles como  
45 vacunas frente a cánceres que presentan CDCA1. Además, las células presentadoras de antígeno que tienen adquirida la capacidad para inducir linfocitos T asesinos frente a cánceres a través del contacto con los péptidos son útiles como vacunas frente a cánceres. Además, los linfocitos T asesinos que tienen citotoxicidad adquirida como resultado de la presentación de los péptidos por células presentadoras de antígeno también se pueden usar como vacunas frente a cánceres que presentan CDCA1. Los métodos de tratamiento del cáncer usando inmunidad  
50 antitumoral por células presentadoras de antígeno y linfocitos T asesinos se denominan citoimmunoterapia.

En general, cuando se usan péptidos para citoimmunoterapia, la eficiencia de la inducción de linfocitos T asesinos se puede potenciar combinando múltiples péptidos que tienen diferentes estructuras. Por lo tanto, cuando se estimulan DCs con fragmentos proteicos, es ventajoso usar una mezcla de múltiples tipos de fragmentos peptídicos.

La inducción de la inmunidad antitumoral por péptidos se puede evaluar también observando la inducción de la  
55 producción de anticuerpos frente a los tumores. Por ejemplo, cuando se inducen anticuerpos frente a péptidos inmunizando animales de laboratorio con los péptidos, y suprimen el crecimiento, proliferación, y/o metástasis de células tumorales, se determina que los péptidos inducen inmunidad antitumoral.

La inmunidad antitumoral se puede inducir administrando una vacuna de la presente invención, y la inducción de la inmunidad antitumoral permite el tratamiento y/o prevención de cánceres. Los efectos del tratamiento del cáncer y/o prevención del desarrollo del cáncer pueden incluir la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la regresión de células cancerosas, y la supresión del desarrollo de células cancerosas. También se incluyen en los efectos del tratamiento y/o prevención del cáncer la disminución en la tasa de mortalidad de individuos con cáncer, la disminución de marcadores tumorales en la sangre, y la reducción de síntomas detectables asociados con cáncer. Los efectos terapéuticos o preventivos de una vacuna contra el cáncer se comparan preferiblemente de forma estadísticamente significativa con aquellos de un control sin la administración de la vacuna. Por ejemplo, los efectos se observan preferiblemente a un nivel de significancia de 5% o menos. Para determinar la significancia estadística, se pueden usar métodos estadísticos tales como la prueba de la t de Student, la prueba de la U de Mann-Whitney, y ANOVA.

En la presente invención, el sujeto es preferiblemente un mamífero. Los ejemplos de mamíferos incluyen seres humanos, primates no humanos, ratones, ratas, perros, gatos, caballos, y ganado, pero no se limitan a ellos.

Los péptidos de la presente invención se pueden administrar a un sujeto *in vivo* o *ex vivo*. Además, para producir una composición inmunógena para el tratamiento y/o prevención de cáncer, se pueden usar los péptidos inmunógenos de la presente invención, esto es, nonapéptidos seleccionados de las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 2, y sus péptidos mutantes.

Más específicamente, la presente invención proporciona agentes farmacéuticos para el tratamiento de tumor y/o la prevención de crecimiento tumoral, metástasis, y demás, que incluyen uno o más de los péptidos de la presente invención como ingrediente activo. Los péptidos de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de tumores tales como cáncer de pulmón, carcinoma colangiocelular, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, leucemia mielógena crónica, linfoma maligno, cáncer de cuello uterino, osteosarcoma, cáncer de mama, sarcoma de tejidos blandos, y cáncer de colon.

Los péptidos de la presente invención se pueden administrar directamente a un sujeto como agentes farmacéuticos formulados mediante métodos de formulación convencionales. Tales formulaciones pueden contener, además de los péptidos de la presente invención, vehículos, excipientes, etc., farmacéuticamente aceptables, según sea necesario. Los agentes farmacéuticos de la presente invención se pueden usar para el tratamiento y/o prevención de diversos tumores.

Además, para establecer de forma eficaz la inmunidad celular, se pueden mezclar adyuvantes en las composiciones inmunógenas para el tratamiento y/o prevención de tumores que incluyen uno o más de los péptidos de la presente invención como ingrediente activo. Los agentes se pueden coadministrar con otros ingredientes activos tales como agentes antitumorales. Las formulaciones apropiadas también incluyen gránulos. Los adyuvantes apropiados se describen en la bibliografía (Johnson AG. (1994) Clin. Microbiol. Rev., 7:277-89). Los ejemplos de adyuvantes incluyen adyuvante incompleto de Freund, BCG, dimicolato de trehalosa (TDM), lipopolisacárido (LPS), adyuvante de sulfato de aluminio y potasio, adyuvante de sílice, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, y alumbre, pero no se limitan a ellos. Además, se pueden usar convenientemente formulaciones liposomiales, formulaciones granulares en las que un fármaco está unido a perlas que tienen un diámetro de varios micrómetros, y formulaciones en las que los lípidos están enlazados a los péptidos mencionados anteriormente. Los métodos de administración pueden ser administración oral, inyección intradérmica, inyección subcutánea, inyección intravenosa, etc., y pueden incluir administración sistémica y administración local cerca del tumor diana.

La dosis de los péptidos de la presente invención se puede ajustar apropiadamente dependiendo de la enfermedad a tratar, de la edad y peso corporal del paciente, del método de administración, etc. La dosis es habitualmente 0,001 mg a 1000 mg, preferiblemente 0,01 mg a 100 mg, y más preferiblemente 0,1 mg a 10 mg. Preferiblemente, la administración se realiza una vez cada pocos días hasta cada pocos meses, pero los expertos en la técnica pueden seleccionar fácilmente la dosis y método de administración apropiados; y la selección y optimización de estos parámetros están completamente dentro del alcance de técnicas convencionales. La forma de las formulaciones no está particularmente limitada, y pueden estar liofilizadas, o granuladas añadiendo excipientes tales como azúcar.

Los agentes auxiliares que se pueden añadir a los agentes farmacéuticos de la presente invención para incrementar la actividad inductora de linfocitos T asesinos incluyen componentes bacterianos de bacterias BCG y demás, incluyendo muramil dipéptido (MDP), ISCOM descrito en Nature, vol. 344, p. 873 (1990), QS-21 de la serie de saponinas descrita en J. Immunol. vol. 148, p. 1438 (1992), liposoma, e hidróxido de aluminio. Además, también se pueden usar como agentes auxiliares los inmunoestimulantes tales como lentinano, sizofirano, y picibanilo. También se pueden usar como agentes auxiliares las citocinas y demás que potencian el crecimiento y diferenciación de linfocitos T, tales como IL-2, IL-4, IL-12, IL-1, IL-6, y TNF, así como  $\alpha$ -galactosilceramida que activa linfocitos T NK, y CpG y lipopolisacáridos (LPS) que activan el sistema inmunitario natural mediante la unión a receptores similares a Tol, y demás.

Las composiciones de vacuna de la presente invención contienen un componente que ceba a los linfocitos T asesinos. Los lípidos se han identificado como una sustancia para el cebado frente a antígenos virales *in vivo*. Por ejemplo, los restos de ácido palmítico se pueden unir al grupo  $\epsilon$ -amino y al grupo  $\alpha$ -amino de un resto de lisina, y

entonces se pueden enlazar a un péptido inmunógeno de la presente invención. Los péptidos lipidados se pueden administrar directamente incorporándolos en una micela o partícula, o encapsulándolos en un liposoma, o emulsionándolos en un adyuvante. Otro ejemplo de cebado lipídico es el cebado con una lipoproteína de *E. coli*, tal como tripalmitoil-S-gliceril-cisteinilseril-serina (P3CSS) cuando se une covalentemente a un péptido adecuado (Deres K., et al., (1989) Nature 342:561-4).

Los péptidos inmunógenos de la presente invención se pueden expresar mediante vectores víricos o vectores bacterianos. Los ejemplos de vectores de expresión apropiados incluyen hospedantes víricos avirulentos, tales como la vacuna y la viruela aviar. Por ejemplo, un virus de la vacuna se puede usar como un vector para expresar una secuencia nucleotídica que codifica el péptido. Introduciendo el virus de la vacuna recombinante en células hospedantes, se expresan los péptidos inmunógenos, provocando la respuesta inmunitaria. El método de inmunización usando vectores vacunales se describe, por ejemplo, en la patente U.S. nº 4.722.848. También se puede usar el bacilo Calmette-Guerin (BCG). Los vectores del BCG se describen en Stover CK, et al., (1991) Nature 31:456-60. En la técnica se conoce una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o la inmunización, incluyendo vectores adenovíricos y vectores de virus adenoasociados, vectores retrovíricos, vectores del bacilo tifoide (*Salmonella typhi*), y vectores de la toxina del carbunco destoxificado. Véanse, por ejemplo, Shata MT, et al., (2000) Mol. Med. Today 6:66-71; Shedlock DJ y Weiner DB., et al., (2000) J. Leukoc. Biol. 68:793-806; y Hipp JD, et al., (2000) In Vivo 14:571-85.

Los linfocitos T asesinos pueden ser inducidos eficazmente en el cuerpo de un paciente añadiendo *in vitro* un péptido antigénico a células recogidas del paciente o células procedentes de otro individuo que comparte algunos de los alelos de HLA (células alogeneicas), y que presentan el antígeno, y administrando entonces intravascularmente las células al paciente, localmente al tumor, etc. Como alternativa, tras la inducción *in vitro* de linfocitos T asesinos añadiendo el péptido a linfocitos de sangre periférica del paciente y cultivándolos *in vitro*, las células se pueden administrar intravascularmente al paciente, localmente al tumor, etc. Tal tratamiento de transferencia celular ya se ha llevado a cabo como terapia contra el cáncer, y es un método bien conocido entre aquellos expertos en la técnica.

El tipo de cánceres en la presente invención no está particularmente limitado, y los ejemplos específicos incluyen cáncer de pulmón, carcinoma colangiocelular, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, leucemia mielogenosa crónica, linfoma maligno, cáncer de cuello uterino, osteosarcoma, cáncer de mama, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de colon, etc. Los ejemplos de cánceres para los cuales es adecuada la aplicación de la presente invención incluyen cáncer de pulmón.

### (3) Anticuerpos de la presente invención

La presente invención también se refiere a anticuerpos que reconocen una porción de o todo el péptido de la presente invención mencionado anteriormente como un epítipo (antígeno), y se refiere a linfocitos T asesinos que son inducidos mediante estimulación *in vitro* usando las proteínas o péptidos. En general, los linfocitos T asesinos demuestran actividad antitumoral más potente que los anticuerpos.

Además, de forma similar a los péptidos de la presente invención, los anticuerpos de la presente invención son útiles como agentes profilácticos y/o terapéuticos frente a cánceres que expresan CDCA1, en tanto que puedan inhibir la actividad del antígeno canceroso CDCA1. En un uso práctico, los péptidos o anticuerpos de la presente invención se pueden administrar como tales, o mediante inyección con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, junto con un adyuvante según sea necesario. Como alternativa, se pueden administrar mediante absorción transdérmica a través de membranas mucosas por el método de pulverización, etc. Más específicamente, aquí, la seroalbúmina humana es un ejemplo de vehículos; y PBS, agua destilada, etc., son ejemplos de diluyentes.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales, y se pueden producir mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, los anticuerpos policlonales se pueden obtener inmunizando mamíferos o especies aviares con un péptido de la presente invención como antígeno, y recogiendo sangre de los mamíferos o especies aviares, y separando y purificando anticuerpos de la sangre recogida. Por ejemplo, se pueden inmunizar mamíferos tales como ratón, hámster, cobaya, pollo, rata, conejo, perro, cabra, oveja, y bóvido, o especies aviares. Los métodos de inmunización son conocidos por los expertos en la técnica, y el antígeno se puede administrar, por ejemplo, dos o tres veces a un intervalo de 7 a 30 días. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,05 mg a 2 mg de antígeno por administración. La vía de administración no está particularmente limitada, y se puede seleccionar adecuadamente a partir de la administración subcutánea, administración intradérmica, administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración intramuscular, etc. Además, el antígeno se puede usar tras disolverlo en un tampón adecuado, por ejemplo un tampón que contiene un adyuvante convencional tal como adyuvante completo de Freund e hidróxido de aluminio.

Los mamíferos o especies aviares inmunizados se pueden criar durante cierto período de tiempo, y, cuando el título de anticuerpos ha aumentado, se pueden inmunizar adicionalmente con, por ejemplo, 100 µg a 1000 µg del antígeno. La sangre se puede recoger de los mamíferos o especies aviares inmunizados 1 a 2 meses tras la administración final, y la sangre se puede separar y purificar por métodos convencionales tales como centrifugación,

precipitación usando sulfato de amonio o polietilenglicol, cromatografía tal como cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, etc., para obtener los anticuerpos policlonales que reconocen los péptidos de la presente invención como un antisuero policlonal.

5 Por otro lado, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener preparando hibridomas. Por ejemplo, los hibridomas se pueden obtener mediante fusión celular de células productoras de anticuerpos con estirpes celulares de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden obtener mediante métodos de fusión celular tales como los indicados más abajo.

10 Como células productoras de anticuerpos se usan células del bazo, células de los ganglios linfáticos, linfocitos B, etc., procedentes de animales inmunizados. Los péptidos de la presente invención se usan como antígenos. Los animales tales como ratón y rata se pueden usar como animales inmunizados, y la administración de antígenos a estos animales se lleva a cabo mediante métodos convencionales. Por ejemplo, los animales se inmunizan administrando una suspensión o emulsión de un péptido de la presente invención, que es un antígeno, con un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund, a los animales varias veces intravenosamente, subcutáneamente, intradérmicamente, intraperitonealmente, etc. Las células productoras de anticuerpos tales como células del bazo se obtienen de los animales inmunizados, y se pueden fusionar con células de mieloma mediante métodos conocidos (G. Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975)) para generar hibridomas.

15 Para ratones, los ejemplos de estirpes celulares de mieloma usadas para fusión celular incluyen, por ejemplo, las estirpes P3X63Ag8, P3U1, Sp2/0, etc. Para la fusión celular se usa un agente que promueve la fusión, tal como polietilenglicol y el virus de Sendai, y para seleccionar hibridomas mediante un método convencional tras la fusión celular, se usa un medio de hipoxantina/aminopterina/timidina (HAT). Los hibridomas obtenidos mediante fusión celular se clonan mediante el método de dilución limitante u otro. Según sea necesario, las estirpes celulares productoras de anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente los péptidos de la presente invención se pueden obtener usando los péptidos de la presente invención en el cribado con un método de inmunoensayo enzimático.

20 Además de los métodos mencionados anteriormente, las células inmunizadas se pueden modular estimulando *in vitro* linfocitos humanos, tales como linfocitos infectados con el virus de EB, usando los péptidos de la presente invención, células que expresan los péptidos, o sus lisados. Los anticuerpos humanos que se unen a los péptidos de la presente invención se pueden obtener fusionando los linfocitos inmunizados con células de médula ósea derivadas de ser humano, tales como U266 (Publicación de Solicitud de Patente Japonesa Kokai nº (JP-A) S63-17688 (sin examinar, solicitud de patente japonesa publicada)).

25 A fin de producir anticuerpos monoclonales de interés a partir de los hibridomas así obtenidos, los hibridomas se pueden cultivar mediante métodos de cultivo convencionales o métodos formadores de ascitis, y los anticuerpos monoclonales se pueden purificar a partir del sobrenadante de cultivo o de la ascitis. La purificación de los anticuerpos monoclonales a partir de sobrenadantes de cultivo o ascitis se puede llevar a cabo mediante métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden combinar adecuadamente y se pueden usar el fraccionamiento con sulfato de amonio, la filtración en gel, la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, etc.

30 Los animales transgénicos que tienen un grupo de genes de anticuerpos humanos se pueden inmunizar usando los péptidos de la presente invención, células que expresan los péptidos, o sus lisados. Las células productoras de anticuerpos se pueden recoger de los animales transgénicos inmunizados, y se pueden fusionar con las estirpes celulares de mieloma descritas anteriormente para obtener hibridomas. Los anticuerpos monoclonales de interés se pueden producir entonces a partir de los hibridomas (documentos WO92/03918; WO94/02602; WO94/25585; WO94/33735; WO96/34096).

Además, las células inmunitarias productoras de anticuerpos, tales como linfocitos inmunizados, se pueden immortalizar usando oncogenes, y se pueden usar para la preparación de anticuerpos monoclonales.

35 Los anticuerpos monoclonales así obtenidos también se pueden modular usando técnicas de manipulación génica (Borbaeck y Larrick, (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies). Por ejemplo, los anticuerpos recombinantes se pueden preparar clonando un ADN que codifica un anticuerpo procedente de células productoras de anticuerpos tales como hibridomas y linfocitos inmunizados, e insertándolo en un vector adecuado, e introduciendo éste en células hospedantes.

40 Los anticuerpos de la presente invención pueden ser fragmentos de anticuerpos o anticuerpos modificados, en tanto que se unan a los péptidos de la presente invención. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, o un Fv monocatenario (scFv) en el cual los fragmentos Fv derivados de las cadenas H y L están enlazados juntos con un ligador adecuado (Huston et al., (1998) Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83). Más específicamente, los fragmentos de anticuerpos se pueden preparar tratando anticuerpos con una enzima tal como papaína y pepsina (Co et al., (1994) J Immunol 152:2968-76; Better y Horwitz, (1989) Methods Enzymol 178: 476-96; Pluckthun y Skerra, (1989) Methods Enzymol 178:497-515; Lamoyi (1986) Methods Enzymol 121:652-63; Rousseaux et al., (1986) Methods Enzymol 121:663-9; Bird y Walker, (1991) Trends Biotech 9:132-7).

Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos modificados obtenidos uniendo anticuerpos a diversas

moléculas tales como polietilenglicol (PEG). Los anticuerpos se pueden modificar mediante métodos de modificación química convencionales conocidos en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos que incluyen una región variable derivada de un anticuerpo no humano y una región constante derivada de un anticuerpo humano, y anticuerpos humanizados que incluyen una región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de un anticuerpo no humano, una región de marco (FR) derivada de un anticuerpo humano, y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Tales anticuerpos se pueden preparar por métodos convencionales conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanizados se pueden obtener sustituyendo la región de secuencia de CDR de un anticuerpo humano por una región de CDR de roedor que tiene actividad de unión deseada (Verhoeyen et al., (1988) Science 239:1534-6). En consecuencia, comparados con los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados son anticuerpos en los que una región más pequeña de un anticuerpo humano se sustituye por una región correspondiente de origen no humano.

También se puede producir un anticuerpo humano completo que tiene una región variable humana además de las regiones de marco y constante humanas. Por ejemplo, en un método *in vitro*, se puede llevar a cabo el cribado usando una librería recombinante de bacteriófagos en la que se presentan fragmentos de anticuerpos humanos (Hoogenboom y Winter, (1992) J Mol Biol 227:381-8). De forma similar, los anticuerpos humanos se pueden producir introduciendo loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos cuyos genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente (patentes U.S. n<sup>os</sup> 6.150.584, 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, y 5.661.016).

Los anticuerpos obtenidos como se describe anteriormente se pueden purificar hasta homogeneidad por métodos convencionales en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar métodos habituales de separación y purificación de proteínas. Los anticuerpos se pueden separar y purificar mediante una combinación de cromatografía en columna, tal como cromatografía de afinidad, filtración, ultrafiltración, desalación, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, enfoque isoelectrico, y demás; sin embargo, los métodos de separación y purificación no están limitados a estos (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow y David Lane, (1988) Cold Spring Harbor Laboratory). Para las columnas de afinidad, se pueden usar columnas de proteína A y columnas de proteína G. Los ejemplos de columnas de proteína A incluyen HyperD, POROS, y Sepharose F.F (Farmacia).

Los ejemplos de cromatografía distinta de la cromatografía de afinidad incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción, y demás (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. et al.). Para la cromatografía, también se puede usar cromatografía de líquidos, tal como HPLC y FPLC.

La afinidad de unión a antígeno de los anticuerpos de la presente invención se puede medir usando, por ejemplo, medida de la absorbancia, ensayo inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), y ensayo de inmunofluorescencia; sin embargo, los métodos no están limitados a ellos. En ELISA, los anticuerpos de la presente invención se inmovilizan sobre una placa, y se añaden los péptidos de la presente invención, después se añade una muestra que contiene un sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpos o anticuerpos purificados. Subsiguientemente, se añade un anticuerpo secundario que tiene un marcador detectable y reconoce el anticuerpo cuya afinidad de unión a antígeno se va a medir. Tras lavar la placa, se añaden los reactivos para detectar el marcador del anticuerpo secundario, y se mide la absorbancia o demás. Por ejemplo, las enzimas tales como fosfatasa alcalina se pueden usar como un marcador para el anticuerpo secundario, y los sustratos enzimáticos tales como fosfato de *p*-nitrofenilo se pueden usar como reactivo para la detección. También se puede usar BIAcore (Farmacia) para evaluar la actividad de los anticuerpos.

Los anticuerpos de la presente invención pueden detectar los péptidos de la presente invención contenidos en las muestras. Específicamente, la presencia de los péptidos de la presente invención en tejidos cancerosos se puede confirmar, por ejemplo, poniendo en contacto biopsias de tejidos cancerosos con los anticuerpos de la presente invención.

Antes de usar los péptidos de la presente invención en terapia para tratamiento y/o prevención de cáncer, es posible predecir si el efecto es prometedor para un sujeto de ensayo antes del inicio del tratamiento evaluando la expresión de los péptidos de la presente invención en el cáncer a tratar usando los anticuerpos de la presente invención.

Además, puesto que los anticuerpos de la presente invención reconocen fragmentos de péptido CDCA1, cuya expresión está aumentada en diversas células cancerosas, se espera que su aplicación sea aplicable no solamente en el diagnóstico sino también para el tratamiento.

(4) Linfocitos T cooperadores, linfocitos T asesinos, o poblaciones inmunocíticas que los incluyen

La presente invención también se refiere a linfocitos T cooperadores y a linfocitos T asesinos inducidos mediante estimulación *in vitro* usando los péptidos de la presente invención, así como a poblaciones inmunocíticas que incluyen los linfocitos T cooperadores y los linfocitos T asesinos. Por ejemplo, los linfocitos T activados de respuesta a tumor son inducidos cuando linfocitos de sangre periférica o linfocitos que se infiltran en el tumor se estimulan *in vitro* usando los péptidos de la presente invención, y estos linfocitos T activados se pueden usar eficazmente para

inmunoterapia adoptiva. Como alternativa, células dendríticas, que son células presentadoras de antígeno potentes, se pueden pulsar con los péptidos de la presente invención o se pueden transformar genéticamente para expresar los péptidos, y se puede inducir una respuesta inmunitaria antitumoral al estimular linfocitos T *in vivo* o *in vitro* usando las células dendríticas.

- 5 Los linfocitos T cooperadores, los linfocitos T asesinos, o las poblaciones inmunocíticas que los incluyen se pueden inducir preferiblemente mediante estimulación *in vitro* usando los péptidos de la presente invención y un adyuvante. Los adyuvantes usados aquí incluyen factores de crecimiento celular y citocinas.

Los tumores se pueden suprimir y los cánceres se pueden prevenir y/o tratar mediante transfusión de los linfocitos T cooperadores, linfocitos T asesinos, o poblaciones inmunocíticas que los contienen, así obtenidos, a un paciente con cáncer, intravascularmente, localmente al tumor, etc.

10 Los linfocitos T cooperadores, los linfocitos T asesinos, o las poblaciones inmunocíticas que los incluyen, que son capaces de suprimir tumores como se describe anteriormente, se pueden producir usando los péptidos de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención proporciona medios de cultivo celular que contienen los péptidos de la presente invención. Los linfocitos T cooperadores, los linfocitos T asesinos, o las poblaciones inmunocíticas que los incluyen, capaces de suprimir tumores, se pueden preparar usando los medios de cultivo celular. Además, la presente invención proporciona un kit de cultivo celular que incluye el medio de cultivo celular mencionado anteriormente y un recipiente de cultivo celular para la producción de linfocitos T cooperadores, linfocitos T asesinos, o poblaciones inmunocíticas que los incluyen.

#### (5) Exosomas que presentan antígeno

20 La presente invención proporciona además una vesícula endocítica denominada "exosoma" que presenta sobre su superficie un complejo formado entre un péptido de la presente invención y un antígeno HLA. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, mediante los métodos descritos con detalle en las traducciones japonesas de la Publicación de Solicitud de Patente Japonesa Kohyo nº (JP-A) H11-510507 (publicación en fase nacional japonesa sin examinar correspondiente a una publicación internacional no japonesa) y JP-A (Kohyo) 2000-512161.

25 Preferiblemente, los exosomas se preparan usando células presentadoras de antígeno obtenidas a partir de un sujeto de tratamiento y/o prevención. Los exosomas de la presente invención se pueden inyectar como una vacuna contra el cáncer de manera similar a los péptidos de la presente invención.

El tipo antigénico de HLA usado en la presente invención debería corresponder al tipo antigénico de HLA de un sujeto que necesite tratamiento y/o prevención. Por ejemplo, el tipo antigénico de HLA es HLA-A02, y preferiblemente, HLA-A2 (HLA-A\*0201). "HLA-A2" significa una proteína, mientras que "(HLA-A\*0201)" significa un gen que corresponde a un segmento de la proteína, debido a la falta actual de terminología para expresar segmentos de la proteína.

#### (6) Métodos para inducir células presentadoras de antígeno y linfocitos T asesinos

35 La presente invención proporciona métodos para inducir células presentadoras de antígeno usando uno o más de los péptidos de la presente invención. Las células presentadoras de antígeno se pueden inducir poniendo en contacto células dendríticas inducidas de monocitos de sangre periférica con uno o más de los péptidos de la presente invención para estimular las células dendríticas. Cuando los péptidos de la presente invención se administran a un sujeto, las células presentadoras de antígeno que presentan los péptidos de la presente invención sobre su superficie pueden ser inducidas en el cuerpo del sujeto. Como alternativa, se puede usar un método *ex vivo*, en el que las células presentadoras de antígeno se pulsan con los péptidos de la presente invención, y entonces las células se administran a un sujeto como una vacuna. Por ejemplo, la administración *ex vivo* puede incluir las etapas de:

(1) recoger células presentadoras de antígeno procedentes de un sujeto; y

45 (2) poner en contacto las células presentadoras de antígeno de la etapa (1) con un péptido de la presente invención (pulsando las células presentadoras de antígeno de la etapa (1) con un péptido de la presente invención).

Las células presentadoras de antígeno obtenidas en la etapa (2) se pueden administrar a un sujeto como una vacuna.

50 La presente invención también proporciona métodos para inducir células presentadoras de antígeno que muestran un nivel elevado de actividad inductora de linfocitos T asesinos. Los métodos incluyen la etapa de transfectar *in vitro* células presentadoras de antígeno con un gen que incluye un polinucleótido que codifica uno o más de los péptidos de la presente invención. El gen a transfectar puede ser un ADN o ARN. Para la transfección, se pueden usar de forma adecuada diversos métodos llevados a cabo convenientemente en la técnica, tales como lipofección, electroporación, y un método de fosfato de calcio, pero los métodos no están limitados a ellos. Más específicamente, la transfección se puede llevar a cabo como se describe en Reeves ME, et al., (1996) Cancer Res., 56:5672-7; Butterfield LH, et al., (1998) J. Immunol., 161:5607-13; Boczkowski D, et al., (1996) J Exp. Med., 184:465-72; y

documento WO99/08521. Cuando los genes se transfectan en células presentadoras de antígeno, se transcriben y traducen en las células. Las proteínas resultantes se procesan subsiguientemente vía las rutas del MHC clase I y clase II, y se presentan sobre la superficie de células presentadoras de antígeno como péptidos parciales a través de la ruta de presentación de antígeno.

- 5 La presente invención también proporciona métodos para inducir linfocitos T asesinos usando uno o más de los péptidos de la presente invención. Al administrar uno o más de los péptidos de la presente invención a un sujeto, se pueden inducir linfocitos T asesinos en el cuerpo del sujeto, aumentando así el sistema inmunitario que se dirige contra células cancerosas que presentan CDCA1 en tejidos tumorales. Como alternativa, los linfocitos T asesinos activados se pueden inducir poniendo en contacto células presentadoras de antígeno y células CD8 positivas procedentes del sujeto con uno o más de los péptidos de la presente invención *in vitro*, y poniendo en contacto leucocitos mononucleares de sangre periférica con células presentadoras de antígeno *in vitro* para estimular las células. En métodos terapéuticos *ex vivo*, el sistema inmunitario que se dirige contra células cancerosas que presentan CDCA1 en tejidos tumorales en un sujeto se puede aumentar devolviendo los linfocitos T asesinos activados al cuerpo del sujeto. Por ejemplo, los métodos incluyen las etapas de:
- 10
- 15 (1) recoger células presentadoras de antígeno procedentes de un sujeto; y
- (2) poner en contacto las células presentadoras de antígeno de la etapa (1) con un péptido de la presente invención (pulsando las células presentadoras de antígeno de la etapa (1) con un péptido de la presente invención);
- (3) mezclando y cocultivando las células presentadoras de antígeno de la etapa (2) con linfocitos T CD8<sup>+</sup> para inducir linfocitos T citotóxicos; y
- 20
- (4) recoger linfocitos T CD8<sup>+</sup> procedentes del cocultivo de la etapa (3).

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que tienen actividad citotóxica obtenidos en la etapa (4) se pueden administrar a un sujeto como una vacuna.

- 25 La presente invención también proporciona linfocitos T asesinos aislados inducidos usando uno o más de los péptidos de la presente invención. Preferiblemente, los linfocitos T asesinos inducidos por el método de la presente invención derivan de un sujeto que recibe el tratamiento y/o prevención. Las células se pueden administrar en combinación con otros agentes que contienen células presentadoras de antígeno o exosomas que presentan uno o más de los péptidos de la presente invención. Los linfocitos T asesinos obtenidos son específicos para células diana que presentan el mismo péptido usado para la inducción. Las células diana son células que expresan de forma endógena CDCA1, o células transfectadas con el gen de CDCA1. Mediante estimulación con un péptido de la presente invención, las células que presentan el péptido de la presente invención sobre su superficie, tales como células cancerosas de cáncer de pulmón, carcinoma colangiocelular, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, leucemia mielógena crónica, linfoma maligno, cáncer de cuello uterino, osteosarcoma, cáncer de mama, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de colon, y demás, se pueden convertir en dianas para el ataque.
- 30

#### 35 (7) Receptores de linfocitos T (TCR)

- La presente invención proporciona además ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos que forman las subunidades de receptores de linfocitos T (TCRs) que reconocen CDCA1-4, y métodos para su uso. TCR contiene al menos siete proteínas transmembránicas. Un heterodímero enlazado ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) mediante enlace de disulfuro forma la unidad de reconocimiento de antígeno clonotípica, mientras que las cadenas de CD3 invariantes que consisten en cadenas  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\zeta$  y  $\eta$  acoplan la unión al ligando con la ruta de señalización, provocando de ese modo la activación de linfocitos T y la respuesta inmunitaria celular. Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , que son responsables del reconocimiento antigénico como se menciona anteriormente, son necesarias para que los linfocitos T adquieran la especificidad de reconocimiento para una diana particular. Por lo tanto, para sintetizar TCRs que reconocen específicamente los péptidos de la presente invención, las secuencias de ácidos nucleicos de  $\alpha$  y  $\beta$  que son subunidades de TCR derivadas de CTLs inducidos usando los péptidos de la presente invención se pueden identificar mediante métodos conocidos por aquellos de pericia en la técnica (documento WO2007/032255; y Morgan et al., J. Immunol., 171, 3288 (2003)). Puesto que los TCRs formados a partir de las unidades de TCR identificadas se pueden unir a células diana presentadoras del péptido CDCA1, los TCRs son útiles cuando se introducen en células que tienen un efecto exterminador de células.
- 40
- 45

- 50 Los ácidos nucleicos que codifican las subunidades de TCR se pueden incorporar en vectores adecuados (por ejemplo, vectores retrovíricos). Los vectores se pueden producir por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los vectores a los que se les han incorporado las subunidades de TCR se pueden usar para la introducción en linfocitos T. En particular, transformando linfocitos T derivados de pacientes, se pueden obtener linfocitos T (CTLs) que reconocen específicamente y atacan a células que expresan CDCA1. Los CTLs así obtenidos a los que se les han introducido los TCRs se pueden cultivar y se pueden hacer crecer mediante métodos habituales (Kawakami et al., J. Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Los CTLs obtenidos por el método mencionado anteriormente se pueden usar para la inmunoterapia celular.
- 55

- 5 La presente invención también proporciona células presentadoras de antígeno que presentan un complejo formado con un antígeno HLA y uno o más de los péptidos de la presente invención. Las células presentadoras de antígeno, con las que se ponen en contacto uno o más de los péptidos de la presente invención o nucleótidos que codifican tales péptidos, se recogen preferiblemente de un sujeto que recibe el tratamiento y/o prevención. Los péptidos de la presente invención, las células presentadoras de antígeno que presentan los péptidos, los exosomas, o los linfocitos T asesinos activados se pueden administrar como una vacuna en combinación con otros fármacos.

### Ejemplos

#### [Ejemplo 1]

(1) Selección de un repertorio de péptidos CDCA1 que muestra afinidad por HLA-A2

- 10 Se buscó la secuencia de aminoácidos de CDCA1 humano usando el sistema BIMAS, y se seleccionaron 41 tipos de péptidos en el orden descendente de afinidad de unión estimada por HLA-A2 (Tabla 1).

[Tabla 1-1]

Nº	POSICIÓN DEL PÉPTIDO	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL PÉPTIDO	PUNTUACIÓN DE AFINIDAD DE UNIÓN	SECUENCIA ID NÚMERO
1	<u>65-73</u>	<u>YMMPVNSEV</u>	<u>855</u>	<u>SEC ID NO: 1</u>
2	120-128	FLSGIINF	607	SEC ID NO: 3
3	222-230	<u>RLNELKLLV</u>	285	SEC ID NO: 4
<u>4</u>	<u>351-359</u>	<u>KLATAQFKI</u>	<u>211</u>	<u>SEC ID NO: 2</u>
5	182-190	QLSDGIQEL	201	SEC ID NO: 5
6	141-149	FLWQYKSSA	190	SEC ID NO: 6
7	3-11	TLSFPRYNV	69,6	SEC ID NO: 7
8	285-293	CLPSCQLEV	69,6	SEC ID NO: 8
9	386-394	AVYERVTTI	27,5	SEC ID NO: 9
10	372-380	TVIEDCNKV	25,0	SEC ID NO: 10
11	243-251	KIVDSPEKL	20,7	SEC ID NO: 11
12	257-265	KMKDTVQKL	17,8	SEC ID NO: 12
13	88-96	LVTHLDSFL	17,5	SEC ID NO: 13
14	447-455	KIDEKTAEL	16,9	SEC ID NO: 14
15	358-366	KINKKHEDV	16,4	SEC ID NO: 15
16	416-424	KLKSQEIFL	14,4	SEC ID NO: 16
17	82-90	FLPFSNLVT	14,1	SEC ID NO: 17
18	344-352	LMIVKKEKL	12,9	SEC ID NO: 18
19	109-117	ILCPKAKRT	12,9	SEC ID NO: 19
20	44-52	VLHMIYMRA	12,7	SEC ID NO: 20
21	228-236	LLVSLKEI	40,8	SEC ID NO: 21
22	227-236	KLLVSLKEI	311	SEC ID NO: 22
23	222-231	RLNELKLLVV	269	SEC ID NO: 23
24	294-303	QLYQKKIQDL	157	SEC ID NO: 24
25	87-96	NLVTHLDSFL	117	SEC ID NO: 25

26	181-190	KQLSDGIQEL	64,5	SEC ID NO: 26
27	47-56	MIYMRALQIV	49,1	SEC ID NO: 27

[Tabla 1-2]

28	402-411	KLGIQQLKDA	40,0	SEC ID NO: 28
29	343-352	RLMIVKKEKL	38,7	SEC ID NO: 29
30	309-318	KLASILKESL	36,6	SEC ID NO: 30
31	22-31	ILTGADGKNL	36,3	SEC ID NO: 31
32	193-202	SLNQDFHQKT	28,3	SEC ID NO: 32
33	52-61	ALQIVYGIRL	21,4	SEC ID NO: 33
34	44-53	VLHMIYMRAL	16,7	SEC ID NO: 34
35	35-44	DLYPNPKPEV	16,7	SEC ID NO: 35
36	165-174	KLERLDSVPV	15,6	SEC ID NO: 36
37	65-74	YMMPVNSEVM	12,3	SEC ID NO: 37
38	154-163	QLNAAHQEAL	10,5	SEC ID NO: 38
39	60-69	RLEHFYMMPV	10,2	SEC ID NO: 39
40	344-353	LMIVKKEKLA	6,1	SEC ID NO: 40
41	453-462	AELKRKMFKM	4,8	SEC ID NO: 41

Los epítomos de linfocitos T asesinos restringidos a HLA-A2 identificados en la presente invención están subrayados.

5 **[Ejemplo 2]**

En primer lugar, se indujeron células dendríticas (DCs) a partir de células de médula ósea de ratones transgénicos para HLA-A2 usando un método dado a conocer previamente (Komori H et al. Clinical Cancer Research 12: 2689-2697, 2006). Las BM-DCs así obtenidas se pulsaron con un péptido CDCA1 (10 µM), y después se administraron intraperitonealmente a ratones transgénicos para HLA-A2 a 5 x 10<sup>5</sup> células por ratón. Los ratones se inmunizaron a un intervalo de dos veces por semana mediante el mismo método de administración, después se recogieron sus células del bazo y se usaron para la detección de linfocitos T auxiliares. A fin de examinar de forma rigurosa la inducción de linfocitos T asesinos derivados de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se eliminaron de las células del bazo usando perlas MACS tras la retirada del bazo, y se usaron las células que quedan.

La Fig. 1A muestra el protocolo para determinar los péptidos CDCA1 reconocidos por linfocitos T asesinos restringidos a HLA-A2 en ratones transgénicos para HLA-A2. El día en el que las células del bazo se recogen a partir de los ratones inmunizados se denomina como "Día 0".

Día -21: (1) La inducción de células dendríticas derivadas de médula ósea (aquí más abajo denominadas BM-DCs) se inició añadiendo GM-CSF a las células de médula ósea de ratones transgénicos para HLA-A2.

Día -14: (2) Se añadió una mezcla de cuatro tipos de péptidos CDCA1 a las BM-DCs inducidas, y después de dos horas, se administró intraperitonealmente a 5 x 10<sup>5</sup> células por ratón.

(1) y (2) se repitieron en un intervalo de dos veces por semana.

Día 0: Se recogieron células del bazo procedentes de los ratones transgénicos para HLA-A2 inmunizados, y se cocultivaron con BM-DCs que se habían incubado con péptidos CDCA1 durante dos horas. Subsiguientemente, se cultivaron durante seis días.

Día 6: Para detectar linfocitos T asesinos que reconocen específicamente péptidos CDCA1, los linfocitos T que producen gamma interferón tras la estimulación antigénica se cuantificaron mediante ensayo ELISPOT. Como células diana, se usaron BM-DCs pulsadas con cada péptido CDCA1 individual, y BM-DCs no pulsadas.

Evaluación de la actividad de linfocitos T asesinos específicos de CDCA1 mediante ensayo ELISPOT:

Se determinó mediante ensayo ELISPOT si los linfocitos T asesinos que reaccionan específicamente con CDCA1 para producir IFN- $\gamma$  existen realmente o no entre los linfocitos T asesinos inducidos. IFN- $\gamma$  se detectó usando un kit ELISPOT para IFN- $\gamma$  de ratón (BD Biosciences). Cuando los linfocitos T asesinos (efectores) responden a células estimuladoras (dianas) y producen IFN- $\gamma$ , son detectados como manchas rojas. Como células diana, se usaron células T2A2 positivas para HLA-A2 que no expresan CDCA1, y células T2A2 pulsadas con el péptido CDCA1. Las células T2A2, una estirpe celular producida introduciendo el gen de HLA-A2 en la estirpe celular T2 de ratón deficiente en la expresión del gen TAP, se adquirieron de RIKEN Cell Bank. Debido a la deficiencia de TAP en estas células, los complejos formados entre moléculas de HLA-A2 y péptidos añadidos exógenamente se expresan en la superficie celular solamente cuando los péptidos tienen la capacidad de unirse a las moléculas de HLA-A2. En primer lugar, placas ELISPOT (BD Biosciences) se revistieron con un anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  de ratón durante 18 horas. Subsiguientemente, las placas se bloquearon con 10% de FCS/RPMI durante dos horas. Las células efectoras (100  $\mu$ l/pocillo) y las células diana (100  $\mu$ l/pocillo) se mezclaron y cultivaron durante 22 horas a 37°C. El experimento se llevó a cabo a una relación efectora/diana (relación E/T) de 5:1. Las placas se lavaron entonces con agua esterilizada, y se hicieron reaccionar con un anticuerpo biotinilado anti-IFN- $\gamma$  de ratón durante dos horas, y se hicieron reaccionar además con estreptavidina-HRP durante una hora. Las manchas positivas a IFN- $\gamma$  se detectaron usando una disolución sustrato. Para contar las manchas, se usó un software de análisis automático de MINERVA TECH. En la Fig. 1B se muestran los resultados para los Números 1 a 20 de Péptido. A partir de experimentos similares, se observó respuesta inmunitaria de linfocitos T asesinos específicos de CDCA1 en linfocitos T asesinos inducidos con el péptido CDCA1<sub>65-73</sub> (No. 1) (SEC ID NO: 1) o CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4) (SEC ID NO: 2) entre los 41 péptidos (Fig. 2).

Los resultados del análisis de linfocitos T asesinos inducidos con el péptido CDCA1<sub>65-73</sub> (No. 1) (SEC ID NO: 1) o CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4) (SEC ID NO: 2) se muestran en las Figs. 2A y 2B, respectivamente.

### [Ejemplo 3]

25 Pacientes, muestras de sangre, y estirpes celulares:

Se recogieron muestras de sangre derivadas de pacientes con NSCLC durante exámenes de diagnóstico rutinarios con autorización firmada. La estirpe celular de cáncer de colon humano negativa para CDCA1 COLO201 fue proporcionada por el Health Science Research Resources Bank. La expresión de HLA-A2 en estas muestras se confirmó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo monoclonal anti-HLA-A2 BB7.2 (One Lambda Inc., Canoga Park, CA).

Transferencia de gen lentivírico:

Se llevó a cabo la transferencia génica mediada por un vector lentivírico usando el método descrito en Tahara-Hanaoka S, et al. Exp. Hematol. 2002;30:11-17. De forma breve, se transfectaron 17  $\mu$ g de vectores autoinactivantes CSII-CMV-RfA y CSII-EF-RfA que portan ADNc de CDCA1 (Miyoshi H, et al. J. Virol. 1998; 72:8150-8157) y 10  $\mu$ g de pCMV-VSV-G-RSV-Rev y pHIVgp en células 293T en una placa de cultivo de 10 cm usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Después de 60 horas, el medio de cultivo se recogió, y las partículas víricas se peletizaron mediante ultracentrifugación (50.000 x g, dos horas). El pelete se suspendió en 50  $\mu$ l de disolución RPMI 1640, y se añadieron 10  $\mu$ l de la suspensión vírica a cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U que contiene 5 x 10<sup>4</sup> células COLO201 por pocillo. La expresión del gen de CDCA1 transfectado se confirmó mediante análisis de transferencia Western.

Inducción de CTLs humanos reactivos con CDCA1:

Se usaron células DC derivadas de monocitos como células presentadoras de antígeno para la inducción de CTLs en respuesta a péptidos presentados por HLA. Las DCs se obtuvieron por métodos *in vitro* dados a conocer previamente (Suda T, et al. Cancer Sci. 2007; Nakahara S, et al. Cancer Res. 2003;63:4112-8). De forma breve, monocitos de sangre periférica (PBMCs) aislados de voluntarios sanos positivos a HLA-A\*0201 y pacientes con NSCLC usando una disolución de Ficoll-Paque (GE Healthcare UK, Ltd., Buckinghamshire, UK) se cribaron en busca de poblaciones positivas a CD8 y positivas a CD14 usando MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Para obtener las DCs, la población positiva a CD14 se cultivó en AIM-V (Invitrogen) que contiene 2% de plasma autólogo en presencia de 100 ng/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y 10 ng/ml de interleucina (IL)-4 (PeproTec Inc., New Jersey, USA). Cuatro días después de la incubación, se añadió OK-432 a la placa para preparar DCs maduras. Cinco días después del comienzo del cultivo para DCs inducidas por citocinas, las células se pulsaron con 20  $\mu$ g/ml de un péptido que se une a HLA-A2, durante dos horas a 37°C en AIM-V en presencia de 4  $\mu$ g/ml de  $\beta$ 2-microglobulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Estas DCs pulsadas con el péptido se irradiaron (3.500 cGy) y se mezclaron a una relación 1:50 con linfocitos T CD8 positivos autólogos obtenidos a partir de PBMCs usando anti-CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec). La incubación se llevó a cabo usando placas de 48 pocillos, que se prepararon para que contuviesen 0,5 ml de AIM-V que contiene en cada pocillo 2% de plasma autólogo, 1 x 10<sup>4</sup> DCs pulsadas con péptido, 5 x 10<sup>5</sup> linfocitos T CD8 positivos, y 10 ng/ml de IL-7 humana (Wako, Osaka, Japón). Tres días después de la incubación, se añadió IL-2 humana (PeproTec Inc.) a una

concentración de 20 UI/ml. Además, los linfocitos T se volvieron a estimular en los días 12 y 19 con DCs autólogas pulsadas con péptido. Las DCs se prepararon de forma adecuada mediante el método mencionado anteriormente. Seis días después de la tercera estimulación con péptido en el día 25, se evaluó la respuesta de CTLs específicos del antígeno mediante ensayo de liberación de cromo (Cr) y ensayo ELISPOT de IFN- $\gamma$ .

## 5 Respuesta de CTLs a células diana

Se cocultivaron CTLs a diversas relaciones de células efectoras/células diana con células diana que son diversas estirpes celulares de cáncer y células T2 con o sin pulso de péptido, y se llevó a cabo un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  y un ensayo ELISPOT de IFN- $\gamma$  usando métodos convencionales (Komori H, et al., Clin. Cancer Res. 2006; 12:2689-2697; Makita M, et al. Clin. Cancer Res. 2002; 8:2626-31; Yokomine K, et al. Cancer Sci. 2007;98:1930-5). De forma breve, las células diana se marcaron usando 3,7 KBq de  $\text{Na}_2 \text{ } ^{51}\text{Cr}_4$  (Perkin Elmer Life Sciences) a 37°C durante una hora en una incubadora de  $\text{CO}_2$ . Las células diana marcadas se aclararon tres veces, y se prepararon células diana pulsadas con péptido incubando las células con 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de un péptido durante tres horas a 37°C. Las células diana se mezclaron con células efectoras hasta un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  en una placa de microtitulación de fondo plano, y entonces se incubaron. Seis horas después de la incubación, se recogieron 50  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de cada pocillo, y la radioactividad se cuantificó usando un contador gamma. La actividad citotóxica específica se evaluó calculando la velocidad de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  específica según un método existente (Suda T, et al. Cancer Sci. 2007; 98:1803-8). El ensayo ELISPOT también se llevó a cabo según un método existente (Komori H, et al. Clin. Cancer Res. 2006; 12:2689-97).

Inducción de CTLs sensibles a CDCA1 procedentes de PBMCs derivadas de donantes sanos positivos a HLA-A2:

20 Las PBMCs se aislaron de donantes sanos positivos a HLA-A2 (A\*0201). Los linfocitos T  $\text{CD8}^+$  se cocultivaron con DCs derivadas de monocitos pulsadas con el péptido CDCA1<sub>65-73</sub> (No. 1) (SEC ID NO: 1) o CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4) (SEC ID NO: 2), y los linfocitos T  $\text{CD8}^+$  se estimularon tres veces a semana (Fig. 3A).

Los CTLs inducidos de pacientes con cáncer o de donantes sanos se cocultivaron con células diana. Como la diana, se usaron células T2 pulsadas con el péptido CDCA1<sub>65-73</sub> (No. 1) (SEC ID NO: 1) o CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4) (SEC ID NO: 2), y se llevaron a cabo el ensayo ELISPOT y el ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ . Como se muestra en la Fig. 3B, para el paciente donante 1 con cáncer, la producción de IFN- $\gamma$  por CTLs fue significativamente mayor cuando las células se estimularon con T2 pulsadas con péptido CDCA1<sub>65-73</sub> (No. 1) (SEC ID NO: 1) que con T2 sin pulsar. Los CTLs inducidos de donante sano 1 produjeron una gran cantidad de IFN- $\gamma$  en respuesta a células T2 pulsadas con el péptido CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4) (SEC ID NO: 2) (más de 300 manchas por pocillo) (Fig. 3C). Además, los CTLs derivados del paciente donante 1 con cáncer y del donante sano 1 mostraron actividad citotóxica frente a células T2 pulsadas con el péptido CDCA1<sub>65-73</sub> (No. 1) (SEC ID NO: 1) o CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4) (SEC ID NO: 2) en el ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  (Fig. 3D). Como se muestra en la Fig. 3E, cuando se estimularon CTLs mediante células T2 pulsadas con el péptido CDCA1 a diversas concentraciones, los CTLs respondieron a las células T2 pulsadas con el péptido CDCA1 de una manera dependiente de la dosis. En comparación con la respuesta a células T2 sin pulsar o a células T2 pulsadas con un péptido derivado del VIH que se une a HLA-A2, se encontró que los CTLs producen una mayor cantidad de IFN- $\gamma$  en respuesta a células T2 pulsadas a una concentración peptídica de 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o más. Los resultados mencionados anteriormente muestran que estos CTLs tienen citotoxicidad específica del péptido.

Como células diana para examinar la respuesta inmunitaria de CTLs específica de CDCA1, se usó COLO201 en la que se introdujo CDCA1 (COLO201/CDCA1, CDCA1+, HLA-A2+; Fig. 4A). Como se muestra en la Fig. 4B, los CTLs derivados de donantes sanos y estimulados con el péptido CDCA1<sub>65-73</sub> (No. 1) (SEC ID NO: 1) produjeron una mayor cantidad de IFN- $\gamma$  frente a COLO201/CDCA1 que COLO201 transfectado con un vector vacío que no expresa CDCA1. Los CTLs derivados del donante sano 2 y estimulados con el péptido CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4) (SEC ID NO: 2) también mostraron respuesta inmunitaria específica a COLO201/CDCA1 (Fig. 4C). Además, estos CTLs mostraron respuesta inmunitaria a células PANC1 (CDCA1+, HLA-A2+), pero no a células A549 (CDCA1+, HLA-2-) (Fig. 4D).

45 Para aplicar péptidos derivados de CDCA1 a la inmunoterapia del cáncer, sería muy importante que los CTLs sensibles al péptido CDCA1 sean capaces de mostrar citotoxicidad específica frente a células tumorales que expresan endógenamente CDCA1. Como se muestra en la Fig. 4E, para el paciente donante 1 con cáncer, los CTLs reactivos a CDCA1 obtenidos usando el péptido CDCA1<sub>65-73</sub> (No. 1) (SEC ID NO: 1) mostraron actividad citotóxica frente a células PANC1 (CDCA1+, HLA-A2+), pero no a células A549 (CDCA1+, HLA-2-) o células COLO201 (CDCA1-, HLA-A2+). De forma similar, los CTLs derivados del donante sano 1 estimulados con el péptido CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4) (SEC ID NO: 2) mostraron actividad citotóxica frente a células PANC1 (CDCA1+, HLA-A2+), pero no a células A549 (CDCA1+, HLA-2-). Estos resultados muestran que estos péptidos se procesan de forma natural en células cancerosas y se presentan en la superficie de células cancerosas junto con HLA-A2, y pueden ser reconocidos por CTLs.

55 Para la detección de CTLs específicos de CDCA1 restringidos a HLA-A2, se adquirió el tetrámero de HLA-A\*0201 marcado con PE unido al péptido CDCA1<sub>351-359</sub> de Medical & Biological Laboratories Co. Ltd. (Nagoya, Japón). Como se muestra en la Fig. 4G, entre las células positivas a CD8, se observó una fuerte correlación entre los CTLs reactivos al péptido CDCA1<sub>351-359</sub> y los CTLs positivos al tetrámero. Este resultado demuestra que los CTLs específicos del péptido CDCA1 restringidos a HLA-A2 estaban presentes entre los linfocitos T  $\text{CD8}^+$  positivos usados

en este estudio.

Discusión:

5 La identificación de péptidos derivados de TAA que se procesan de forma natural y se presentan en células tumorales es importante para el establecimiento de la inmunoterapia del cáncer a base de péptidos. CDCA1, que es un nuevo antígeno del cáncer/testículo, se identificó mediante análisis de micromatriz de ADNc usando tejidos de NSCLC y tejidos normales. CDCA1 está fuertemente expresado en NSCLC y testículo normal, pero su ARNm o proteína no se expresó en los otros tejidos normales examinados. Puesto que el testículo es un tejido aislado del sistema inmunitario, los CTLs sensibles a CDCA1 atacarían solamente a NSCLC. Por lo tanto, CDCA1 se seleccionó como un TAA para inmunoterapia de pacientes con NSCLC.

10 Para minimizar el riesgo de supresión, mutación, o expresión disminuida de TAA como medio de evasión inmune por las células cancerosas como resultado de la terapia de inducción inmunitaria, se deseó identificar TAAs esenciales para la proliferación o supervivencia de NSCLC que se pudiesen usar como dianas para inmunoterapia (Yoshitake Y, et al. Clin. Cancer Res. 2004; 10:6437-48). Se ha dado a conocer que CDCA1 funciona actuando sobre la unión entre los microtúbulos del husillo y los cinetocoros, y tiene un papel importante en el mantenimiento del ciclo celular (DeLuca JG, et al. J. Cell Biol. 2002; 159:549-55). Además, CDCA1 es un componente del complejo del ciclo de división nuclear (NDC), que juega un papel importante en la segregación cromosómica apropiada durante la mitosis, y está muy conservado independientemente de la especie (DeLuca JG, et al. Curr. Biol. 2003; 13:2103-9). CDCA1 es esencial para la localización de cinetocoros de la proteína centromérica E (CENP-E) en células HeLa. La supresión de la expresión de CDCA1 mediante ARNpi provoca segregación cromosómica normal por bloqueo de la mitosis e inducción subsiguiente de la muerte celular (Liu D, et al. J. Biol. Chem. 2007; 282:21415-24). Esta salida aberrante de la mitosis tiene las características tanto de apoptosis como de catástrofe (DeLuca JG, et al. J. Cell Biol. 2002; 159:549-55). Esto es, CDCA1 es esencial para la función celular, y juega un papel importante en la proliferación y supervivencia de células cancerosas.

25 CDCA1 y el péptido asociado al cinetocoro 2 (KNTC2) son miembros del complejo de proteínas del centrómero evolutivamente conservado (Hayama S, et al. Cancer Res 2006; 66:10339-48). La inmunotinción muestra que su expresión elevada está asociada con un mal pronóstico de pacientes con NSCLC (Hayama S, et al. Cancer Res 2006; 66:10339-48). Por lo tanto, el nivel de expresión de CDCA1 en tejidos de NSCLC es un marcador útil para predecir el pronóstico de pacientes tras la operación quirúrgica. Se sugiere la implicación de CDCA1 en la progresión de NSCLC. De este modo, la inmunoterapia que se dirige a CDCA1 puede ser eficaz para pacientes con NSCLC con un mal pronóstico.

30 En la presente invención, dos péptidos epitópicos CDCA1 restringidos a HLA-A2, que promovieron la producción de CTLs de ratón restringidos a HLA-A2, se identificaron usando ratones transgénicos para HLA-A2. Además, se pudieron preparar CTLs humanos reactivos a CDCA1 a partir de PBMCs derivadas de donantes sanos estimuladas con estos péptidos. Estas estirpes de CTLs específicos del péptido CDCA1 eliminaron células cancerosas que expresan CDCA1 de una manera restringida a HLA-A2 (Fig. 4).

35 Los péptidos derivados de CDCA1 que se predice que tienen afinidad de unión elevada por la molécula de HLA-A0201 se seleccionaron usando el software BIMAS; sin embargo, algunas de las secuencias de aminoácidos no están conservadas entre CDCA1 humano y CDCA1 de ratón. Hay dos diferencias de aminoácidos entre las secuencias humana y de ratón del péptido CDCA1<sub>65-73</sub> (No. 1) (humano: YMMPVNSEV/ratón: YMMPMNIEV), y una diferencia de aminoácidos en el péptido CDCA1<sub>351-359</sub> (No. 4) (humano KLATAQFKI/ratón KLATARFKI). Sin embargo, en la presente invención, se confirmó la inducción de los CTLs reactivos al péptido epitópico mencionados anteriormente procedentes de donantes sanos.

45 Se indujeron CTLs reactivos a CDCA1 a partir de PBMCs derivadas de donantes sanos mediante estimulación *in vitro* usando los péptidos CDCA1. Los CTLs inducidos por DCs presentadoras de péptido mostraron actividad citotóxica frente a células cancerosas que expresan CDCA, de una manera restringida a HLA-A2. La inducción de CTLs específicos de CDCA1 derivados de donantes sanos es significativa para la continuación de la búsqueda posterior de TAAs. Además, actualmente se está intentando la inducción de CTLs reactivos a CDCA1 procedentes de PBMCs aisladas de pacientes con NSCLC, cáncer microcítico, carcinoma colangiocelular, cáncer de vejiga, y cáncer de células renales. Hay varios métodos de inmunoterapia del cáncer mediados por células, incluyendo vacunación de péptidos o proteínas (Rosenberg SA, et al. Nat Med 1998; 4:321-7), inmunización con células dendríticas pulsadas con péptidos, proteínas, o lisados tumorales (Kugler A, et al. Nat Med 2000; 6:332-6), y transferencia adoptiva *ex vivo* usando estirpes de CTLs específicos del tumor (Falkenburg JH, et al. Blood 1999; 94:1201-8). Los péptidos CDCA1 identificados en la presente invención se podrían aplicar a estas inmunoterapias.

55 Si la seguridad y eficacia de la inmunoterapia del cáncer usando péptidos identificados en la presente invención, que son presentados a linfocitos T asesinos vía HLA-A2, se pueden mostrar en medicina de investigación, sería posible la aplicación clínica a caucásicos. Además, identificando péptidos presentados a linfocitos T asesinos vía HLA-A2 que se encuentran frecuentemente no sólo en los japoneses sino también en los caucásicos, sería altamente posible desarrollar agentes de inmunoterapia del cáncer que son aplicables al 30% de pacientes japoneses y caucásicos con cáncer de pulmón.

Aplicabilidad industrial

HLA-A2 es un alelo de HLA clase I encontrado en aproximadamente el 30% de la población japonesa. Los péptidos CDCA1 según la presente invención pueden inducir linfocitos T citotóxicos humanos que dañan a las células cancerosas que expresan complejos de los péptidos y moléculas de HLA-A2. Por lo tanto, los péptidos según la presente invención se pueden aplicar a inmunoterapias de cáncer de pulmón, carcinoma colangiocelular, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, leucemia mielogenosa crónica, linfoma maligno, cáncer de cuello uterino, osteosarcoma, cáncer de mama, sarcoma de tejidos blandos, y cáncer de colon, en pacientes positivos a HLA-A2. De este modo, los péptidos son útiles para el desarrollo de agentes terapéuticos para suprimir la proliferación y progresión de estos cánceres.

- 5
- 10 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY THE UNIVERSITY OF TOKYO ONCOTHERAPY SCIENCE INC.
- <120> Péptido CDCA1 y un medicamento que lo comprende
- <130> ONC-A0712P
- 15 <150> JP 2007-214000
- <151> 20-08-2007
- <160> 41
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- 20 <211> 9
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
- 25 <400> 1
- Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val  
1 5
- <210> 2
- <211> 9
- <212> PRT
- 30 <213> Artificial
- <220>
- <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
- <400> 2
- Lys Leu Ala Thr Ala Gln Phe Lys Ile  
1 5
- 35 <210> 3
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 3

Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile  
1 5

<210> 4

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 4

Arg Leu Asn Glu Leu Lys Leu Leu Val  
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 5

Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu  
1 5

20 <210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 6

Phe Leu Trp Gln Tyr Lys Ser Ser Ala  
1 5

<210> 7

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 7

Thr Leu Ser Phe Pro Arg Tyr Asn Val  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 8

Cys Leu Pro Ser Cys Gln Leu Glu Val  
1 5

10 <210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 9

Ala Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile  
1 5

<210> 10

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 10

Thr Val Ile Glu Asp Cys Asn Lys Val  
1 5

25 <210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 11

Lys Ile Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu  
1 5

<210> 12

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 12  
 Lys Met Lys Asp Thr Val Gln Lys Leu  
 1 5  
 <210> 13  
 <211> 9  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 13  
 Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu  
 1 5  
 15 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 14  
 Lys Ile Asp Glu Lys Thr Ala Glu Leu  
 1 5  
 <210> 15  
 25 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 30 <400> 15  
 Lys Ile Asn Lys Lys His Glu Asp Val  
 1 5  
 <210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 35 <213> Artificial

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 16  
 Lys Leu Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu  
 1 5

5 <210> 17  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>

10 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 17  
 Phe Leu Pro Phe Ser Asn Leu Val Thr  
 1 5

<210> 18  
 <211> 9

15 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 18

20 Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu  
 1 5

<210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 19

Ile Leu Cys Pro Lys Ala Lys Arg Thr  
 1 5

<210> 20

30 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

35 <400> 20

Val Leu His Met Ile Tyr Met Arg Ala  
 1 5  
 <210> 21  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 21  
 Leu Leu Val Val Ser Leu Lys Glu Ile  
 1 5  
 10 <210> 22  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 22  
 Lys Leu Leu Val Val Ser Leu Lys Glu Ile  
 1 5 10  
 <210> 23  
 <211> 10  
 20 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 23  
 Arg Leu Asn Glu Leu Lys Leu Leu Val Val  
 1 5 10  
 <210> 24  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 24  
 Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu  
 1 5 10  
 <210> 25

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 25  
 Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu  
 1                    5                    10  
 <210> 26  
 <211> 10  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 26  
 Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu  
 1                    5                    10  
 <210> 27  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 27  
 Met Ile Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val  
 1                    5                    10  
 <210> 28  
 25 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 30 <400> 28  
 Lys Leu Gly Ile Gln Gln Leu Lys Asp Ala  
 1                    5                    10  
 <210> 29  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 35 <213> Artificial

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 29  
 Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu  
 1                    5                    10

5 <210> 30  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>

10 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 30  
 Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu  
 1                    5                    10

<210> 31  
 <211> 10

15 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 31

20 Ile Leu Thr Gly Ala Asp Gly Lys Asn Leu  
 1                    5                    10

<210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 32  
 Ser Leu Asn Gln Asp Phe His Gln Lys Thr  
 1                    5                    10

<210> 33

30 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

35 <400> 33

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

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 34

Val Leu His Met Ile Tyr Met Arg Ala Leu  
1 5 10

10 <210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 35

Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Pro Glu Val  
1 5 10

<210> 36

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 36

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

25 <210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 37

Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val Met  
1 5 10

<210> 38

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 38  
 Gln Leu Asn Ala Ala His Gln Glu Ala Leu  
 1                    5                    10  
 <210> 39  
 <211> 10  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 39  
 Arg Leu Glu His Phe Tyr Met Met Pro Val  
 1                    5                    10  
 <210> 40  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 40  
 Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu Ala  
 1                    5                    10  
 <210> 41  
 25 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 30 <400> 41  
 Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys Met  
 1                    5                    10

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en:
  - (A) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2;
  - 5 (B) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados, y/o añadidos, y en el que el péptido muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos); y
  - (C) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2.
2. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido se selecciona del grupo que consiste en:
  - (A) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2; y
  - 10 (B) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados, y/o añadidos, y en el que el péptido muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos).
3. El péptido de la reivindicación 1 ó 2, en el que el segundo aminoácido del término N es leucina o metionina.
4. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el aminoácido C-terminal es valina o leucina.
- 15 5. Una vacuna para uso en la inducción de inmunidad frente a cáncer que expresa CDCA1, que comprende uno o más péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como ingrediente activo.
6. Una vacuna para uso en el tratamiento y/o prevención de cáncer que expresa CDCA1, que comprende uno o más péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como ingrediente activo.
- 20 7. Una vacuna para uso en la inducción de una célula presentadora de antígeno que muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos), en el que dicha vacuna comprende uno o más péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como ingrediente activo.
8. Una vacuna para uso en la inducción de una célula presentadora de antígeno que muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos), en el que dicha vacuna comprende uno o más polinucleótidos que codifican los péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como ingrediente activo.
- 25 9. Una vacuna para uso en la inducción de un linfocito T citotóxico (asesino), en el que dicha vacuna comprende uno o más péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como ingrediente activo.
10. Un anticuerpo contra el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
11. Un linfocito T cooperador, un linfocito T citotóxico (asesino), o una población inmunocítica que los comprende, que es inducido usando el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 12. Una célula que presenta antígeno que presenta un complejo que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un antígeno HLA.
13. La célula que presenta antígeno de la reivindicación 12, que es inducida por la vacuna de la reivindicación 7 u 8.
14. Un exosoma que presenta un complejo que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un antígeno HLA.
- 35 15. El exosoma de la reivindicación 14, en el que el antígeno HLA es HLA-A2 (HLA-A\*0201).
16. Un método in vitro para inducir una célula presentadora de antígeno que muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos), que comprenden la etapa de poner en contacto una célula presentadora de antígeno con el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 40 17. Un método in vitro para inducir una célula presentadora de antígeno que muestra actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (asesinos), que comprende la etapa de introducir un polinucleótido que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una célula presentadora de antígeno.
18. Un método in vitro para inducir un linfocito T citotóxico (asesino), que comprende la etapa de cocultivar una célula presentadora de antígeno puesta en contacto con el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un linfocito T CD8+.
- 45 19. Uso del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un agente para inducir inmunidad frente a cáncer que expresa CDCA1.

20. Uso del péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un agente para tratar y/o prevenir cáncer que expresa CDCA1.
21. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en la inducción de inmunidad frente a cáncer que expresa CDCA1.
- 5 22. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento y/o prevención de cáncer que expresa CDCA1.
- 10 23. La vacuna de la reivindicación 5 ó 6, o el uso de la reivindicación 19 ó 20, o el péptido de la reivindicación 21 ó 22, en el que dicho cáncer que expresa CDCA1 se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, carcinoma colangiocelular, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, leucemia mielogenosa crónica, linfoma maligno, cáncer de cuello uterino, osteosarcoma, cáncer de mama, sarcoma de tejidos blandos, y cáncer de colon.

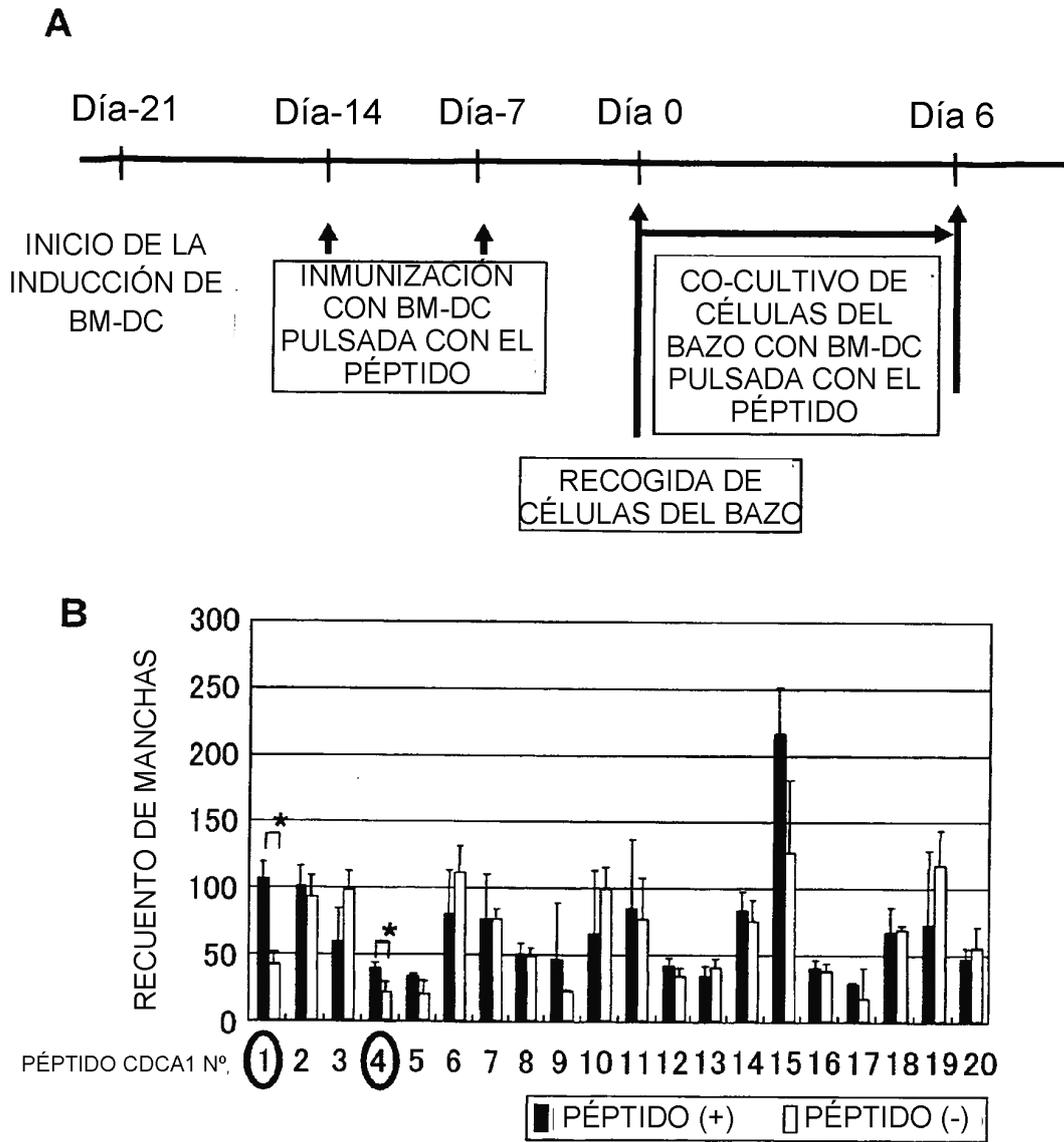


FIG. 1

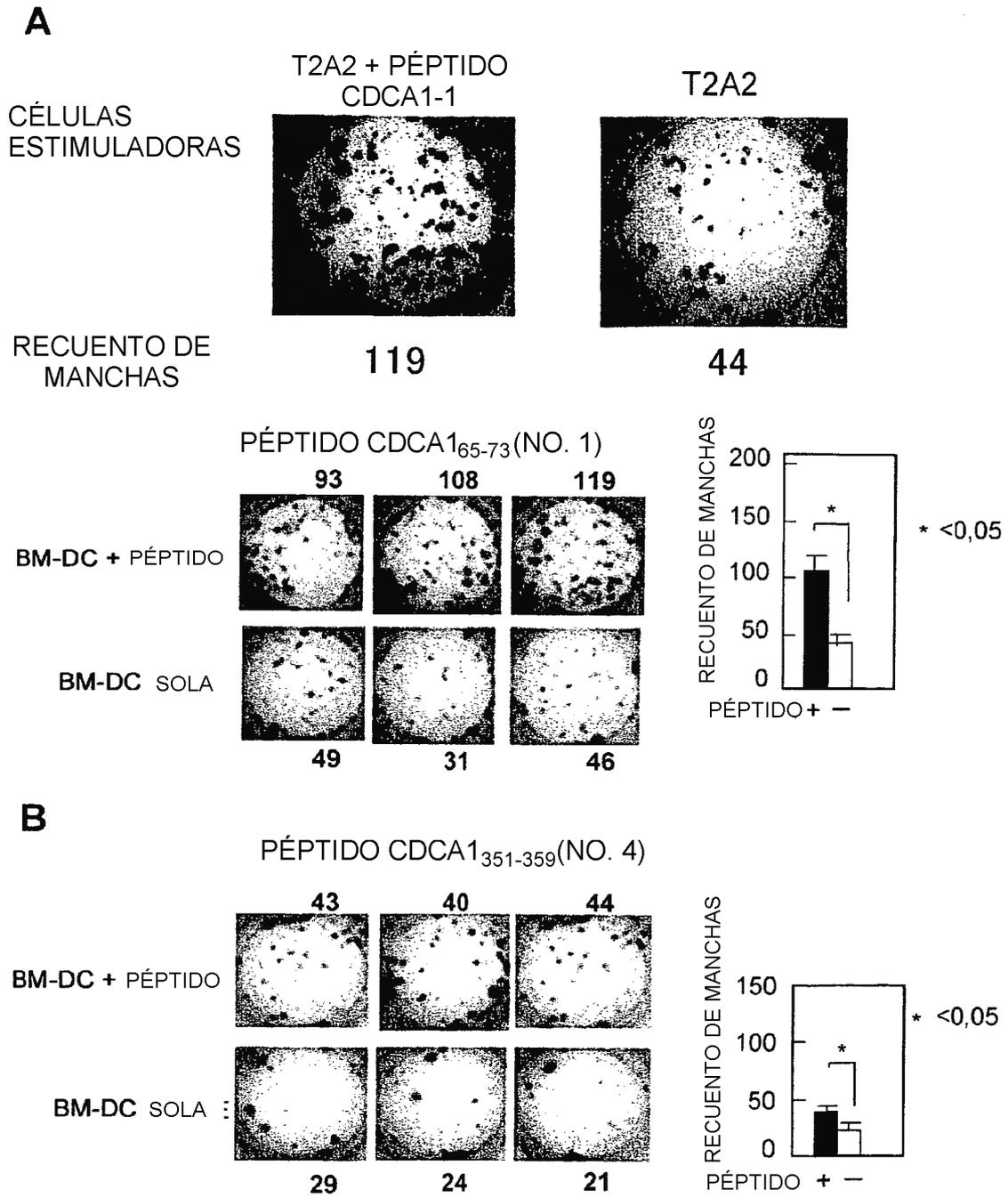


FIG. 2

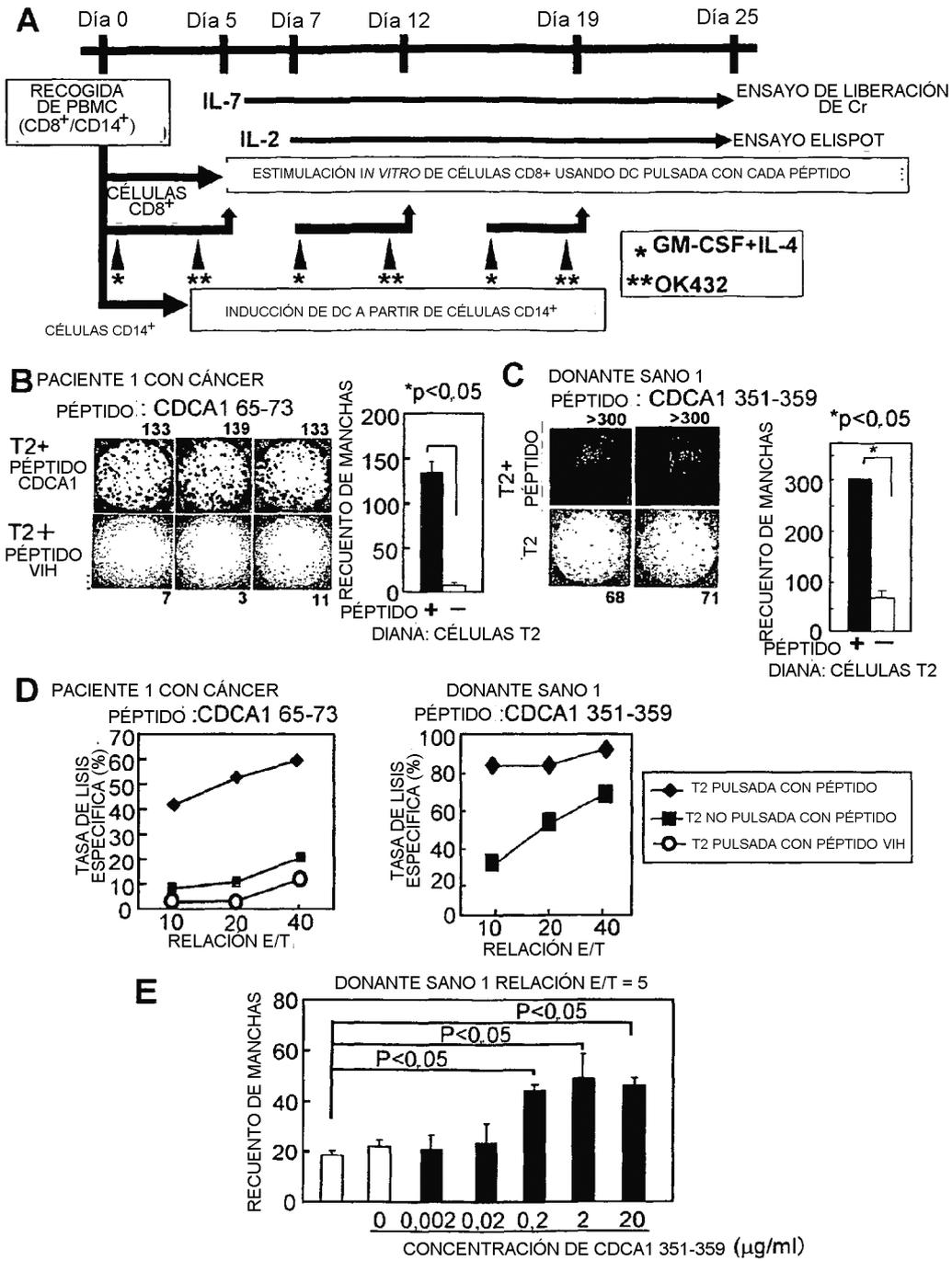


FIG. 3

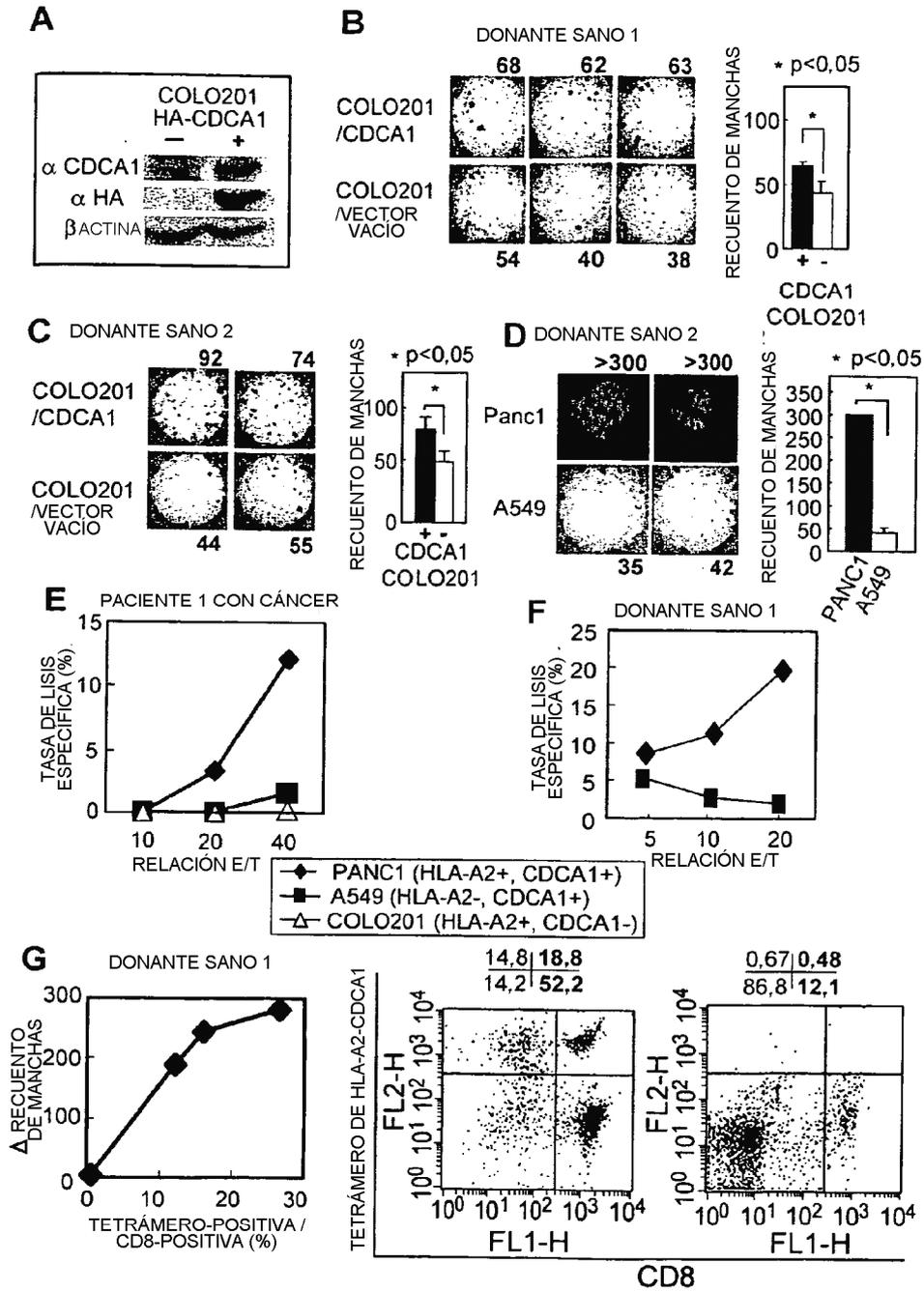


FIG. 4