(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 541 325**

(51) Int. CI.:

C12N 9/14 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2009 E 09821762 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2362906**

(54) Título: **Péptido de epítopo RAB6KIFL/KIF20A y vacunas que contienen el mismo**

(30) Prioridad:

22.10.2008 US 197106 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2015

(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;
IMAI, KATSUNORI;
NAKAMURA, YUSUKE y
TSUNODA, TAKUYA

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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 de epítopo RAB6KIFL/KIF20A y vacunas que contienen el mismo

Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de las ciencias biológicas, más específicamente al campo de la terapia contra el cáncer. En particular, la presente invención se refiere a nuevos oligopéptidos y al uso de los mismos.

Técnica anterior

Se ha demostrado que los CTLs positivos para CD8 reconocen péptidos de epítopo obtenidos a partir de los antígenos asociados a tumores (AATs) que se encuentran en una molécula de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y a continuación destruyen las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia de antígenos de melanoma (MAGE) como primer ejemplo de AATs, se han descubierto muchos otros AATs, principalmente a través de metodologías inmunológicas (NPL 1: Boon T, Int J Cancer 8 de Mayo 1993, 54(2): 177-80; NPL 2: Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1 de Mar 1996, 183(3): 725-9). Algunos de los AATs están experimentando actualmente un desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas.

La identificación de nuevos AATs, capaces de inducir respuestas inmunes antitumorales potentes y específicas, garantiza un desarrollo y una aplicación clínica adicionales a las estrategias de vacunación con péptidos para varios tipos de cáncer (NPL 3: Harris CC, J Natl Cancer Inst 16 de Oct 1996, 88(20): 1442-55; NPL 4: Butterfield LH et al., Cancer Res 1 de Jul 1999, 59(13): 3134-42; NPL 5: Vissers JL et al., Cancer Res 1 de Nov 1999, 59(21): 5554-9; NPL 6: van der Burg SH et al., J Immunol 1 de Mayo 1996 1, 156(9): 3308-14; NPL 7: Tanaka F et al., Cancer Res 15 de Oct 1997, 57(20): 4465-8; NPL 8: Fujie T et al., Int J Cancer 18 de Ene 1999, 80(2): 169-72; NPL 9: Kikuchi M et al., Int J Cancer 5 de Mayo 1999 5, 81(3): 459-66; NPL 10: Oiso M et al., Int J Cancer 5 de Mayo 1999, 81(3): 387-94). Hasta la fecha, ha habido varios informes de ensayos clínicos que emplean estos péptidos obtenidos a partir de antígenos asociados a tumores. Por desgracia, hasta el momento, solo se ha observado una tasa de respuesta objetiva baja en estos ensayos de vacunas contra el cáncer (NPL 11: Belli F et al., J Clin Oncol 15 de Oct 2002, 20(20): 4169-80; NPL 12: Coulie PG et al., Immunol Rev Oct de 2002, 188: 33-42; NPL 13: Rosenberg SA et al., Nat Med Sep 2004, 10(9): 909-15).

Recientemente, se ha podido predecir la secuencia de los péptidos que se unen a la clase I del HLA, utilizando algoritmos (NPL 14: Journal of Immunological Methods, (1995), vol. 185, págs. 181-190, NPL 15: J. Immunol., (1994), vol. 152, págs.163-175, NPL 16: protein science, (2000), vol. 9, págs. 1838-1846). Sin embargo, resulta difícil afirmar que el péptido del epítopo previsto se puede procesar de forma natural en las células diana y expresar en la superficie de la célula diana con la molécula de HLA. Por otra parte, el algoritmo, por ejemplo BIMAS (http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) (NPL 17: Parker KC, et al, (1994) J Immunol; 152(1): 163-75; NPL 18: Kuzushima K, et al, (2001) Blood; 98(6): 1872-81)) puede sugerir el péptido que se une a la molécula de HLA, pero el péptido sugerido no es tan riguroso (NPL 19: Bachinsky MM, et. al., Cancer Immun. Mar 2005 22;5:6). Por tanto, la detección de AATs sigue siendo un desafío que tiene muchas dificultades.

El cáncer de páncreas tiene un pronóstico desfavorable, con una tasa global de supervivencia a los 5 años de aproximadamente el 5% (1). Una resección quirúrgica sigue siendo la única opción para conseguir una supervivencia a largo plazo, pero los pacientes con cáncer de páncreas que se pueda extirpar son una minoría (9-22%) (NPL 20: Sener S F, et al. J Am Coll Surg 1999; 189:1-7, NPL 21: Eloubeidi M A, et al. Am J Surg 2006; 192:322-9, NPL 22: Goonetilleke K S, et al. Int J Surg 2007; 5:147-51). Sin embargo, incluso en estos pacientes, la tasa de supervivencia a los 5 años se mantiene aproximadamente en el 20%, a pesar de la cirugía con fines curativos (NPL 23: Smeenk H G, et al. Langenbecks Arch Surg 2005; 390:94-103, NPL 24: Yeo C J, et al. Ann Surg 1995; 221:721-31). Hasta el 80% de los pacientes presentan una enfermedad avanzada localmente o metastásica, y su supervivencia media oscila entre 6 a 9 meses (NPL 25: Lockhart A C, et al. Gastroenterology 2005; 128:1642-54). Por lo tanto, el desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas es un tema de gran importancia, y la inmunoterapia puede ser un tratamiento potencial para el cáncer de páncreas.

RAB6KIFL (KIF20A) fue identificado por primera vez por tener un papel en la dinámica del aparato de Golgi a través de una interacción directa con la GTPasa pequeña Rab6 (NPL 26: Echard A, et al Science 1998; 279:580-5). RAB6KIFL pertenece a la superfamilia de las quinesinas que son proteínas motoras que tienen funciones decisivas en el tránsito de moléculas y orgánulos (NPL 26: Echard A, et al. Science 1998; 279:580-5, NPL 27: Hirokawa N, et al. Curr Opin Cell Biol 1998; 10:60-73, NPL 28: Allan VJ y Schroer TA. Curr Opin Cell Biol 1999; 11: 476-82). Recientemente, Taniuchi K et al. han reportado que RAB6KIFL se hiperexpresaba en tejidos cancerígenos del páncreas (NPL 29: Taniuchi K, et al Cancer Res 2005; 65:105-12). Encontraron evidencias de un papel decisivo de RAB6KIFL en la carcinogénesis pancreática.

A través del análisis del perfil de expresión génica, usando una micromatriz de ADNc de todo el genoma que contenía 23.040 genes, se ha mostrado recientemente que RAB6KIFL (KIF20A) está regulado al alza en varios tipos de cáncer, tales como el cáncer de vejiga (PTL 1: documento WO2006/085684), el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) (PTL 2: documento WO2007/013665) y el cáncer de próstata refractario a hormonas (CPRH) (PTL 3: documento WO2008/102906). Además, también se han identificado algunos péptidos de epítopos de productos

génicos de KIF20A (PTL 4: documento WO2008/102557).

Lista de citas – Bibliografía de Patentes

[PTL 1] WO2006/085684

[PTL 2] WO2007/013665

[PTL 3] WO2008/102906

[PTL 4] WO2008/102557

Bibliografía que no es de Patentes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[NPL 14] Journal of Immunological Methods, (1995), vol. 185, págs.181-190

[NPL 15] J. Immunol., (1994), vol.152, págs. 163-175

[NPL 16] protein science, (2000), vol.9, págs. 1838-1846

[NPL 17] Parker KC, et al., (1994) J Immunol; 152(1):163-75.

[NPL 18] Kuzushima K, et al., (2001) Blood; 98(6):1872-81.

[NPL 19] Bachinsky MM. et. al., Cancer Immun. Mar 2005 22; 5:6.

[NPL 20] Sener S F, et al. J Am Coll Surg 1999; 189:1-7.

[NPL 21] Eloubeidi M A, et al. Am J Surg 2006; 192:322-9.

[NPL 22] Goonetilleke K S, et al. Int J Surg 2007; 5:147-51.

[NPL 23] Smeenk H G, et al. Langenbecks Arch Surg 2005; 390:94-103.

[NPL 24] Yeo C J, et al. Ann Surg 1995; 221:721-31.

[NPL 25] Lockhart A C, et al. Gastroenterology 2005; 128:1642-54.

[NPL 26] Echard A, et al. Science 1998; 279:580-5.

[NPL 27] Hirokawa N, et al. Curr Opin Cell Biol 1998; 10:60-73.

[NPL 28] Allan VJ, y Schroer TA. Curr Opin Cell Biol 1999; 11:476-82.

[NPL 29] Taniuchi K, et al. Cancer Res 2005; 65:105-12.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de nuevas dianas para la inmunoterapia. Debido a que los AATs tienen frecuentemente una falta de inmunogenicidad, el descubrimiento de dianas adecuadas es de extrema importancia. En particular, la invención se dirige a RAB6KIFL (SEQ ID NO: 2) codificado por el gen de GenBank con nº de orden AF153329 o CR598555, también indicado como NM_005733 (SEQ ID NO: 1)), ya que RAB6KIFL ha sido identificado por estar hiperregulado en varios tipos de cáncer, tales como cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP). La presente invención proporciona productos génicos de RAB6KIFL que contienen péptidos de epítopos que provocan una respuesta sorprendentemente fuerte de los CTLs que es específica de las moléculas correspondientes. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) obtenidas a partir de un donante sano se estimularon usando los péptidos de la presente invención. La presente invención proporciona además CTLs establecidos que reconocen específicamente células diana positivas para HLA-A2 (A*0201) sometidas a impulsos con los péptidos respectivos, y péptidos de epítopos restringidos por HLA-A2 (A*0201) que pueden inducir respuestas inmunes potentes y específicas contra RAB6KIFL expresado en un tumor. Estos resultados demuestran que RAB6KIFL es fuertemente inmunógeno y los epítopos del mismo son dianas eficaces para la inmunoterapia tumoral. En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar oligopéptidos que tienen capacidad de inducir CTLs así como una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo de SEQ ID NOs: 3, 4 y 5. Además, en otra realización de la presente invención, uno o dos aminoácidos se pueden sustituir, delecionar, insertar y/o añadir, siempre que los oligopéptidos modificados resultantes conserven la capacidad de inducir CTLs de los péptidos originales.

Cuando se administran a un sujeto, los presentes oligopéptidos se presentan en la superficie de células que expresan el antígeno y luego inducen CTLs que se dirigen a los péptidos respectivos. Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar células presentadoras de antígeno y exosomas que presentan cualquiera de los presentes péptidos, así como métodos para la inducción de células presentadoras de antígeno.

Una respuesta inmune antitumoral se induce mediante la administración de los presentes oligopéptidos RAB6KIFL o polinucleótidos que codifican los oligopéptidos, así como exosomas y células presentadoras de antígeno que presentan los oligopéptidos RAB6KIFL. Por lo tanto, es aún otro objeto de la presente invención proporcionar agentes farmacéuticos o una composición farmacéutica que contiene los oligopéptidos o polinucleótidos que los codifican, así como los exosomas y las células presentadoras de antígeno como sus ingredientes activos. Los agentes farmacéuticos o las composiciones farmacéuticas de la presente invención tienen uso como vacunas. Además, es un objeto adicional de la presente descripción proporcionar métodos para el tratamiento y/o la profilaxis (es decir, la prevención) de cánceres (tumores), y/o la prevención de la recurrencia postoperatoria de los mismos, así como métodos para inducir CTLs, métodos para inducir inmunidad antitumoral, incluyendo tales métodos la etapa de administrar los oligopéptidos RAB6KIFL, polinucleótidos que codifican oligopéptidos RAB6KIFL, exosomas o células presentadoras de antígeno que presentan polipéptidos RAB6KIFL o los agentes farmacéuticos de la presente invención. Además, los CTLs de la presente invención también tienen uso como vacunas contra el cáncer. Ejemplos de cánceres que son objeto incluyen, pero no se limitan a cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP). Se ha de entender que tanto el compendio anterior de la presente invención como la siguiente descripción detallada son realizaciones ejemplificadas, y no son restrictivas de la invención o de otras realizaciones alternativas de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Diversos aspectos y aplicaciones de la presente invención serán evidentes para el experto en la técnica después de considerar la breve descripción de las figuras y la descripción detallada de la presente invención y sus realizaciones preferidas que son del modo siguiente:

[fig.1] La Figura 1 representa una expresión mejorada de forma marcada y frecuente del ARNm de RAB6KIFL en tejidos de cáncer de páncreas, basándose en un análisis con micromatrices de ADNc. A representa una lista de genes regulados al alza en células de cáncer de páncreas. Estos genes se hiperexpresaban en células cancerígenas en comparación con sus homólogos normales. La expresión del ARNm de RAB6KIFL en células cancerígenas de páncreas se mejoró notablemente en los 6 pacientes con cáncer pancreático. B representa la proporción de expresión relativa del gen RAB6KIFL en tejidos normales, basándose en un análisis con micromatrices de ADNc. El gen RAB6KIFL se expresaba débilmente solo en el testículo y el timo. C representa el nivel de expresión del gen RAB6KIFL que también se había mejorado en muchos cánceres de pulmón y de vejiga, así como en cáncer de páncreas basándose en el anterior análisis con micromatrices de ADNc.

[fig.2] La Figura 2 representa los análisis del ARNm de RAB6KIFL expresado en tejidos humanos normales, líneas celulares cancerígenas y tejidos cancerígenos. A representa la expresión del ARNm de RAB6KIFL que se investigó en varios tejidos normales mediante el uso de análisis con RT-PCR. El ARNm de RAB6KIFL se expresó débilmente solo en los testículos. B representa el análisis con RT-PCR de la expresión de RAB6KIFL en diversas líneas celulares cancerígenas. C representa el análisis RT-PCR de la expresión de RAB6KIFL en tejidos tumorales pancreáticos (T), y sus homólogos normales (N). La expresión del gen RAB6KIFL se detectó en 5 de 8 tejidos de cáncer de páncreas. En contraste, se detectó poca expresión en sus homólogos

normales.

[fig.3] La Figura 3 muestra la hiperexpresión específica de cáncer pancreático de la proteína RAB6KIFL detectada mediante análisis de transferencia Western. A representa que la proteína RAB6KIFL no se detectaba en ocho tejidos normales, mientras que el testículo proporcionaba una banda débil que tenía una movilidad similar a la observada en el lisado de células PANC1. B representa que, en dos pacientes con cáncer de páncreas, se detectó la proteína RAB6KIFL en tejidos cancerígenos (T), pero no en los tejidos normales adyacentes (N). También se realizó una transferencia anti-beta-actina para supervisar una igualdad de la carga de proteína.

[fig.4] La Figura 4 representa análisis inmunohistoquímicos de la proteína RAB6KIFL en cáncer de páncreas (A) y varios tejidos normales (B). A representa una fuerte tinción de RAB6KIFL que se observó principalmente en el citoplasma y los núcleos de células cancerígenas en 6 de 9 casos, mientras que se observó una tinción muy débil en las células acinares y en el epitelio ductal normal de tejidos normales adyacentes al páncreas. Se observó una fuerte tinción similar en los focos metastásicos del peritoneo. Se detectó poca tinción en la pancreatitis con formación de tumor. B representa que RAB6KIFL no se había teñido en el cerebro, pulmón, hígado, riñón, estómago, intestino delgado, colon, bazo, músculo esquelético, piel y timo normales. Una posible tinción débil se observó en los testículos. Señales de tinción positiva se muestran en color marrón. Las barras de la escala representan 100 micrómetros.

[fig.5] La Figura 5 representa la identificación de epítopos de CTLs de ratón restringidos por HLA-A2, de RAB6KIFL humano mediante el uso de Tgm (ratones transgénicos) HLA-A2.1 (HHD). A representa que los Tgm HLA-A2.1 (HHD) fueron inmunizados con 5 x 10^5 BM-DCs singénicas sometidas a impulsos con los doce conjuntos de la mezcla de tres tipos de péptidos seleccionados a partir de 36 péptidos candidatos *in vivo*, el día 7 y 14. El día 21, células de bazo CD4- aisladas a partir de ratones inmunizados se estimularon con BM-DCs sometidas a impulsos con cada péptido durante 6 días. El IFN-gamma producido por CTLs se detectó mediante un ensayo ELISPOT. Los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 (SEQ ID NO: 3), RAB6KIFL-A2-9-809 (SEQ ID NO: 4) y RAB6KIFL-A2-10-284 (SEQ ID NO: 5) mostraron que inducen CTLs reactivos con el péptido. Estos ensayos se realizaron dos veces con resultados similares. B representa la tinción inmunohistoquímica con AcMos anti-CD4 o anti-CD8 en muestras de tejido de Tgm HLA-A2 (HHD), inmunizados con el péptido RAB6KIFL-A2-9-809. Después de dos vacunaciones, estas muestras se extirparon y se analizaron.

[fig.6A-B] La Figura 6 representa la inducción de CTLs humanos específicos de RAB6KIFL procedentes de las PBMCs de donantes sanos positivos para HLA-A2. A representa que los CTLs reactivos con el péptido RAB6KIFL se generaron a partir de las PBMCs de donantes sanos positivos para HLA-A2. Después de tres estimulaciones con CDs autólogas, derivadas de monocitos sometidas a impulsos con el péptido RAB6KIFL-A2-9-12 (SEQ ID NO: 3), RAB6KIFL-A2-9-809 (SEQ ID NO: 4) y RAB6KIFL-A2-10-284 (SEQ ID NO: 5), la citotoxicidad de los CTLs frente a las células T2 (HLA-A2+, carente de TAP), sometidas a impulsos con cada péptido o células T2 no sometidas a impulsos con péptidos, se detectó mediante un ensayo convencional de liberación de ^{51}Cr. Estos CTLs mostraron citotoxicidad frente a células T2 sometidas a impulsos con péptido RAB6KIFL-A2-9-12 (izquierda), RAB6KIFL-A2-9-809 (centro) y RAB6KIFL-A2-10-284 (derecha), pero no frente a péptido irrelevante de VIH y células T2 no sometidas a impulsos con péptido. B representa que estos CTLs mostraban citotoxicidad frente a la línea celular de cáncer pancreático humano PANC1 RAB6KIFL+ HLA-A2 (A*0201)+ y la línea celular de cáncer de colon Caco-2, pero no frente a la línea celular de cáncer pancreático humana RAB6KIFL+ PK8 HLA-A2 (A*0201)$^-$.

[fig.6C-D] C representa que la citotoxicidad de estos CTLs era específica de RAB6KIFL. Estos CTLs destruyeron SKHep1/RAB6KIFL, una línea celular de cáncer de hígado humano RAB6KIFLlcnv HLA-A2+, SKHep1 transfectada con el gen RAB6KIFL humano, pero no destruyeron SKHep1/simulado. D representa la inhibición de la citotoxicidad mediante un AcMo anti-HLA de clase I. Después de incubar las células diana PANC1 con AcMo anti-HLA de clase I (W6/32, IgG_{2a}) o AcMo anti-HLA-DR (H-DR-1, IgG_{2a}), respectivamente, durante 1 hora, se añadieron los CTLs generados a partir de las PBMCs de donante sano mediante estimulación con péptido RAB6KIFL-A2-9-12 (superior), RAB6KIFL-A2-9-809 (centro) y RAB6KIFL-A2-10-284 (inferior). Las producciones de IFN-gamma se inhibieron de forma marcada con W6/32, pero no con H-DR-1.

Descripción de las realizaciones

Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o en el ensayo de realizaciones de la presente invención, a continuación se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

I. Definiciones

Las palabras "un", "una" y "el, la" tal y como se emplean en esta memoria, significan "al menos uno" a menos que se indique de otro modo específicamente.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más

residuos de aminoácidos son un residuo modificado, o un residuo de origen no natural, tal como un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural.

El término "oligopéptido" empleado a veces en la presente memoria descriptiva, se utiliza para referirse a péptidos de la presente invención que tienen 20 residuos o menos de longitud, típicamente 15 residuos o menos y consisten habitualmente en aproximadamente 8 y aproximadamente 11 residuos, frecuentemente 9 o 10 residuos.

El término "aminoácido" tal y como se utiliza en esta memoria se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los modificados después de la traducción en las células (por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina). La expresión "análogo de aminoácido" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica (un carbono alfa unido a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) que un aminoácido de origen natural, pero que tienen un grupo R modificado o cadenas principales modificadas (por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metionina metil sulfonio). La expresión "mimético de aminoácido" se refiere a compuestos químicos que tienen diferentes estructuras, pero funciones similares a los aminoácidos generales.

Se puede hacer referencia a los aminoácidos en la presente memoria por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra, recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de IUPAC-IUB.

Los términos "gen", "polinucleótidos", "nucleótidos" y "ácidos nucleicos" se usan indistintamente en el presente documento a menos que se indique lo contrario específicamente y, de manera similar a los aminoácidos, se hace referencia a los mismos por sus códigos de una sola letra aceptados comúnmente.

A menos que se defina de otro modo, el término "cáncer" se refiere a cánceres que hiperexpresan el gen RAB6KIFL. Ejemplos de cánceres que hiperexpresan RAB6KIFL incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP).

A menos que se defina de otro modo, la expresión "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" se usan indistintamente en el presente documento y, a menos que indique específicamente otra cosa, se refiere a un subgrupo de linfocitos T que son capaces de reconocer células no propias (por ejemplo, células tumorales, células infectadas por virus) e inducir la destrucción de tales células.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.

II. Péptidos

Para demostrar que los péptidos obtenidos a partir de RAB6KIFL actúan como un antígeno reconocido por los linfocitos T citotóxicos (CTLs), péptidos obtenidos a partir de RAB6KIFL (SEQ ID NO: 2) se analizaron para determinar si eran epítopos de antígenos restringidos por HLA-A2 (A*0201) que se encuentran comúnmente en alelos HLA (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994). Los candidatos a péptidos que se unen a HLA-A2 obtenidos a partir de RAB6KIFL, se identificaron utilizando la información sobre sus afinidades de unión a HLA-A2. Después de una estimulación *in vitro* de linfocitos T a través de células dendríticas (CDs) cargadas con estos péptidos, los CTLs se establecieron con éxito utilizando cada uno de los péptidos, en particular, los péptidos siguientes:

RAB6KIFL-A2-9-12 (SEQ ID NO: 3),
RAB6KIFL- A2-9-809 (SEQ ID NO: 4)
y
RAB6KIFL-A2-10-284 (SEQ ID NO: 5).

Estos CTLs establecidos muestran una potente actividad CTL específica contra células diana sometidas a impulsos con péptidos respectivos. Los resultados en el presente documento muestran que RAB6KIFL es un antígeno reconocido por CTL y que los péptidos pueden ser péptidos de epítopos de RAB6KIFL restringidos por HLA-A2 (A*0201).

Dado que el gen RAB6KIFL está hiperexpresado en la mayoría de los tejidos cancerígenos, tales como cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), es una diana adecuada para la inmunoterapia. Por lo tanto, la presente invención proporciona oligopéptidos tales como nonapéptidos (péptidos que consisten en nueve residuos de aminoácidos) y decapéptidos (péptidos que consisten en diez residuos de aminoácidos) que se corresponden a epítopos de RAB6KIFL reconocidos por CTLs. Ejemplos particularmente preferidos de oligopéptidos de la presente invención incluyen aquellos péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 3, 4 y 5.

Generalmente, los programas informáticos disponibles en la actualidad en Internet, tales como los descritos en Parker KC et al, J Immunol 1 de Ene 1994, 152(1):163-75, se pueden utilizar para calcular las afinidades de unión entre diversos péptidos y antígenos del HLA *in silico*. La afinidad de la unión con antígenos del HLA se puede medir como se ha descrito, por ejemplo, en Parker KC et al, J Immunol 1 de Ene 1994, 152(1): 163-75; y Kuzushima K et al, Blood 2001, 98(6): 1872-1881. Los métodos para determinar la afinidad de la unión se describen, por ejemplo, en; Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190; Protein Science, 2000, 9: 1838-1846. Por lo tanto, la presente invención abarca péptidos de RAB6KIFL que se determinan por unirse con antígenos del HLA a través de tales programas conocidos.

Además, estos péptidos de la presente invención pueden estar flanqueados con residuos de aminoácidos adicionales, siempre que el péptido conserve su capacidad de inducción de CTLs. Tales péptidos con capacidad de inducción de CTLs tienen, por ejemplo, menos de aproximadamente 40 aminoácidos, frecuentemente menos de aproximadamente 20 aminoácidos, usualmente menos de aproximadamente 15 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos que flanquea los péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo de SEQ ID NOs: 3, 4 y 5 no está limitada y puede estar compuesta por cualquier tipo de aminoácidos siempre que no perjudique la capacidad de inducción de CTLs del péptido original. Por tanto, la presente invención también proporciona péptidos que tienen capacidad de inducción de CTLs, que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo de SEQ ID NOs: 3, 4 y 5.

En general, la modificación de uno, dos o varios aminoácidos en una proteína no influirá sobre la función de la proteína, o en algunos casos incluso mejorará la función deseada de la proteína original. De hecho, se sabe que los péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos por una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios residuos de aminoácidos han sido modificados (es decir, sustituidos, eliminados, añadidos y/o insertados) en comparación con una secuencia de referencia original) conservan la actividad biológica del péptido original (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13). Por lo tanto, en una realización, los oligopéptidos de la presente invención pueden tener tanto capacidad de inducción de CTLs como una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo de SEQ ID NOs: 3, 4 y 5 en donde se añaden, insertan, eliminan y/o sustituyen uno o dos aminoácidos. Los expertos en la técnica reconocerán que las adiciones o sustituciones individuales de una secuencia de aminoácidos que altera un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos, tienden a dar como resultado la conservación de las propiedades de la cadena lateral de aminoácidos original. Como tales, se denominan convencionalmente "sustituciones conservadoras" o "modificaciones conservadoras", en donde la alteración de una proteína da como resultado una proteína modificada que tiene propiedades y funciones análogas a la proteína original. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Ejemplos de características de las cadenas laterales de aminoácidos que son deseables conservar incluyen, por ejemplo, aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), y las cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene un grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene un átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene un ácido carboxílico y una amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene una base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene un aromático (H, F, Y, W). Además, los ocho grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que están aceptados en la técnica como sustituciones conservadoras entre sí:

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

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

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);

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

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

Tales péptidos modificados de manera conservadora también se consideran péptidos de la presente invención. Sin embargo, los péptidos de la presente invención no se limitan a los mismos y pueden incluir modificaciones no conservadoras, siempre que el péptido conserve la capacidad de inducción de CTLs del péptido original. Además, los péptidos modificados no deben excluir péptidos de variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de RAB6KIFL que pueden inducir CTLs.

Para conservar la capacidad de inducción de CTLs necesaria, se puede modificar (añadir o sustituir) un pequeño número (por ejemplo, 1 o 2) o un pequeño porcentaje de aminoácidos. El porcentaje de aminoácidos que se va a modificar puede ser del 20% o menos, por ejemplo, 15% o menos, por ejemplo 10% o de 1 a 5%.

Cuando se utilizan en el contexto de la inmunoterapia, los péptidos de la presente invención se deben presentar en la superficie de una célula o exosoma, preferiblemente como un complejo con un antígeno del HLA. Por lo tanto, es preferible seleccionar péptidos que no solo inducen CTLs, sino que también poseen alta afinidad de unión hacia el antígeno del HLA. Para ello, los péptidos pueden estar modificados por sustitución, inserción, deleción y/o adición de los residuos de aminoácidos para producir un péptido modificado que tiene una mejor afinidad de unión. Además de los péptidos que se muestran de forma natural, puesto que la regularidad de las secuencias de los péptidos presentados mediante la unión a antígenos del HLA ya se conoce (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), modificaciones basadas en tal regularidad pueden introducirse en los péptidos inmunógenos de la invención. Por ejemplo, los péptidos que poseen una afinidad de unión elevada hacia HLA-A2 (A*0201) tienen sustituido su segundo aminoácido desde el extremo N-terminal con leucina o metionina y los péptidos tienen su extremo C-terminal sustituido con valina o leucina. Por lo tanto, los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 3, 4 o 5 en donde el segundo aminoácido desde el extremo N-terminal está sustituido con leucina o metionina y/o en donde el extremo C-terminal está sustituido con valina o leucina, están incluidos en la presente invención. Las sustituciones se pueden introducir no solo en los aminoácidos terminales, sino también en la posición de reconocimiento potencial del TCR de los péptidos. Varios estudios han mostrado que las sustituciones de aminoácidos en un péptido pueden ser iguales o mejores que el original, por ejemplo CAP1, p53 $_{(264\text{-}272)}$, Her-2/neu $_{(369\text{-}377)}$ o gp 100 $_{(209\text{-}217)}$ (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) 1 de Feb; 168(3):1338-47, S. O. Dionne et al. Cancer Immunol Immunother. (2003) 52: 199-206 y S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

La presente invención también contempla la adición de aminoácidos a las secuencias descritas en esta memoria. Por ejemplo, uno o dos aminoácidos también se pueden añadir al extremo N y/o C-terminal de los presentes péptidos. También se incluyen en la presente invención tales péptidos modificados que tienen afinidad de unión hacia el antígeno del HLA y una capacidad de inducción de CTLs conservada.

Sin embargo, cuando la secuencia del péptido es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, se pueden inducir efectos secundarios tales como trastornos autoinmunes y/o síntomas alérgicos frente a sustancias específicas. Por lo tanto, es preferible realizar primero búsquedas de homología utilizando bases de datos disponibles para evitar situaciones en las que la secuencia del péptido coincide con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando es evidente por las búsquedas de homología que no existe ningún péptido con solo 1 o 2 diferencias de aminoácidos, en comparación con el péptido objeto, el péptido objeto se puede modificar con el fin de aumentar su afinidad de unión con antígenos del HLA, y/o aumentar su capacidad de inducción de CTLs, sin ningún peligro de tales efectos secundarios.

Aunque se espera que los péptidos que tienen una afinidad de unión alta hacia los antígenos del HLA como se ha descrito anteriormente, sean altamente eficaces, los péptidos candidatos que se seleccionan de acuerdo con la presencia de una afinidad de unión elevada como indicador, se examinan adicionalmente para estudiar la presencia de una capacidad de inducción de CTLs. En este documento, la expresión "capacidad de inducción de CTLs" indica la capacidad del péptido para inducir linfocitos citotóxicos (CTLs) cuando se presenta en las células presentadoras de antígeno. Además, la "capacidad de inducción de CTLs" incluye la capacidad del péptido para inducir la activación de CTLs, proliferación de CTLs, favorecer la lisis de CTLs de las células diana y aumentar la producción de IFN-gamma en los CTLs.

Una confirmación de la capacidad de inducción de CTLs se lleva a cabo induciendo células presentadoras de antígeno que transportan antígenos del MHC humano (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (CDs)), o más específicamente CDs obtenidas a partir de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana, y después de la estimulación con los péptidos, mezclando con células positivas para CD8 y luego midiendo el IFN-gamma producido y liberado por los CTLs contra las células diana. Como sistema de reacción, se pueden utilizar animales transgénicos que han sido producidos para expresar un antígeno del HLA humano (por ejemplo, los descritos en BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol Ago 2000, 61(8): 764-79, artículos relacionados, libros, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response). Por ejemplo, las células diana se pueden radiomarcar con ^{51}Cr y similares, y la actividad citotóxica se puede calcular a partir de la radiactividad liberada desde las células diana. Alternativamente, la capacidad de inducción de CTLs se puede evaluar mediante la medición de IFN-gamma producido y liberado por CTLs en presencia de células presentadoras de antígeno (APCs) que son portadoras de péptidos inmovilizados, y visualizar la zona de inhibición en el medio utilizando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

Como resultado del examen de la capacidad de inducción de CTLs de los péptidos descritos anteriormente, se descubrió que aquellos péptidos que tienen alta afinidad de unión hacia un antígeno del HLA, no tenían necesariamente una capacidad elevada de inducción de CTLs. Sin embargo, entre los péptidos identificados y evaluados, los nonapéptidos o decapéptidos seleccionados a partir de péptidos que tenían una secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NOs: 3, 4 y 5, mostraron una capacidad particularmente elevada de inducción de CTLs así como una afinidad de unión elevada hacia un antígeno del HLA. Por lo tanto, estos péptidos se ejemplifican como realizaciones preferidas de la presente invención.

Además de las modificaciones descritas anteriormente, los péptidos de la presente invención también se pueden

ligar a otras sustancias, siempre que el péptido ligado resultante conserve el requisito de capacidad de inducción de CTLs del péptido original. Ejemplos de sustancias adecuadas incluyen, pero no se limitan a: péptidos, lípidos, azúcar y cadenas de azúcar, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glicosilación, oxidación de la cadena lateral o fosforilación, etc., siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Estos tipos de modificaciones se pueden realizar para conferir funciones adicionales (por ejemplo, la función de focalización y la función de entrega) o para estabilizar el polipéptido.

Por ejemplo, para aumentar la estabilidad *in vivo* de un polipéptido, se conoce en la técnica la introducción de D-aminoácidos, miméticos de aminoácidos o aminoácidos no naturales; este concepto también puede estar adaptado a los presentes polipéptidos. La estabilidad de un polipéptido se puede someter a ensayo de varias formas distintas. Por ejemplo, peptidasas y diversos medios biológicos, tales como plasma y suero humano, se pueden utilizar para someter a ensayo la estabilidad (véase, por ejemplo, Verhoef et al, Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

Además, los péptidos de la presente descripción pueden estar ligados a otros péptidos a través de espaciadores o enlazadores. Ejemplos de otros péptidos incluyen, pero no se limitan a, péptidos con capacidad de inducción de CTLs obtenidos a partir de otros AATs. Alternativamente, dos o más péptidos de la presente descripción pueden estar unidos a través de espaciadores o enlazadores. Los péptidos ligados a través de espaciadores o enlazadores pueden ser iguales o diferentes entre sí. Los espaciadores o enlazadores no están limitados específicamente, pero son preferiblemente péptidos, más preferiblemente péptidos que tienen uno o varios sitios de escisión que son capaces de ser escindidos por enzimas tales como proteasas, peptidasas y proteasomas. Ejemplos de enlazadores o espaciadores incluyen, pero no se limitan a: AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Sutmuller et al., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) o uno a varios residuos de lisina (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715). Los péptidos de la presente descripción abarcan los péptidos ligados a otros péptidos a través de espaciadores o enlazadores.

En este documento, los péptidos de la presente invención también se pueden describir como "péptido(s) RAB6KIFL", "polipéptido(s) RAB6KIFL" u "oligopéptido RAB6KIFL".

III. Preparación de péptidos RAB6KIFL

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar usando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar sintéticamente, usando tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar de forma individual o como polipéptidos más largos compuestos de dos o más péptidos. Los péptidos se pueden aislar después, es decir, purificar o aislar de manera que estén sustancialmente exentos de otras proteínas de origen natural de la célula hospedadora y de fragmentos de las mismas, o de cualquier otra sustancia química. Un péptido de la presente invención se puede obtener a través de síntesis química basada en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Ejemplos de métodos convencionales de síntesis peptídica que se pueden adaptar a la síntesis incluyen, pero no se limitan a:

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

Alternativamente, los presentes péptidos se pueden obtener adaptando cualquier método de ingeniería genética conocido para la producción de péptidos (por ejemplo, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss y Curtiss, Methods in Enzymology (compiladores Wu et al.) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, primero, un vector adecuado que contiene un polinucleótido que codifica el péptido objeto en una forma expresable (por ejemplo, aguas abajo de una secuencia reguladora que se corresponde con una secuencia promotora) se prepara y se transforma en una célula hospedadora adecuada. La célula hospedadora se cultiva a continuación, para producir el péptido de interés. El péptido también se puede producir *in vitro* adoptando un sistema de traducción *in vitro*.

IV. Polinucleótidos

La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica cualquiera de los péptidos de la presente invención mencionados anteriormente. Estos incluyen polinucleótidos obtenidos a partir del gen RAB6KIFL/KIF20A de origen natural (GenBank nº de orden NM_005733 (SEQ ID NO: 1)), así como los que tienen una secuencia de nucleótidos de los mismos modificada de forma conservadora. En este documento, la expresión "secuencia de nucleótidos modificada de forma conservadora" se refiere a secuencias que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos

funcionalmente idénticos, codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos ellos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón se puede modificar a cualquiera de los codones correspondientes descritos, sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en este documento que codifica un péptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es generalmente el único codón para metionina, y TGG, que es generalmente el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un péptido, está descrita implícitamente en cada secuencia descrita.

El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto por ADN, ARN y derivados de los mismos. Un ADN está compuesto de forma adecuada por bases tales como A, T, C, y G y T se sustituyen por U en un ARN.

El polinucleótido de la presente invención puede codificar múltiples péptidos de la presente invención con o sin secuencias de aminoácidos intercaladas en el medio. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos intercalada puede proporcionar un sitio de escisión (por ejemplo, una secuencia enzimática de reconocimiento) del polinucleótido o de los péptidos traducidos. Además, el polinucleótido puede incluir cualesquiera secuencias adicionales a la secuencia codificadora que codifica el péptido de la presente invención. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido recombinante que incluye secuencias reguladoras requeridas para la expresión del péptido o puede ser un vector de expresión (plásmido) con genes marcadores y similares. En general, tales polinucleótidos recombinantes se pueden preparar mediante la manipulación de polinucleótidos a través de técnicas recombinantes convencionales usando, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

Tanto las técnicas de síntesis recombinantes como químicas se pueden utilizar para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, un polinucleótido se puede producir mediante la inserción en un vector apropiado, que se puede expresar cuando se transfecta en una célula competente. Alternativamente, un polinucleótido se puede amplificar utilizando técnicas de PCR o la expresión en hospedadores adecuados (véase, por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989). Alternativamente, un polinucleótido se puede sintetizar usando las técnicas de fase sólida, como se describen en Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al, EMBO J 1984, 3: 801-5. Los vectores que contienen el polinucleótido de la presente descripción y células hospedadoras que albergan los vectores, también están incluidos en la presente descripción.

V. Exosomas

La presente invención proporciona además vesículas intracelulares denominadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de esta invención y antígenos del HLA en su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, utilizando los métodos detallados en los documentos de publicaciones de Solicitud de Patente Japonesa Kohyo nº Hei 11-510507 y WO99/03499, y se pueden preparar utilizando APCs obtenidas a partir de pacientes que están sometidos a tratamiento y/o prevención. Los exosomas de esta invención se pueden inocular como vacunas, de una manera similar a los péptidos de esta invención.

El tipo de antígenos del HLA comprendidos en los complejos debe coincidir con el del sujeto que requiere un tratamiento y/o prevención. El uso del tipo HLA-A2 que está altamente expresado entre los japoneses y la raza caucásica es favorable para la obtención de resultados efectivos, y se pueden utilizar subtipos tales como HLA-A2 (A*0201) y HLA-A2 (A*0206). Típicamente, el tipo de antígeno del HLA del paciente que requiere tratamiento, es investigado clínicamente por adelantado, lo que permite la selección apropiada de péptidos que tienen niveles elevados de afinidad de unión hacia este antígeno, o que tienen la capacidad de inducir CTLs mediante presentación de antígenos. Además, con el fin de obtener péptidos que muestran una afinidad de unión elevada y capacidad de inducción de CTLs, se puede realizar la sustitución o adición de 1, 2 o varios aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido parcial RAB6KIFL de origen natural.

Cuando se utiliza el antígeno HLA-A2 (A*0201) para el exosoma de la presente invención, se puede emplear un péptido que tiene la secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 3, 4 y 5.

VI. Células presentadoras de antígeno (APCs)

La presente invención también proporciona APCs aisladas que presentan complejos formados entre los antígenos del HLA y los péptidos de esta invención, sobre su superficie. Las APCs que se obtienen poniendo en contacto los péptidos de esta invención, o introduciendo los polinucleótidos que codifican los péptidos de esta invención de una forma expresable, se pueden obtener a partir de pacientes que son sometidos a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar como vacunas por sí mismas o en combinación con otros fármacos, incluyendo los péptidos de esta invención, exosomas o linfocitos T citotóxicos.

Las APCs no se limitan a un tipo particular de células e incluyen células dendríticas (CDs), células de Langerhans, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T activados, que se conocen por presentar antígenos proteicos en su superficie celular con el fin de ser reconocidos por los linfocitos. Puesto que la CD es una APC representativa que tiene la

mayor acción inductora de CTLs entre las APCs, las CDs se emplean como APCs de la presente invención.

Por ejemplo, una APC se puede obtener mediante la inducción de las CDs a partir de monocitos de sangre periférica y luego poner en contacto (estimular) con los péptidos de esta invención *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Cuando los péptidos de esta invención se administran a los sujetos, las APCs que presentan los péptidos de esta invención son inducidas en el cuerpo del sujeto. La expresión "inducción de APC" incluye poner en contacto (estimular) una célula con los péptidos de esta invención, o los nucleótidos que codifican los péptidos de esta invención para presentar complejos formados entre los antígenos del HLA y los péptidos de esta invención en la superficie de la célula. Alternativamente, después de la introducción de los péptidos de esta invención en las APCs para permitir que las APCs presenten los péptidos, las APCs se pueden administrar al sujeto como una vacuna. Por ejemplo, la administración *ex vivo* puede incluir las etapas de:

a: recoger las APCs a partir de un primer sujeto:

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

c: administrar las APCs cargadas con el péptido a un segundo sujeto. El primer sujeto y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo, o pueden ser individuos diferentes. Alternativamente, de acuerdo con la presente descripción, se proporciona el empleo de los péptidos de esta invención para la preparación de una composición farmacéutica que induce las células presentadoras de antígeno. Además, la presente descripción proporciona un método o un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica para la inducción de células presentadoras de antígeno, en donde el método incluye la etapa de mezclar por adición o de formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, la presente descripción proporciona un método o un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cánceres que incluyen cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), en donde el método incluye la etapa de mezclar por adición o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención también proporciona los péptidos de la presente invención para la inducción de células presentadoras de antígeno. Las APCs obtenidas en la etapa b se pueden administrar al sujeto como una vacuna. Alternativamente, la presente invención proporciona los péptidos para el tratamiento de cánceres que incluyen cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP).

Según un aspecto de la presente descripción, las APCs de la presente descripción tienen un alto nivel de capacidad de inducción de CTLs. En la expresión "alto nivel de capacidad de inducción de CTLs", el alto nivel es en relación con el nivel en la APC puesta en contacto con ningún péptido o con péptidos que no pueden inducir CTLs. Tales APCs que tienen un alto nivel de capacidad de inducción de CTLs se pueden preparar mediante un método que incluye la etapa de transferir genes que contienen polinucleótidos que codifican los péptidos de esta invención, a APCs *in vitro*. Los genes introducidos pueden estar en forma de ADN o ARN. Ejemplos de métodos para la introducción incluyen, sin limitaciones particulares, diversos métodos utilizados convencionalmente en este campo, se pueden utilizar tales como la lipofección, la electroporación y el método de fosfato de calcio. Más específicamente, se puede llevar a cabo tal y como se describe en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; documento de traducción japonesa de publicación internacional nº 2000-509281. Mediante la transferencia del gen en las APCs, el gen se somete a transcripción, traducción y similares en la célula, y luego la proteína obtenida es procesada por el MHC de clase I o clase II, y se continúa a través de una ruta de presentación para presentar los péptidos.

En una realización preferida, las APCs de la presente invención presentan en su superficie un complejo de un antígeno del HLA y un oligopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 3, 4 y 5. Preferiblemente, las APCs de la presente invención son portadoras del antígeno HLA-A2, en particular HLA-A2 (A*0201) en su superficie. Alternativamente, un oligopéptido que va a formar un complejo con un antígeno del HLA, puede ser un oligopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 3, 4 y 5, en donde uno o dos aminoácidos están sustituidos, insertados, delecionados y/o añadidos, por ejemplo, el segundo aminoácido desde el extremo N-terminal puede estar sustituido con leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal puede estar sustituido con valina o leucina.

VII. Linfocitos T citotóxicos (CTLs)

Un linfocito T citotóxico inducido contra cualquiera de los péptidos de la presente invención refuerza la respuesta inmune dirigida contra endotelios asociados a tumores *in vivo* y, por lo tanto, se puede utilizar como vacuna, de una manera similar a los péptidos per se. De este manera, la presente invención también proporciona linfocitos T citotóxicos aislados que se inducen o activan específicamente a través de cualquiera de los presentes péptidos.

Tales linfocitos T citotóxicos se pueden obtener (1) administrándolos a un sujeto, y después recogiendo los linfocitos T citotóxicos del sujeto, o (2) poniendo en contacto (estimulando) las APCs obtenidas a partir del sujeto y las células

positivas para CD8, o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro*, con los péptidos de la presente invención y luego aislando los linfocitos T citotóxicos.

Los linfocitos T citotóxicos, que han sido inducidos por la estimulación de las APCs que presentan los péptidos de esta invención, se pueden obtener a partir de pacientes que están sometidos a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar de forma aislada o en combinación con otros fármacos, incluyendo los péptidos de esta invención o exosomas, con el fin de efectos de regulación. Los linfocitos T citotóxicos obtenidos actúan específicamente contra células diana que presentan los péptidos de esta invención o, por ejemplo, los mismos péptidos utilizados para la inducción. En otras palabras, los linfocitos T citotóxicos pueden reconocer (es decir, unirse a) un complejo formado entre un antígeno del HLA y el péptido de la presente invención sobre la superficie de una célula diana, con el receptor de linfocitos T, y luego atacar a la célula diana para inducir la destrucción de la célula diana. Las células diana pueden ser células que expresan endógenamente RAB6KIFL, o células que han sido transfectadas con el gen RAB6KIFL; y células que presentan un péptido de esta invención en la superficie celular debido a la estimulación con el péptido, también pueden servir como dianas del ataque activado con CTLs. En la realización preferida, las células diana son portadoras del antígeno HLA-A2, en particular HLA-A2 (A*020) en su superficie.

VIII. Receptor de linfocitos T (TCR)

La presente descripción también proporciona una composición compuesta por una secuencia de ácido nucleico que codifica polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de linfocitos T (TCR), y métodos para utilizar la misma. Las cadenas alfa y beta del TCR tienen la capacidad de formar un TCR que confiere a los linfocitos T una especificidad contra células tumorales que expresan RAB6KIFL. Mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, la secuencia de ácido nucleico de las cadenas alfa y beta del TCR expresado en el CTL inducido con uno o varios péptidos de esta invención, se puede aislar y usar para construir vectores adecuados que pueden mediar en una transferencia génica muy eficaz en linfocitos humanos primarios (documento WO2007/032255 y Morgan RA, et al., J Immunol, 171, 3287 (2003)). Por ejemplo, estos vectores son vectores retrovíricos. Ventajosamente, la descripción proporciona una composición lista para usar que permite una modificación rápida de los propios linfocitos T del paciente (o los de otro mamífero) para producir rápida y fácilmente linfocitos T modificados que tienen propiedades excelentes para destruir células cancerígenas. Además, la presente descripción proporciona CTLs que se preparan mediante transducción con los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de las subunidades de TCR que se unen al péptido RAB6KIFL, p. ej., SEQ ID NOs: 3, 4 y 5 en el contexto de HLA-A2 (A*0201). Los CTLs transducidos son capaces de producir una migración dirigida de las células cancerígenas *in vivo*, y se pueden multiplicar por métodos bien conocidos de cultivo *in vitro* (por ejemplo, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Los linfocitos T de la descripción se pueden utilizar para formar una composición inmunógena útil en el tratamiento o la prevención del cáncer en un paciente que requiere una terapia o protección (documento WO2006/031221).

IX. Agentes o composiciones farmacéuticas

Los términos "prevención" y "profilaxis" se utilizan indistintamente en este documento para hacer referencia a cualquier actividad que reduce la carga de la mortalidad o la morbilidad de la enfermedad. La prevención y la profilaxis pueden tener lugar "a niveles de prevención primaria, secundaria y terciaria". Si bien la prevención y la profilaxis primarias evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles secundario y terciario de prevención y profilaxis abarcan las actividades destinadas a la prevención y la profilaxis de la progresión de una enfermedad y la aparición de síntomas, así como la reducción del impacto negativo de una enfermedad ya establecida, restaurando la función y reduciendo las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y la profilaxis pueden incluir una amplia gama de terapias profilácticas dirigidas a aliviar la gravedad del trastorno particular, por ejemplo, reducir la proliferación y la metástasis de tumores.

El tratamiento y/o la profilaxis del cáncer y/o la prevención de una recurrencia postoperatoria del mismo incluyen cualquiera de las siguientes etapas, tales como la extirpación quirúrgica de células cancerígenas, la inhibición del crecimiento de células cancerígenas, la involución o la regresión de un tumor, la inducción de la remisión y supresión de la aparición de un cáncer, la regresión de un tumor y la reducción o la inhibición de una metástasis. Tratar con eficacia y/o la profilaxis de un cáncer disminuye la mortalidad y mejora el pronóstico de individuos que tienen cáncer, disminuye los niveles de marcadores tumorales en sangre y alivia los síntomas detectables que acompañan al cáncer. Por ejemplo, la reducción o la mejoría de los síntomas constituye un tratamiento eficaz y/o la profilaxis incluye 10%, 20%, 30% o más de reducción, o una enfermedad estable. Puesto que la expresión de RAB6KIFL está regulada al alza en varios tipos de cáncer, en comparación con un tejido normal, los péptidos de esta invención o los polinucleótidos que codifican tales péptidos se pueden utilizar para el tratamiento y/o para la profilaxis del cáncer, y/o para la prevención de la recurrencia postoperatoria del mismo. Por lo tanto, la presente invención proporciona un agente o una composición farmacéutica para el tratamiento y/o para la prevención del cáncer, y/o la prevención de la recurrencia postoperatoria del mismo, que incluye uno o varios de los péptidos de esta invención, o los polinucleótidos que codifican los péptidos como un ingrediente activo. Alternativamente, los presentes péptidos pueden ser expresados en la superficie de cualquiera de los exosomas o células anteriores, tales como APCs, para el uso como agentes o composiciones farmacéuticas. Además, los linfocitos T citotóxicos mencionados anteriormente que se dirigen a cualquiera de los péptidos de la presente invención también se pueden usar como el ingrediente activo de los presentes agentes o composiciones farmacéuticas. En el contexto de la presente invención, la expresión "dirigidos a un péptido" se refiere a reconocer (es decir, la unión a) un complejo formado entre un antígeno del HLA y un

péptido en la superficie de una célula diana con el receptor del linfocito T, y luego atacar la célula diana para inducir la destrucción de la célula diana.

En otro aspecto, la presente descripción también proporciona el uso de un ingrediente activo seleccionado entre:

(a) un péptido de la presente invención,

(b) un ácido nucleico que codifica un péptido de este tipo, tal y como se describe en este documento, en una forma expresable,

(c) una APC de la presente invención, y

(d) linfocitos T citotóxicos de la presente invención

en la preparación de una composición o un agente farmacéutico para el tratamiento del cáncer.

Alternativamente, la presente invención proporciona además un ingrediente activo seleccionado entre:

(a) un péptido de la presente invención,

(b) un ácido nucleico que codifica un péptido de este tipo, tal y como se describe en el presente documento, en una forma expresable,

(c) una APC de la presente invención, y

(d) linfocitos T citotóxicos de la presente invención para

uso en el tratamiento del cáncer.

Alternativamente, la presente descripción proporciona además un método o un procedimiento para la preparación de una composición o un agente farmacéutico para tratar el cáncer, en donde el método o el procedimiento incluye la etapa de formular un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable con un ingrediente activo seleccionado entre:

(a) un péptido de la presente invención,

(b) un ácido nucleico que codifica un péptido de este tipo, tal y como se describe en el presente documento, en una forma expresable,

(c) una APC de la presente invención, y

(d) linfocitos T citotóxicos de la presente invención como

ingredientes activos.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona además un método o un procedimiento para la preparación de una composición o un agente farmacéutico para tratar el cáncer, en donde el método o el procedimiento incluye la etapa de mezclar por adición un ingrediente activo con un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable, en donde el ingrediente activo se selecciona entre:

(a) un péptido de la presente invención,

(b) un ácido nucleico que codifica un péptido de este tipo, tal y como se describe en el presente documento, en una forma expresable,

(c) una APC de la presente invención, y

(d) linfocitos T citotóxicos de la presente invención.

Alternativamente, la composición o el agente farmacéutico de la presente invención se puede utilizar tanto para una profilaxis del cáncer como una prevención de la recurrencia postoperatoria del mismo como para ambas.

Los presentes agentes o composiciones farmacéuticas se pueden emplear como una vacuna. En el contexto de la presente invención, la expresión "vacuna" (también referida como composición inmunógena) se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad antitumoral después de su inoculación en animales.

Los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden utilizar para tratar y/o prevenir cánceres, y/o prevenir la recurrencia postoperatoria de los mismos en sujetos o pacientes que incluyen el ser humano y cualquier otro mamífero, incluyendo, pero no limitados a, ratón, rata, cobaya, conejo, gato, perro, oveja, cabra, cerdo, vaca, caballo, mono, babuino y chimpancé, particularmente un animal de importancia comercial o un animal doméstico.

Según la presente invención, se ha encontrado que oligopéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 3, 4 y 5 son péptidos de epítopos restringidos por HLA-A2 (A*0201), que pueden inducir una respuesta inmune potente y específica. Por lo tanto, los presentes agentes o composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de estos oligopéptidos con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 3, 4 o 5, son particularmente adecuados para la administración a sujetos cuyo antígeno del HLA es HLA-A2 (A*0201). Lo mismo se aplica a los agentes o composiciones farmacéuticas que incluyen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos oligopéptidos. Los cánceres que se van a tratar con los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención no están limitados e incluyen todos los tipos de cánceres en los que está implicado RAB6KIFL, incluyendo, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NCPCP), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP). En particular, los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención se aplican preferiblemente al cáncer de páncreas.

Los presentes agentes o composiciones farmacéuticas pueden contener, además de los mencionados ingredientes activos, otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTLs contra las células cancerígenas, otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, o similares. En este documento, los otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTLs contra las células cancerígenas se ejemplifican por antígenos específicos del cáncer (por ejemplo, AATs identificados), pero no se limitan a los mismos. Si es necesario, los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como ingrediente activo, siempre y cuando la sustancia no inhiba el efecto antitumoral del ingrediente activo, por ejemplo, cualquiera de los presentes péptidos. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir agentes o composiciones anti-inflamatorias, analgésicos, agentes quimioterapéuticos y similares. Además de incluir otras sustancias terapéuticas en el propio medicamento, los medicamentos de la presente invención también se pueden administrar secuencial o simultáneamente con uno o varios agentes o composiciones farmacológicas. Las cantidades de medicamento y de agente o composición farmacológica dependen, por ejemplo, de qué tipo de agente(s) o composición(es) farmacológica(s) se utiliza/n, la enfermedad que se va a tratar y la pauta y las rutas de administración.

Se debe entender que además de los ingredientes particularmente mencionados en el presente documento, los agentes o composiciones farmacéuticas de esta invención pueden incluir otros agentes o composiciones convencionales en la técnica, teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión.

En un aspecto de la presente descripción, los presentes agentes o composiciones farmacéuticas se pueden incluir en artículos de fabricación y kits que contienen materiales útiles para el tratamiento de los estados patológicos de la enfermedad que se va a tratar, por ejemplo, cáncer. El artículo de fabricación puede incluir un envase con cualquiera de los presentes agentes o composiciones farmacéuticas con una etiqueta. Los envases adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo. Los envases se pueden producir a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta en el envase debe indicar el agente o las composiciones que se emplean para el tratamiento o la prevención de uno o varios estados de la enfermedad. La etiqueta también puede indicar instrucciones para la administración y así sucesivamente.

Además del envase descrito anteriormente, un kit que incluye un agente o composiciones farmacéuticas de la presente invención, puede incluir además opcionalmente un segundo envase que aloja un diluyente farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar, si se desea, en un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o varias formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete puede incluir, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como un envase blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

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

Los péptidos de esta invención se pueden administrar directamente como un agente o composiciones farmacéuticas, o si es necesario, formulados por métodos de formulación convencionales. En este último caso, además de los péptidos de esta invención, vehículos, excipientes y similares que se utilizan normalmente para fármacos, se pueden incluir cuando sea adecuado, sin limitaciones particulares. Ejemplos de tales vehículos son agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón fosfato, líquido de cultivo y similares. Además, los agentes o composiciones farmacéuticas pueden contener, si es necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, agentes tensioactivos y similares. Los agentes o composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden utilizar para fines anticancerosos.

Los péptidos de esta invención se pueden preparar como una combinación, compuesta por dos o más de los péptidos de la invención, para inducir CTL *in vivo*. La combinación peptídica puede estar en forma de una mezcla o se puede conjugar entre sí utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, los péptidos pueden estar enlazados químicamente o estar expresados como una secuencia polipeptídica de fusión única. Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes. Mediante la administración de los péptidos de esta invención, los péptidos son presentados con una densidad elevada por los antígenos del HLA en las APCs, a continuación, los CTLs que reaccionan específicamente frente al complejo formado entre el péptido presentado y el antígeno del HLA, se inducen. Al-

ternativamente, las APCs que presentan cualquiera de los péptidos de esta invención sobre su superficie celular, se obtienen retirando las APCs (por ejemplo, CDs) de los sujetos, que están estimulados por los péptidos de esta invención, los CTLs se inducen en los sujetos mediante la administración de nuevo de estas APCs (por ejemplo, CDs) a los sujetos, y como resultado, se puede incrementar la agresividad hacia las células cancerígenas, tales como cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP).

Los agentes o composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que incluyen un péptido de esta invención como ingrediente activo, también pueden incluir un adyuvante conocido para establecer eficazmente una inmunidad celular. Alternativamente, se pueden administrar con otros ingredientes activos, y se pueden administrar mediante una formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a un compuesto que potencia la respuesta inmune contra la proteína cuando se administra junto (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Los adyuvantes contemplados en esta memoria incluyen los descritos en la bibliografía (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina del cólera, toxina de salmonella y similares, pero no se limitan a los mismos.

Además, formulaciones de liposomas, formulaciones granulares en las que el péptido está unido a perlas con un diámetro de pocos micrómetros y formulaciones en las que un lípido está unido al péptido, se pueden utilizar de modo conveniente.

En algunos aspectos, los agentes o composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir además un componente que estimula los CTLs. Los lípidos han sido identificados como agentes o composiciones capaces de estimular CTLs *in vivo* contra antígenos víricos. Por ejemplo, residuos de ácido palmítico se pueden fijar a los grupos épsilon-amino y alfa-amino de un residuo de lisina y luego enlazarlos a un péptido de la invención. El péptido lipidado se puede administrar a continuación, ya sea directamente en una micela o partícula, incorporada en un liposoma, o emulsionado en un adyuvante. Como otro ejemplo de estimulación con lípidos de las respuestas de CTLs, lipoproteínas de *E. coli*, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinliseril-serina (P3CSS) se pueden utilizar para estimular CTLs cuando se fijan covalentemente a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).

El método de administración puede ser oral, intradérmico, subcutáneo, inyección intravenosa o similares, y la administración sistémica o la administración local próxima a los sitios designados. La administración se puede realizar mediante una administración única o reforzada mediante múltiples administraciones. La dosis de los péptidos de esta invención se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con la enfermedad que se va a tratar, la edad del paciente, el peso, la forma de administración y similares, y es normalmente de 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, de 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, de 0,1 mg a 10 mg, y se puede administrar una vez desde unos pocos días a unos pocos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar adecuadamente una dosis adecuada.

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

Los agentes o composiciones farmacéuticas de la invención también pueden contener ácidos nucleicos que codifican los péptidos descritos en este documento en una forma expresable. En este documento, la expresión "en una forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando se introduce en una célula, se expresa *in vivo* como un polipéptido que induce inmunidad antitumoral. En un ejemplo de realización, la secuencia de ácidos nucleicos del polinucleótido de interés incluye elementos reguladores necesarios para la expresión del polinucleótido. El(los) polinucleótido(s) se puede(n) equipar de modo que se consiga una inserción estable en el genoma de la célula diana (véase, por ejemplo, Thomas KR y Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 para una descripción de vectores de casete de recombinación homóloga). Véase, por ejemplo, Wolff et al, Science 1990, 247: 1465-8; documentos de Patentes de EE.UU. nº 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y WO 98/04720. Ejemplos de tecnologías de entrega basadas en el ADN incluyen "ADN desnudo", entrega facilitada (bupivacaína, polímeros, mediada por péptido), complejos de lípidos catiónicos, y mediada por partículas ("pistola de genes") o entrega mediada por presión (véase, por ejemplo, el documento de Patente de EE.UU. nº 5.922.687).

Los péptidos de la presente invención también se pueden expresar a través de vectores víricos o bacterianos. Ejemplos de vectores de expresión incluyen hospedadores víricos atenuados, tales como virus vaccinia o viruela aviar. Esta metodología implica el uso del virus vaccinia, por ejemplo, como un vector para expresar secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. Después de la introducción en un hospedador, el virus vaccinia recombinante expresa el péptido inmunógeno, y de ese modo provoca una respuesta inmune. Los vectores de vaccinia y los métodos útiles en los protocolos de inmunización se describen, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos nº 4.722.848. Ejemplos de otro vector incluyen BCG (Bacilo Calmette Guerin). Los vectores de BCG se describen en Stover et al, Nature 1991, 351: 456-60. Una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o la inmunización, por ejemplo, vectores de adenovirus y de virus adenoasociados, vectores retrovíricos, vectores de *Salmonella typhi*, vectores no tóxicos de la toxina del ántrax y similares, será evidente. Véase, por ejemplo, Shata et al, Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al, J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al, In Vivo 2000, 14: 571-85.

La entrega de un polinucleótido a un sujeto puede ser directa, en cuyo caso el sujeto está expuesto directamente a

un vector que transporta el polinucleótido, o indirecta, en cuyo caso, las células se transforman primero con el polinucleótido de interés *in vitro*, a continuación, las células se trasplantan al sujeto. Estas dos metodologías son conocidas, respectivamente, como terapias génicas *in vivo* y *ex vivo*.

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

El método de administración puede ser oral, intradérmico, subcutáneo, inyección intravenosa o similares, y la administración sistémica o administración local se emplea en la proximidad de los sitios designados. La administración se puede realizar mediante administración única o reforzada mediante múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el vehículo adecuado o las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de esta invención se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con la enfermedad que se va a tratar, la edad del paciente, el peso, la forma de administración y similares, y es ordinariamente de 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, de 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, de 0,1 mg a 10 mg, y se puede administrar de una vez cada pocos días a una vez cada pocos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar adecuadamente la dosis adecuada.

X. Métodos que emplean los péptidos, exosomas, APCs y CTLs

Los péptidos de la presente invención y los polinucleótidos que codifican tales péptidos se pueden utilizar para la inducción de APCs y CTLs. Los exosomas y las APCs de la presente invención también se pueden utilizar para la inducción de CTLs. Los péptidos, polinucleótidos, exosomas y APCs se pueden utilizar en combinación con cualquier otro compuesto siempre que los compuestos no inhiban su capacidad de inducción de CTLs. Por lo tanto, cualquiera de los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención mencionados anteriormente, se puede utilizar para inducir CTLs, y además, los que incluyen los péptidos y polinucleótidos se pueden utilizar también para inducir APCs tal y como se describe a continuación.

(1) Método para inducir las células presentadoras de antígeno (APCs)

La presente invención proporciona métodos de inducción de APCs utilizando los péptidos de esta invención o polinucleótidos que codifican los péptidos. La inducción de APCs se puede realizar como se ha descrito anteriormente en la sección "VI. Células presentadoras de antígeno". Esta invención también proporciona un método para inducir APCs que tienen un nivel elevado de capacidad de inducción de CTLs, cuya capacidad de inducción ha sido también mencionada en el apartado "VI. Células presentadoras de antígeno", supra.

Preferiblemente, los métodos para inducir APCs incluyen al menos una etapa seleccionada entre:

a: poner en contacto las APCs con los péptidos de la presente invención, e

b: introducir los polipéptidos de la presente invención en una forma expresable en las APCs.

Tales métodos para inducir APCs se realizan preferiblemente *in vitro* o *ex vivo*. Cuando los métodos se realizan *in vitro* o *ex vivo*, las APCs que se van a inducir se pueden obtener a partir de un sujeto que se va a tratar o de otros cuyos antígenos del HLA son iguales que los del sujeto. En una realización preferida, las APCs inducidas por los presentes métodos son portadoras del antígeno HLA-A2, en particular HLA-A2 (A*0201) en su superficie.

(2) Método para inducir CTLs

Además, la presente invención proporciona métodos para inducir CTLs utilizando los péptidos de esta invención, polinucleótidos que codifican los péptidos o exosomas o APCs que presentan los péptidos.

La presente invención también proporciona métodos para inducir CTLs utilizando un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad del receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce (es decir, se une a) un complejo de los péptidos de la presente invención y antígenos del HLA en una superficie celular. Preferiblemente, los métodos para inducir CTLs incluyen al menos una etapa seleccionada entre:

a: poner en contacto un linfocito T positivo para CD8 con una célula presentadora de antígeno y/o un exosoma que presenta en su superficie un complejo de un antígeno del HLA y un péptido de la presente invención, y

b: introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad del TCR que reconoce un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno del HLA en un linfocito T positivo para CD8.

Cuando los péptidos de esta invención se administran a un sujeto, el CTL es inducido en el cuerpo del sujeto, y la

potencia de la respuesta inmune dirigida al endotelio asociado al tumor, es mayor. Alternativamente, los péptidos y los polinucleótidos que codifican los péptidos se pueden utilizar para un método terapéutico *ex vivo*, en el que APCs obtenidas a partir del sujeto y las células positivas para CD8, o leucocitos mononucleares de sangre periférica se ponen en contacto (estimulan) con los péptidos de esta invención *in vitro*, y después de la inducción de los CTLs, las células CTLs activadas se devuelven al sujeto. Por ejemplo, el método puede incluir etapas de:

a: recoger APCs de un sujeto,

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

c: mezclar las APCs de la etapa b con linfocitos T CD^{8+}, y cocultivarlos para inducir los CTLs, y

d: recoger los linfocitos T CD^{8+} del cocultivo de la etapa c.

Alternativamente, de acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de los péptidos de esta invención para la preparación de una composición farmacéutica que induce CTLs. Además, la presente invención proporciona un método o un procedimiento para la preparación de un agente o una composición farmacéutica que induce CTLs, en donde el método comprende la etapa de mezclar por adición o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención también proporciona el péptido de la presente invención para la inducción de CTLs.

Los linfocitos T $CD8^+$ que tienen actividad citotóxica obtenidos en la etapa d, se pueden administrar al sujeto como una vacuna. Las APCs que se van a mezclar con los linfocitos T $CD8^+$ en la etapa c anterior, también se pueden preparar mediante la transferencia a las APCs de genes que codifican los péptidos presentes, tal y como se ha detallado anteriormente en la sección "VI. Células presentadoras de antígeno"; pero no se limitan a las mismas y en el presente método se puede utilizar cualquier APC o exosoma que presente con eficacia los presentes péptidos a los linfocitos T.

EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Análisis con micromatrices de ADNc

Un perfil de la expresión génica mediante un análisis con micromatrices de ADNc se realizó tal y como se ha descrito previamente (Nakamura T, et al Oncogene 2004; 23: 2385-400). Las muestras de tejido procedentes de cáncer de páncreas y tejidos pancreáticos normales no cancerosos adyacentes, se obtuvieron a partir de muestras quirúrgicas, y todos los pacientes proporcionaron su consentimiento por escrito de estar informados, para participar en este estudio. En las Figs. 1C, la relación de la expresión relativa se calculó dividiendo el valor de la expresión del ARNm de RAB6KIFL en células de cáncer por el de un homólogo normal. En las Figs. 1B, la relación de la expresión relativa de tejidos normales se calculó dividiendo el valor de la expresión del ARNm de RAB6KIFL en cada tejido normal por el valor de la expresión del ARNm de RAB6KIFL en el ARN control que era una mezcla de cantidades iguales de muestras de ARN procedentes de 40 tejidos normales indicados en las Figs. 1B.

Ratones

Ratones doblemente desactivados Tgm HLA-A2.1 (HHD); H-$2D^{b-/-}$ beta $2m^{-/-}$ a los que se había introducido un gen humano en una estructura artificial monocatenaria beta 2m-HLA-A2.1 (alfa 1, alfa 2)-H-$2D^b$ (alfa 3 citoplasmático transmembranal; HHD) se generaron en el Departamento de SIDA-Retrovirus, Unite d' Immunité Cellulaire Antivirale, Instituto Pasteur, Francia (Pascolo S, et al J Exp Med 1997; 185: 2043-51, Firat H, et al Eur J. Immunol 1999; 29: 3112-21) y fueron amablemente proporcionados por el Dr. F. A. Lemonnier. Los ratones se conservaron en el Centro de Recursos Animales y Desarrollo de la Universidad de Kumamoto y fueron tratados de acuerdo con las directrices de cuidado de animales de la Universidad de Kumamoto.

Líneas celulares y expresión del HLA

La línea celular de cáncer pancreático humano PANC1, la línea celular de cáncer de colon humano Caco-2 y una línea celular T2 carente de TAP y positiva para HLA-A2 (A*0201) se adquirieron en Riken Cell Bank (Tsukuba, Japón). La línea celular de cáncer pancreático humano PK8 fue proporcionada amablemente por el Centro de Recursos Celulares del Instituto de Investigación Biomédica de Desarrollo, Envejecimiento y Cáncer de la Universidad de Tohoku (Sendai, Japón). La línea celular de cáncer de hígado humano SKHep1 fue proporcionada amablemente por el Dr. Kyogo Ito, Universidad de Kurume (Kurume, Japón). La expresión de HLA-A2 se examinó utilizando citometría de flujo con un anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-HLA-A2, BB7.2 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) con el fin de seleccionar los donantes de sangre positivos para HLA-A2 y las líneas de células diana para los ensayos de citotoxicidad. Estas células se conservaron *in vitro* en RPMI 1640 o medio DMEM complementado con 10% de FCS en una atmósfera de CO_2 al 5% a 37ºC.

Pacientes, muestras de sangre y tejidos tumorales

La investigación clínica utilizando PBMCs procedentes de los donantes fue aprobada por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Kumamoto, Kumamoto, Japón. Las muestras de sangre y los tejidos cancerígenos y no cancerígenos adyacentes, fueron obtenidos durante los procedimientos de diagnóstico de rutina después de obtener de los pacientes consentimientos formales de haber sido informados por escrito en el Hospital de la Universidad de Kumamoto. Las muestras de sangre también se obtuvieron a partir de donantes sanos después de recibir su consentimiento por escrito de haber sido informados. Todas las muestras eran anónimas, se numeraron al azar y se almacenaron a -80ºC hasta su uso. Todos los pacientes y donantes sanos eran de nacionalidad japonesa.

Análisis mediante transcripción inversa-PCR y transferencia Northern

El análisis mediante transcripción inversa-PCR (RT-PCR) de los tejidos normales y cancerígenos y de las líneas celulares se realizó para evaluar la expresión de RAB6KIFL a nivel de ARNm. Las secuencias de los cebadores fueron como sigue: RAB6KIFL, directo 5'- CTACAAGCACCCAAGGACTCT -3' (SEQ ID NO: 6) e inverso 5'- AGATGGAGAAGCGAATGTTT -3' (SEQ ID NO: 7) y beta-actina, directo 5'- CATCCACGAAACTACCTTCAACT-3' (SEQ ID NO: 8) e inverso 5'- TCTCCTTAGAGAGAAGTGGGGTG-3' (SEQ ID NO: 9), y las reacciones de RT-PCR empleadas consistían en una desnaturalización inicial a 94ºC durante 5 minutos y 32-35 ciclos de amplificación a una temperatura de reasociación de 58ºC. Después de la normalización mediante ARNm de beta-actina como control, la expresión del ARNm de RAB6KIFL se comparó en tejidos y líneas celulares.

Transferencia Western y examen inmunohistoquímico.

La transferencia Western y la tinción inmunohistoquímica de la proteína RAB6KIFL se realizaron como se ha descrito previamente (Nakatsura T, et al Biochem Biophys Res Commun 2001; 281: 936-44. Yoshitake Y, et al. Clin Cancer Res 2004; 10: 6437-48). Para los análisis de transferencia Western de tejidos normales humanos, se usó una transferencia de tejido de humano adulto normal, preparadao previamente (Biochain, Hayward, CA). Los anticuerpos primarios utilizados, el anticuerpo policlonal anti-RAB6KIFL y el anticuerpo monoclonal anti-b-actina, fueron adquiridos en Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, EE.UU.) y Sigma (Steinheim, Alemania), respectivamente. La tinción inmunohistoquímica de las células CD4 o CD8 en muestras tisulares de Tgm HLA-A2.1 (HHD) inmunizado con el péptido RAB6KIFL-A2-10-284, se realizó como se ha descrito previamente (Matsuyoshi H, et al 2004; 172: 776-86).

Transferencia génica lentivírica

Una transferencia génica mediada por vectores lentivíricos se realizó como se ha descrito anteriormente (Imai K, et al Clin Cancer Res 2008; 14: 6487-95, Tahara-Hanaoka S, et al Exp Hematol 2002; 30: 11-7). En resumen, 17 micro g de vectores autoinactivantes CSII-CMV-RfA y CSIIEF-RfA (Miyoshi H, et al J Virol 1998; 72: 8150-7) que son portadores de ADNc de RAB6KIFL y 10 micro-g de pCMV-VSV-G-RSV-Rev y pCAG-HIVgp se transfectaron en células 293T, se cultivaron en una placa de cultivo de 10 cm utilizando reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.). Después de 60 h de transfección, el medio se recuperó y las partículas víricas se sedimentaron por ultracentrifugación (50.000 x g, 2 h). El sedimento se suspendió en 50 micro-L de medio RPMI 1640 y 10 micro-L de la suspensión vírica se añadieron a 5 x 10^4 células SKHep1, por pocillo en una placa de fondo plano de 96 pocillos. La expresión del gen RAB6KIFL transfectado se confirmó mediante un análisis de transferencia Western.

Inducción de CTLs de ratón que reaccionan con RAB6KIFL y ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas con IFN-gamma

Péptidos humanos obtenidos a partir de RAB6KIFL (pureza> 95%), que eran portadores de motivos que se unían a moléculas codificadas con HLA-A2 (A*0201), fueron seleccionados utilizando el programa informático BIMAS (BioInformatics and Molecular Analysis Section, Center for information Technology, NIH, Bethesda, MD) y se sintetizaron 36 péptidos (American Peptide Company, CA, EE.UU.). El péptido de HIV restringido por HLA-A2 (SLYNTYATL) (SEQ ID NO: 10) se utilizó como un péptido irrelevante. La inmunización de los ratones con péptidos se realizó como se ha descrito previamente (Nakatsura T, et al Biochem Biophys Res Commun 2003; 306: 16-25). La frecuencia de células productoras de IFN-gamma/1 x 10^5 células de bazo CD4- después de la estimulación con BM-DC singénicas (1 x 10^4/pocillo) estimuladas con o sin cada péptido, se analizó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISPOT), tal y como se ha descrito previamente (Komori H, et al Clin Cancer Res 2006; 12: 2689-97).

Inducción de CTLs humanos que reaccionan con RAB6KIFL

Péptidos humanos obtenidos a partir de RAB6KIFL (pureza> 95%), que eran portadores de motivos que se unían a moléculas codificadas con HLA-A2 (A*0201), fueron seleccionados utilizando el programa informático BIMAS (BioInformatics and Molecular Analysis Section, Center for information Technology, NIH, Bethesda, MD) y se sintetizaron 36 péptidos (American Peptide Company, CA, EE.UU.) (Tablas 1A y B). CDs obtenidas a partir de monocitos se utilizaron como células presentadoras de antígeno para inducir respuestas de CTLs contra péptidos presentados en el contexto de HLA. Las CDs se generaron en cultivo *in vitro* como se ha descrito previamente (Yoshitake Y, et al Clin Cancer Res 2004; 10: 6437-48, Harao M, et al Int J Cancer 2008; en prensa, Imai K, et al Clin Cancer Res 2008; en prensa). En pocas palabras, las PBMCs aisladas a partir de un voluntario normal, positivo para HLA-A2, utilizando solución Ficoll-Plaque (GE Healthcare UK, Ltd., Buckinghamshire, Reino Unido) fueron clasificadas en población $CD8^+$ y población $CD14^+$ con microperlas (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Para generar las CDs, la

población $CD14^+$ se cultivó en presencia de 100 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF; PeproTec Inc., NJ, EE.UU.) y 10 ng/ml de interleucina (IL)-4 (PeproTec) en AIM-V (Invitrogen) que contenía 2% de plasma autólogo termoinactivado. Después de 5 días de cultivo, se introdujo OK-432 en la placa para que las CDs maduraran. Siete días después de comenzar a cultivar las CDs generadas con citocinas, se sometieron a estímulos con 20 ng/mL de péptidos que se unían a HLA-A2, en presencia de 4 micro g/ml beta de 2-microglobulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 2 h a 37ºC en AIM-V. Estas CDs sometidas a impulsos con péptidos, se irradiaron (40 Gy) a continuación y se mezclaron en una proporción 1:50 con linfocitos T autólogos $CD8^+$, obtenidos mediante selección positiva de PBMCs con microperlas anti-CD8 (Miltenyi Biotec). Estos cultivos se establecieron en placas de 24 pocillos, cada pocillo contenía 1 x 10^5 CDs sometidas a impulsos con péptidos, 2 x 10^6 linfocitos T $CD8^+$ y 5 ng/ml de IL-7 humana recombinante (Wako, Osaka, Japón) en 2 ml de AIM-V con 2% de plasma autólogo. Después de 2 días, estos cultivos se complementaron con IL-2 humana recombinante (PeproTec Inc.) hasta tener una concentración final de 20 UI/mL. Dos estimulaciones semanales adicionales con CDs autólogas cargadas con péptido utilizando el mismo procedimiento, se llevaron a cabo el día 7 y 14. Seis días después de la última estimulación, las respuestas específicas de antígeno de los CTLs inducidos fueron investigadas mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr y un ensayo ELISPOT con IFN-gamma.

Respuestas de CTLs contra líneas celulares cancerígenas.

Los CTLs se cocultivaron con cada una de las células cancerígenas, o las células T2 sometidas a impulsos con péptido, como una célula diana (5 x 10^3/pocillo) en la relación indicada de efector/diana y un ensayo convencional de liberación de ^{51}Cr se realizó como se ha descrito previamente (Yoshitake Y, et al Clin Cancer Res 2004; 10: 6437-48. Imai K, et al. Clin Cancer Res 2008; en prensa). Brevemente, las células diana se marcaron con 3,7 KBq de $Na_2{}^{51}Cr^4$ (Perkin Elmer Life Sciences) durante 1 h a 37ºC en una incubadora de CO_2. Las células diana marcadas se lavaron tres veces, y las células diana sometidas a impulsos con péptido se prepararon incubando las células con 20 micro g/ml de péptido durante 3 horas a 37ºC. Las células diana se mezclaron con células efectoras en un volumen final de 200 micro L en placas de microtitulación de fondo plano, y se incubaron. Después de 6 h de incubación, se recogieron 50 micro L de material sobrenadante de cada pocillo y la radiactividad se cuantificó usando un contador gamma. La citotoxicidad específica se evaluó calculando el porcentaje de liberación específica de ^{51}Cr.

El bloqueo del HLA de clase I o del HLA-DR se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Yoshitake Y, et al Clin Cancer Res 2004; 10: 6437-48, Imai K, et al Clin Cancer Res 2008; en prensa). Brevemente, antes del cocultivo de los CTLs con una línea celular cancerígena en el ensayo de liberación de ^{51}Cr o el ensayo ELISPOT, las células cancerígenas diana se incubaron durante 1 hora con 10 micro g/ml de AcMo anti-clase I, W6/32, o 10 micro g/ml de AcMo anti-HLA-DR, H-DR-1, y luego se examinaron los efectos de los AcMos sobre la actividad citotóxica o la producción de IFN-gamma por los CTLs.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba t de Student de dos colas para evaluar la significancia estadística de las diferencias en los datos obtenidos mediante el ensayo de ELISPOT y en el tamaño del tumor entre los grupos de tratamiento. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo. Se realizó el análisis estadístico utilizando un paquete comercial de programas informáticos estadísticos (SPSS para Windows, versión 11.0, Chicago, IL, EE.UU.).

Resultados

Identificación de genes RAB6KIFL regulados al alza en el cáncer de páncreas y diversas neoplasias malignas basada en una micromatriz de ADNc.

Empleando una micromatriz de ADNc de todo el genoma que contenía 27.648 genes, se examinaron previamente los perfiles de expresión génica de 6 tejidos de cáncer de páncreas y sus equivalentes normales adayacentes. Después del análisis, se eligieron 6 genes. La proporción de expresión relativa de estos genes era más de cinco veces superior en los tejidos de cáncer de páncreas que en comparación con sus homólogos normales (Fig. 1A) (Imai K, et al Clin Cancer Res 2008; 14: 6487-95). La expresión de estos genes se analizó utilizando un análisis de micromatrices de ADNc en 29 tipos de tejidos normales, incluyendo 4 tejidos embrionarios (Fig. 1B). En consecuencia, RAB6KIFL/KIF20A se apuntó como un nuevo AAT del cáncer de páncreas. La expresión del gen RAB6KIFL en tejidos de cáncer pancreático se mejoró notablemente en los 6 pacientes analizados (el promedio de la proporción de expresión relativa: 32.000, intervalo: 15-72.000). Además, el gen RAB6KIFL se expresaba débilmente solo en los testículos y el timo (Fig. 1B). El nivel de expresión del gen RAB6KIFL también aumentó en los cánceres de pulmón y de vejiga basándose en el anterior análisis de micromatrices de ADNc (Fig. 1C) (Nakamura T, et al Oncogene 2004; 23: 2385-400, Kitahara O, et al Cancer Res 2001; 61: 3544-9, Hasegawa S, et al Cancer Res 2002; 62: 7012-7, Kikuchi T, et al Oncogene 2003; 22: 2192-205, Obama K, et al Hepatology 2005; 41: 1339-1348).

Expresión del ARNm y de la proteína de RAB6KIFL en órganos normales, líneas celulares de cáncer y tejidos de cáncer pancreático.

La expresión del gen RAB6KIFL en tejidos normales a nivel de ARNm se analizó mediante análisis de RT-PCR. Un análisis de RT-PCR semicuantitativa de RAB6KIFL en los tejidos normales reveló que se expresaba solo en el testículo (Fig. 2A). Se detectó la expresión del gen RAB6KIFL en casi la totalidad de líneas celulares de cáncer pancreá-

tico y otros cánceres positivos para HLA-A2, utilizando un análisis RT-PCR (Fig. 2B).

Posteriormente, se analizó la expresión del gen RAB6KIFL utilizando un análisis de RT-PCR en los tejidos de cáncer de páncreas y sus homólogos normales adyacentes, que se extirparon quirúrgicamente. Se detectó la expresión del gen RAB6KIFL en 5 de 8 tejidos de cáncer de páncreas, pero se detectó una expresión baja en sus homólogos normales (Fig. 2C). Además, se detectó su expresión en los focos metastásicos de la piel y el peritoneo.

La expresión de la proteína RAB6KIFL en tejidos cancerígenos y algunos normales también se examinó mediante transferencia Western (Figs. 3A, B). La proteína RAB6KIFL no se pudo detectar en ocho tejidos normales y en los testículos dio una banda muy débil que tenía una movilidad similar a la observada en un lisado de células PANC1 (Fig. 3A). Por otro lado, se detectó la proteína RAB6KIFL en tejidos de cáncer de páncreas de dos pacientes examinados, pero no en los tejidos normales adyacentes (Fig. 3B).

Para confirmar la hiperexpresión asociada a tumores de la proteína RAB6KIFL, se examinaron a continuación muchas muestras de tejido de cáncer de páncreas embebido en parafina, mediante análisis inmunohistoquímicos. Una tinción fuerte de RAB6KIFL se observó principalmente en el citoplasma de las células cancerígenas en cáncer de páncreas, mientras que se observó una tinción muy débil en células acinares y en el epitelio ductal normal de sus tejidos pancreáticos normales adyacentes (Fig. 4A). Además, se observó una tinción fuerte similar en focos metastásicos del peritoneo (Fig. 4A). No se detectó una tinción en las muestras tisulares de pancreatitis con formación de tumor (Fig. 4A). RAB6KIFL no estaba teñido en el cerebro, pulmón, hígado, riñón, estómago, intestino delgado, colon, bazo, músculo esquelético, piel, timo y testículos normales (Fig. 4B).

Predicción de los péptidos que se unen a HLA-A2 (A*0201) obtenidos a partir de RAB6KIFL

La Tabla 1A y B muestran péptidos que se unen a HLA-A2 (A*0201) de la proteína RAB6KIFL ordenados según la puntuación de la afinidad de unión elevada prevista. En total, se seleccionaron 36 péptidos con actividad potencial de unión a HLA-A2.

[Tabla 1A]

Tabla 1A Péptidos de 9-meros que se unen a HLA-A2 *(A*0201)* obtenidos a partir de RAB6KIFL

Denominación	Posición de partida	Subsecuencia	Puntuación	SEQ ID
	204	LLSNEVIWL	459	
RAB6KIFL-A2-9-12	**12**	**LLSDDDVW**	**199**	**SEQ ID NO: 3**
	715	KMLEPPPSA	191	
	750	KLGESLQSA	164	
	300	SIWISFFEI	131	
	38	NLLSDCSVV	106	
	688	QLQEVKAKL	88	
	695	KLQQCKAEL	75	
RAB6KIFL-A2-9-809	**809**	**CIAEQYHTV**	**59**	**SEQ ID NO: 4**
	11	GLLSDDDVV	52	
	436	TLGRCIAAL	49	
	179	ILPRSLALI	41	
	183	SLALIFNSL	41	
	625	KLNILKESL	37	
	781	ILIKQDQTL	36	
	231	GLQEEELST	31	
	494	TLHVAKFSA	29	
	556	SMYGKEELL	24	
	788	TLAELQNNM	20	
	209	VIWLDSKQI	20	

La posición de partida indica el número de aminoácidos desde el extremo N-terminal de RAB6KIFL.
La puntuación de la unión se obtiene a partir de Materiales y Métodos.

[Tabla 1B]

Tabla 1B Péptidos de 10-meros que se unen HLA-A2 (*A*0201*) obtenidos a partir de RAB6KIFL

Denominación	Posición de partida	Subsecuencia	Puntuación	SEQ ID
	654	LLQEARQQSV	485	
	788	TLAELQNNMV	285	
	742	RLLRTELQKL	182	
	39	LLSDCSVVST	119	
	11	GLLSDDDVVV	106	
	400	KISELSLCDL	97	
	573	LLLKERQEKL	66	
	97	VLQAPKDSFA	46	
RAB6KIFL-A2-10-284	**284**	**AQPDTAPLPV**	**29**	**SEQ ID NO: 5**
	132	GQASFFNLTV	27	
	625	KLNILKESLT	26	
	382	SIFSIRILHL	25	
	203	PLLSNEVIWL	22	
	455	NLVPFRDSKL	21	
	506	QLVHAPPMQL	21	
	98	LQAPKDSFAL	21	
	66	KVYLRVRPLL	21	

La posición de partida indica el número de aminoácidos desde el extremo N-terminal de RAB6KIFL.
La puntuación de la unión se obtiene a partir de Materiales y Métodos.

Identificación de epítopos de CTLs de ratón obtenidos a partir de RAB6KIFL y restringidos por HLA-A2.2 usando ratones transgénicos HLA-A2.1 (HHD)

Para identificar los epítopos de CTLs obtenidos a partir de RABβKIFL y restringidos por HLA-A2, se seleccionaron 36 péptidos candidatos diferentes. Cada uno consistía en 9 o 10 aminoácidos que tenían puntuaciones elevadas predictivas de unión a HLA-A2 (A*0201), el producto alélico del HLA más común en todo el mundo, basándose en el algoritmo predictivo de unión al péptido HLA proporcionado por el NIH BIMAS (Tablas 1A, B). Para determinar cuáles podrían inducir CTLs reactivos con péptidos, células del bazo $CD4^-$ aisladas a partir de Tgm HLA-A2.1 (HHD), inmunizados i.p. dos veces con BM-DCs, sometidas a impulsos con los doce conjuntos de la mezcla de tres tipos de péptidos seleccionados a partir de estos 36 péptidos, se estimularon de nuevo *in vitro* con BM-DCs sometidas a impulsos con cada péptido. Los resultados mostraron que las células de bazo $CD4^-$, estimuladas con el péptido RAB6KIFL-A2-9-12, RAB6KIFL-A2-9-809 y RAB6KIFL-A2-10-284, producían una cantidad significativa de IFN-gamma de una forma específica del péptido en un ensayo ELISPOT (Fig. 5A). Estas células de bazo $CD4^-$ (2×10^4) mostraron 149,0 más/menos 22,2 recuentos de puntos/pocillo como respuesta a las BM-DCs sometidas a impulsos con el péptido RAB6KIFL A2-9-12, mientras que mostraron 32,6 más/menos 9,9 recuentos de puntos/pocillo en presencia de las BM-DCs sin carga de péptido ($P < 0,01$). Del mismo modo, las células de bazo $CD4^-$ estimuladas con BM-DCs sometidas a impulsos con el péptido RAB6KIFL-A2-9-809 mostraron 117,2 más/menos 23,4 recuentos de puntos/pocillo, mientras que mostraron 51,4 más/menos 7,8 recuentos de puntos/pocillo en presencia de BM-DCs sin carga de péptido ($P < 0,01$). Por otra parte, las células de bazo $CD4^-$ estimuladas con BM-DCs sometidas a impulsos con el péptido RAB6KIFL-A2-10-284 también mostraron 141,2 más/menos 5,5 recuentos de puntos/pocillo, mientras que mostraron 19,2 más/menos 5,2 recuentos de puntos/pocillo en presencia de BM-DCs sin carga de péptido ($P < 0,01$). Se observó una respuesta específica del péptido, no significativa con los otros péptidos. Estos resultados sugieren que los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12, RAB6KIFL-A2-9-809 y RAB6KIFL-A2-10-284 podrían ser péptidos de epítopos de CTLs restringidos por HLA-A2 en Tgm HLA-A2.1 (HHD), y se esperaba que esos péptidos fueran epítopos de CTLs humanos.

No se induce ningún fenómeno autoinmune con la inmunización con el péptido del epítopo, RAB6KIFL-A2-9-809, en Tgm HLA-A2.1 (HHD)

Es muy importante investigar si la inmunización con el péptido RAB6KIFL induce una reacción autoinmune o no. Por lo tanto, se realizó un análisis inmunohistoquímico de varios órganos vitales con AcMo anti-CD4 y anti-CD8 en Tgm HLA-A2 (HHD) después de vacunar dos veces con el péptido RAB6KIFL-A2-9-809, cuyas secuencias de aminoáci-

dos estaban conservadas completamente entre RAB6KIFL humano y de ratón. Como resultado, no se observó ningún cambio patológico, tal como infiltración de linfocitos o destrucción del tejido sugiriendo autoinmunidad (Fig. 5B). Las anomalías observadas con frecuencia en ratones afectados con enfermedades autoinmunes, tales como pelo y piel anormales, diarrea y pérdida de peso, tampoco se observaron en estos ratones. Estos resultados indican que los linfocitos estimulados con el péptido RAB6KIFL-A2-9-809 no atacan a los tejidos normales, al menos en Tgm HLA-A2.

Inducción de CTLs reactivos con RABβKIFL procedentes de PBMCs de donantes sanos positivos para HLA-A2 (A*0201)

La generación de CTLs específicos de RABβKIFL se intentó a partir de las PBMCs de donantes sanos positivos para HLA-A2 (A*0201) mediante la estimulación con los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 (SEQ ID NO: 3), RAB6KIFL-A2-9-809 (SEQ ID NO: 4) y RAB6KIFL-A2-10-284 (SEQ ID NO: 5). Se aislaron PBMCs de donantes sanos positivos para HLA-A2, y los linfocitos T $CD8^+$ clasificados a partir de las PBMCs, se incubaron con las CDs obtenidas, autólogas, a partir de monocitos, sometidas a impulsos con cada péptido. Después de tres estimulaciones, la actividad citotóxica contra las células T2 sometidas a impulsos con péptido, fue examinada a través de un ensayo de liberación de ^{51}Cr (Fig. 6A) y un ensayo ELISPOT con IFN-gamma (datos no mostrados). Los CTLs inducidos procedentes de las PBMCs de dos donantes sanos mostraron actividad citotóxica hacia las células T2 sometidas a impulsos con el péptido RAB6KIFL-A2-9-12 (SEQ ID NO: 3), RAB6KIFL-A2-9-809 (SEQ ID NO: 4) o RAB6KIFL-A2-10-284 (SEQ ID NO: 5), pero no hacia las células T2 sometidas a impulsos con péptido irrelevante y péptido de VIH restringido por HLA-A2, o sin carga peptídica. Se observaron respuestas similares en otros donantes (datos no mostrados). Estos resultados indican que estos CTLs tenían una citotoxicidad específica del péptido.

Posteriormente, se investigó si estos CTLs eran capaces de destruir líneas celulares de cáncer humano que expresaban RAB6KIFL y HLA-A2 (A*0201). Como se muestra en las Figs. 6B, los CTLs reactivos con RABβKIFL estimulados con el péptido RAB6KIFL-A2-9-12 (izquierda), RAB6KIFL-A2-9-809 (medio), o RAB6KIFL-A2-10-284 (derecha) mostraban citotoxicidad frente a PANC1 ($RAB6KIFL^+$, $HLA\text{-}A2^+$), Caco-2 ($RAB6KIFL^+$, $HLA\text{-}A2^+$), pero no frente a PK8 ($RAB6KIFL^+$, $HLA\text{-}A2^-$) en donantes sanos.

Además, SKHep1/RAB6KIFL ($RAB6KIFL^{alto}$, $HLA\text{-}A2^+$), las células SKHep1 ($RAB6KIFL^{bajo}$, $HLA\text{-}A2^+$) transfectadas con el gen RAB6KIFL (Fig. 2B), se utilizaron como células diana para confirmar que estos péptidos se habían procesado de forma natural a partir de la proteína RAB6KIFL en las células cancerígenas. Como se muestra en la Fig. 6C, los CTLs inducidos mediante estimulación con el péptido RAB6KIFL-A2-9-12 (izquierda), RAB6KIFL-A2-9-809 (centro) y RAB6KIFL-A2-10-284 (derecha) mostraban citotoxicidad contra SKHep1/RAB6KIFL, pero no contra SKHep1/simulado. Estos resultados sugieren que estos péptidos podrían ser procesados naturalmente y que se expresan en la superficie de células cancerígenas en el contexto de moléculas HLA-A2.

Para confirmar que los CTLs inducidos reconocían las células diana de una manera restringida por HLA de clase I, se realizó un ensayo de bloqueo del HLA de clase I utilizando el AcMo anti-HLA de clase I (W6/32) para bloquear el reconocimiento de las células cancerígenas a través de los CTLs (Fig. 6D). Como resultado, el anticuerpo anti-HLA de clase I podía inhibir de forma marcada la producción de IFN-gamma estimulada con células PANC1 en un ensayo ELISPOT de los CTLs generados por estimulación con el péptido RAB6KIFL-A2-9-12 (izquierda), RAB6KIFL-A2-9-809 (en el centro) o RAB6KIFL-A2-10-284 (derecha), con significancia estadística (Fig. 6D, $P < 0,01$). Estos resultados indican claramente que estos CTLs inducidos reconocían las células diana que expresaban RAB6KIFL de una manera restringida por el HLA de clase I.

Discusión

Según el ejemplo, se mostró que RAB6KIFL es un AAT que promete como diana en la inmunoterapia contra el cáncer para el cáncer de páncreas. Para establecer la inmunoterapia contra el cáncer, es importante identificar los AATs que se expresan fuertemente en las células tumorales pero no en las células normales. El análisis de micromatrices de ADNc mostró que el ARNm de RAB6KIFL se hiperexpresaba en células de cáncer de páncreas (Imai K, Hirata S, Me A, Senju S, Ikuta Y, Yokomine K, Harao M, Inoue M, Tsunoda T, Nakatsuru S, Nakagawa H, Nakamura Y., et al Clin Cancer Res 2008; 14: 6487-95) y que apenas se expresaba en sus homólogos normales y muchos tejidos adultos normales, excepto en los testículos y el timo (Fig. 1B). Además, el gen RAB6KIFL también se hiperexpresaba en los cánceres de pulmón y de vejiga, así como en el cáncer de páncreas (Fig. 1C). El análisis RT-PCR mostró que el ARNm de RAB6KIFL se expresaba frecuentemente en varias líneas celulares de cáncer y en tejidos de cáncer de páncreas, pero no en tejidos adultos normales, incluyendo médula ósea, a excepción de los testículos (Fig. 2). Del mismo modo, los análisis de transferencia Western y los análisis inmunohistoquímicos revelaron que la proteína RAB6KIFL se detectaba en células de cáncer de páncreas, pero no en sus homólogas normales y en tejidos adultos normales, incluyendo el timo, excepto los testículos (Figs. 3, 4). Estas observaciones están a favor de RAB6KIFL como un AAT similar al del cáncer de testículos a nivel de proteínas.

Para la identificación de los AATs como dianas útiles para la inmunoterapia contra el cáncer, otro punto clave es seleccionar los antígenos que son indispensables para la proliferación, invasión, metástasis y supervivencia de las células cancerígenas. Recientemente, Taniuchi et al. han informado de que RAB6KIFL está implicado en la carcinogénesis pancreática (Taniuchi K, et al Cancer Res 2005; 65: 105-12), además de su papel descrito anteriormente

en el tráfico de membrana (Echard A, et al Science 1998; 279: 580- 5) y la citocinesis (Fontijn RD, et al Mol Cell Biol 2001; 21: 2944-55, Colina E, Clarke M, Barr FA EMBO J 2000; 19: 5711-9). Ellos mostraron que la regulación a la baja de RAB6KIFL endógeno en células de cáncer de páncreas a través de ARN pequeño de interferencia da como resultado una disminución drástica del crecimiento de las células cancerígenas a través de la interacción con el homólogo de disc large 5 (DLG5), una proteína de carga de RAB6KIFL (Taniuchi K, et al., Cancer Res 2005; 65: 105-12), lo que sugiere que RAB6KIFL parece desempeñar por tanto un papel decisivo en la carcinogénesis pancreática y por ello sería una diana potencialmente útil en la inmunoterapia contra el cáncer.

El potencial de RAB6KIFL como diana inmunoterapéutica se verificó en el presente documento identificando los péptidos de epítopos restringidos por HLA-A2 y evaluando su inmunogenicidad. El experimento que emplea Tgm HLA-A2 (HHD) identificaba tres péptidos de epítopos de RAB6KIFL restringidos por HLA-A2, que podrían estimular la generación de CTLs de ratón restringidos por HLA-A2, mediante la vacunación con los 36 péptidos candidatos con predicción de tener afinidad de unión hacia HLA-A2 (A*0201) mediante el algoritmo BIMAS, sin causar fenómenos autoinmunes como la infiltración de linfocitos o la destrucción de tejido (Fig. 5). Además, los CTLs reactivos con RAB6KIFL podrían ser generados a partir de PBMCs estimuladas con estos tres péptidos en tres donantes sanos independientes (Fig. 6). Estos CTLs podían destruir no solo las células T2 sometidas a impulsos con su péptido cognado, sino también las líneas celulares de cáncer que expresaban tanto RAB6KIFL como HLA-A2. La especificidad antigénica de los CTLs hacia a estos péptidos fue confirmada por los hallazgos de que estos CTLs mostraban citotoxicidad hacia las células SKHep1 transfectadas con el gen RAB6KIFL humano, pero no hacia SKHep1 transfectadas de forma simulada. Estos datos sugieren que estos péptidos RAB6KIFL (RAB6KIFL-A2-9-12, RAB6KIFL-A2-9-809 y RAB6KIFL-A2-10-284) se procesan de forma natural a partir de la proteína RAB6KIFL en las células cancerígenas y se presentan sobre la superficie celular junto con moléculas del HLA-A2 para ser reconocidos por los CTLs. Además, sería posible que el péptido RAB6KIFL-A2-9-809 se pueda procesar de manera más eficaz a partir de la proteína RAB6KIFL en comparación con los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 y RAB6KIFL-A2-10-284 en las células cancerígenas, porque los CTLs inducidos con el péptido RAB6KIFL A2-9-809 mostraban una citotoxicidad más fuerte dirigida contra las células cancerígenas que expresaban tanto RAB6KIFL como HLA-A2, en comparación con la citotoxicidad mediada por CTLs inducidos por la estimulación con los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 o RAB6KIFL-A2-10-284.

Tgm HLA-A2.1 (HHD) que carecían de expresión de moléculas endógenas de clase I de ratón codificadas por H-2^{b} se utilizaron para identificar péptidos de epítopos de CTLs de RAB6KIFL restringido por HLA-A2. Se informó de que Tgm HLA-A2.1 (HHD) era un modelo animal versátil para la evaluación preclínica de la inmunoterapia basada en péptidos (Imai K, et al Clin Cancer Res 2008; 14: 6487-95, Komori H, et al. Cáncer Res Clin 2006; 12: 2689-97, Harao M, et al Int J Cancer 2008; 123: 2616-25, Pascolo S, et al J Exp Med 1997; 185: 2043-51, Firat H, et al. Eur J Immunol 1999; 29: 3112-21).

Para evitar los efectos adversos inducidos mediante vacunación de los AATs, RAB6KIFL fue seleccionado como una diana que apenas se expresaba en tejidos adultos normales. Sin embargo, era muy importante determinar si la vacunación con RAB6KIFL podía inducir enfermedades autoinmunes durante o después de una inmunoterapia contra el cáncer. En este documento, las secuencias de aminoácidos de dos de los tres péptidos de epítopos no se conservan entre ser humano y ratón (RAB6KIFL-A2-9-12, humano: LLSDDDVVV (SEQ ID NO: 3), ratón: LLSDEDVVD (SEQ ID NO: 11); RAB6KIFL-A2-10-284, humano: AQPDTAPLPV (SEQ ID NO: 5), ratón: AQPDTVPVSV) (SEQ ID NO: 12)). Por lo tanto, el fenómeno autoinmune en Tgm HLA-A2 se investigó después de dos vacunaciones con péptido RAB6KIFL-A2-9-809 en el que las secuencias de aminoácidos se conservaban completamente entre seres humanos y ratón. Una de las ventajas del uso de Tgm HLA-A2 es la posibilidad de que se podía investigar *in vivo* el fenómeno autoinmune. Por supuesto, debido a que la cantidad de tejidos normales investigados en la presente memoria es limitada, no es posible excluir la posible expresión de RAB6KIFL en algunos tejidos normales que no se han investigado en este documento. Por lo tanto, se debe tener cuidado con la inducción de enfermedades autoinmunes cuando se utilizan péptidos RAB6KIFL para la inmunoterapia contra el cáncer.

En conclusión, los resultados actuales sugieren que RAB6KIFL es un AAT que contiene péptidos de epítopos que pueden producir CTLs reactivos contra células cancerígenas que expresan tanto RAB6KIFL como HLA-A2. Puesto que RAB6KIFL se expresa con abundancia en una amplia gama de tumores malignos humanos, RAB6KIFL es por lo tanto, una diana prometedora para la inmunoterapia basada en péptidos, para el tratamiento de un amplio espectro de tumores malignos, especialmente el cáncer de páncreas. Una investigación adicional de la capacidad de inducción de CTLs específicos de RAB6KIFL en pacientes con cáncer de páncreas sigue siendo, por lo tanto, un tema de gran importancia para la aplicación clínica.

Aplicabilidad Industrial

La presente invención describe nuevos AATs, en particular los derivados de RAB6KIFL que inducen respuestas inmunes antitumorales potentes y específicas y tienen aplicabilidad en una amplia gama de tipos de cáncer. Tales AATs justifican su posterior desarrollo como vacunas de péptidos contra enfermedades asociadas con RAB6KIFL, por ejemplo, cánceres tales como cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), osteosarcoma, cáncer pancreático, carcinoma renal y tumor de tejidos blandos.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDO DE EPÍTOPO RAB6KIFL/KIF20A Y VACUNAS QUE CONTIENEN EL MISMO

<130> ONC-A0824P

<150> US61/197,106
< 151> 22-10-2008

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
< 211> 3471
< 212> ADN
< 213> Homo sapiens

<220>
< 221> CDS
< 222> (497)..(3169)

<400> 1

```
tttttcccct taagacaaag caagcaccct aaaccagtta ccctgtgcac tcctgttaag       60

attgttgcta aggaaggaca ggagttggct gctgaagcct caagatttcc tttaggctct      120

taggtaagaa atgtctaagg ttcaaggaaa aaggttaagt tggaagaatc ccaggcaaaa      180

taagtgcgaa tccacgacag ttggtaaccc ggacccacat tagaactcag aggtcaagca      240

gaagcgaacg actggaattc cagtcaggcc cgcccccttt ccttacgcgg attggtagct      300

gcaggcttcc ctatctgatt ggccgaacga acgcagcgcg taatttaaaa tattgtatct      360

gtaacaaagc tgcacctcgt gggcggagtt gtgctctgcg gctgcgaaag tccagcttcg      420

gcgactaggt gtgagtaagc cagtatccca ggaggagcaa gtggcacgtc ttcggaccta      480

ggctgccccc gccgtc atg tcg caa ggg atc ctt tct ccg cca gcg ggc ttg      532
                Met Ser Gln Gly Ile Leu Ser Pro Pro Ala Gly Leu
                1               5                   10

ctg tcc gat gac gat gtc gta gtt tct ccc atg ttt gag tcc aca gct      580
Leu Ser Asp Asp Asp Val Val Val Ser Pro Met Phe Glu Ser Thr Ala
        15                  20                  25

gca gat ttg ggg tct gtg gta cgc aag aac ctg cta tca gac tgc tct      628
Ala Asp Leu Gly Ser Val Val Arg Lys Asn Leu Leu Ser Asp Cys Ser
    30                  35                  40

gtc gtc tct acc tcc cta gag gac aag cag cag gtt cca tct gag gac      676
Val Val Ser Thr Ser Leu Glu Asp Lys Gln Gln Val Pro Ser Glu Asp
45                  50                  55                  60

agt atg gag aag gtg aaa gta tac ttg agg gtt agg ccc ttg tta cct      724
Ser Met Glu Lys Val Lys Val Tyr Leu Arg Val Arg Pro Leu Leu Pro
                65                  70                  75

tca gag ttg gaa cga cag gaa gat cag ggt tgt gtc cgt att gag aat      772
```

```
Ser Glu Leu Glu Arg Gln Glu Asp Gln Gly Cys Val Arg Ile Glu Asn
            80                  85                  90

gtg gag acc ctt gtt cta caa gca ccc aag gac tct ttt gcc ctg aag      820
Val Glu Thr Leu Val Leu Gln Ala Pro Lys Asp Ser Phe Ala Leu Lys
        95                 100                 105

agc aat gaa cgg gga att ggc caa gcc aca cac agg ttc acc ttt tcc      868
Ser Asn Glu Arg Gly Ile Gly Gln Ala Thr His Arg Phe Thr Phe Ser
    110                 115                 120

cag atc ttt ggg cca gaa gtg gga cag gca tcc ttc ttc aac cta act      916
Gln Ile Phe Gly Pro Glu Val Gly Gln Ala Ser Phe Phe Asn Leu Thr
125                 130                 135                 140

gtg aag gag atg gta aag gat gta ctc aaa ggg cag aac tgg ctc atc      964
Val Lys Glu Met Val Lys Asp Val Leu Lys Gly Gln Asn Trp Leu Ile
                145                 150                 155

tat aca tat gga gtc act aac tca ggg aaa acc cac acg att caa ggt     1012
Tyr Thr Tyr Gly Val Thr Asn Ser Gly Lys Thr His Thr Ile Gln Gly
            160                 165                 170

acc atc aag gat gga ggg att ctc ccc cgg tcc ctg gcg ctg atc ttc     1060
Thr Ile Lys Asp Gly Gly Ile Leu Pro Arg Ser Leu Ala Leu Ile Phe
        175                 180                 185

aat agc ctc caa ggc caa ctt cat cca aca cct gat ctg aag ccc ttg     1108
Asn Ser Leu Gln Gly Gln Leu His Pro Thr Pro Asp Leu Lys Pro Leu
    190                 195                 200

ctc tcc aat gag gta atc tgg cta gac agc aag cag atc cga cag gag     1156
Leu Ser Asn Glu Val Ile Trp Leu Asp Ser Lys Gln Ile Arg Gln Glu
205                 210                 215                 220

gaa atg aag aag ctg tcc ctg cta aat gga ggc ctc caa gag gag gag     1204
Glu Met Lys Lys Leu Ser Leu Leu Asn Gly Gly Leu Gln Glu Glu Glu
                225                 230                 235

ctg tcc act tcc ttg aag agg agt gtc tac atc gaa agt cgg ata ggt     1252
Leu Ser Thr Ser Leu Lys Arg Ser Val Tyr Ile Glu Ser Arg Ile Gly
            240                 245                 250

acc agc acc agc ttc gac agt ggc att gct ggg ctc tct tct atc agt     1300
Thr Ser Thr Ser Phe Asp Ser Gly Ile Ala Gly Leu Ser Ser Ile Ser
        255                 260                 265

cag tgt acc agc agt agc cag ctg gat gaa aca agt cat cga tgg gca     1348
Gln Cys Thr Ser Ser Ser Gln Leu Asp Glu Thr Ser His Arg Trp Ala
    270                 275                 280

cag cca gac act gcc cca cta cct gtc ccg gca aac att cgc ttc tcc     1396
Gln Pro Asp Thr Ala Pro Leu Pro Val Pro Ala Asn Ile Arg Phe Ser
285                 290                 295                 300

atc tgg atc tca ttc ttt gag atc tac aac gaa ctg ctt tat gac cta     1444
Ile Trp Ile Ser Phe Phe Glu Ile Tyr Asn Glu Leu Leu Tyr Asp Leu
                305                 310                 315

tta gaa ccg cct agc caa cag cgc aag agg cag act ttg cgg cta tgc     1492
Leu Glu Pro Pro Ser Gln Gln Arg Lys Arg Gln Thr Leu Arg Leu Cys
            320                 325                 330
```

```
gag gat caa aat ggc aat ccc tat gtg aaa gat ctc aac tgg att cat       1540
Glu Asp Gln Asn Gly Asn Pro Tyr Val Lys Asp Leu Asn Trp Ile His
        335                 340                 345

gtg caa gat gct gag gag gcc tgg aag ctc cta aaa gtg ggt cgt aag       1588
Val Gln Asp Ala Glu Glu Ala Trp Lys Leu Leu Lys Val Gly Arg Lys
    350                 355                 360

aac cag agc ttt gcc agc acc cac ctc aac cag aac tcc agc cgc agt       1636
Asn Gln Ser Phe Ala Ser Thr His Leu Asn Gln Asn Ser Ser Arg Ser
365                 370                 375                 380

cac agc atc ttc tca atc agg atc cta cac ctt cag ggg gaa gga gat       1684
His Ser Ile Phe Ser Ile Arg Ile Leu His Leu Gln Gly Glu Gly Asp
                385                 390                 395

ata gtc ccc aag atc agc gag ctg tca ctc tgt gat ctg gct ggc tca       1732
Ile Val Pro Lys Ile Ser Glu Leu Ser Leu Cys Asp Leu Ala Gly Ser
            400                 405                 410

gag cgc tgc aaa gat cag aag agt ggt gaa cgg ttg aag gaa gca gga       1780
Glu Arg Cys Lys Asp Gln Lys Ser Gly Glu Arg Leu Lys Glu Ala Gly
        415                 420                 425

aac att aac acc tct cta cac acc ctg ggc cgc tgt att gct gcc ctt       1828
Asn Ile Asn Thr Ser Leu His Thr Leu Gly Arg Cys Ile Ala Ala Leu
    430                 435                 440

cgt caa aac cag cag aac cgg tca aag cag aac ctg gtt ccc ttc cgt       1876
Arg Gln Asn Gln Gln Asn Arg Ser Lys Gln Asn Leu Val Pro Phe Arg
445                 450                 455                 460

gac agc aag ttg act cga gtg ttc caa ggt ttc ttc aca ggc cga ggc       1924
Asp Ser Lys Leu Thr Arg Val Phe Gln Gly Phe Phe Thr Gly Arg Gly
                465                 470                 475

cgt tcc tgc atg att gtc aat gtg aat ccc tgt gca tct acc tat gat       1972
Arg Ser Cys Met Ile Val Asn Val Asn Pro Cys Ala Ser Thr Tyr Asp
            480                 485                 490

gaa act ctt cat gtg gcc aag ttc tca gcc att gct agc cag ctt gtg       2020
Glu Thr Leu His Val Ala Lys Phe Ser Ala Ile Ala Ser Gln Leu Val
        495                 500                 505

cat gcc cca cct atg caa ctg gga ttc cca tcc ctg cac tcg ttc atc       2068
His Ala Pro Pro Met Gln Leu Gly Phe Pro Ser Leu His Ser Phe Ile
    510                 515                 520

aag gaa cat agt ctt cag gta tcc ccc agc tta gag aaa ggg gct aag       2116
Lys Glu His Ser Leu Gln Val Ser Pro Ser Leu Glu Lys Gly Ala Lys
525                 530                 535                 540

gca gac aca ggc ctt gat gat gat att gaa aat gaa gct gac atc tcc       2164
Ala Asp Thr Gly Leu Asp Asp Asp Ile Glu Asn Glu Ala Asp Ile Ser
                545                 550                 555

atg tat ggc aaa gag gag ctc cta caa gtt gtg gaa gcc atg aag aca       2212
Met Tyr Gly Lys Glu Glu Leu Leu Gln Val Val Glu Ala Met Lys Thr
            560                 565                 570

ctg ctt ttg aag gaa cga cag gaa aag cta cag ctg gag atg cat ctc       2260
Leu Leu Leu Lys Glu Arg Gln Glu Lys Leu Gln Leu Glu Met His Leu
        575                 580                 585
```

```
cga gat gaa att tgc aat gag atg gta gaa cag atg caa cag cgg gaa       2308
Arg Asp Glu Ile Cys Asn Glu Met Val Glu Gln Met Gln Gln Arg Glu
    590                 595                 600

cag tgg tgc agt gaa cat ttg gac acc caa aag gaa cta ttg gag gaa       2356
Gln Trp Cys Ser Glu His Leu Asp Thr Gln Lys Glu Leu Leu Glu Glu
605                 610                 615                 620

atg tat gaa gaa aaa cta aat atc ctc aag gag tca ctg aca agt ttt       2404
Met Tyr Glu Glu Lys Leu Asn Ile Leu Lys Glu Ser Leu Thr Ser Phe
                625                 630                 635

tac caa gaa gag att cag gag cgg gat gaa aag att gaa gag cta gaa       2452
Tyr Gln Glu Glu Ile Gln Glu Arg Asp Glu Lys Ile Glu Glu Leu Glu
            640                 645                 650

gct ctc ttg cag gaa gcc aga caa cag tca gtg gcc cat cag caa tca       2500
Ala Leu Leu Gln Glu Ala Arg Gln Gln Ser Val Ala His Gln Gln Ser
        655                 660                 665

ggg tct gaa ttg gcc cta cgg cgg tca caa agg ttg gca gct tct gcc       2548
Gly Ser Glu Leu Ala Leu Arg Arg Ser Gln Arg Leu Ala Ala Ser Ala
    670                 675                 680

tcc acc cag cag ctt cag gag gtt aaa gct aaa tta cag cag tgc aaa       2596
Ser Thr Gln Gln Leu Gln Glu Val Lys Ala Lys Leu Gln Gln Cys Lys
685                 690                 695                 700

gca gag cta aac tct acc act gaa gag ttg cat aag tat cag aaa atg       2644
Ala Glu Leu Asn Ser Thr Thr Glu Glu Leu His Lys Tyr Gln Lys Met
                705                 710                 715

tta gaa cca cca ccc tca gcc aag ccc ttc acc att gat gtg gac aag       2692
Leu Glu Pro Pro Pro Ser Ala Lys Pro Phe Thr Ile Asp Val Asp Lys
            720                 725                 730

aag tta gaa gag ggc cag aag aat ata agg ctg ttg cgg aca gag ctt       2740
Lys Leu Glu Glu Gly Gln Lys Asn Ile Arg Leu Leu Arg Thr Glu Leu
        735                 740                 745

cag aaa ctt ggt gag tct ctc caa tca gca gag aga gct tgt tgc cac       2788
Gln Lys Leu Gly Glu Ser Leu Gln Ser Ala Glu Arg Ala Cys Cys His
    750                 755                 760

agc act ggg gca gga aaa ctt cgt caa gcc ttg acc act tgt gat gac       2836
Ser Thr Gly Ala Gly Lys Leu Arg Gln Ala Leu Thr Thr Cys Asp Asp
765                 770                 775                 780

atc tta atc aaa cag gac cag act ctg gct gaa ctg cag aac aac atg       2884
Ile Leu Ile Lys Gln Asp Gln Thr Leu Ala Glu Leu Gln Asn Asn Met
                785                 790                 795

gtg cta gtg aaa ctg gac ctt cgg aag aag gca gca tgt att gct gag       2932
Val Leu Val Lys Leu Asp Leu Arg Lys Lys Ala Ala Cys Ile Ala Glu
            800                 805                 810

cag tat cat act gtg ttg aaa ctc caa ggc cag gtt tct gcc aaa aag       2980
Gln Tyr His Thr Val Leu Lys Leu Gln Gly Gln Val Ser Ala Lys Lys
        815                 820                 825

cgc ctt ggt acc aac cag gaa aat cag caa cca aac caa caa cca cca       3028
Arg Leu Gly Thr Asn Gln Glu Asn Gln Gln Pro Asn Gln Gln Pro Pro
```

```
    830                 835                 840

ggg aag aaa cca ttc ctt cga aat tta ctt ccc cga aca cca acc tgc      3076
Gly Lys Lys Pro Phe Leu Arg Asn Leu Leu Pro Arg Thr Pro Thr Cys
845                 850                 855                 860

caa agc tca aca gac tgc agc cct tat gcc cgg atc cta cgc tca cgg      3124
Gln Ser Ser Thr Asp Cys Ser Pro Tyr Ala Arg Ile Leu Arg Ser Arg
                865                 870                 875

cgt tcc cct tta ctc aaa tct ggg cct ttt ggc aaa aag tac taa          3169
Arg Ser Pro Leu Leu Lys Ser Gly Pro Phe Gly Lys Lys Tyr
            880                 885                 890

ggctgtgggg aaagagaaga gcagtcatgg ccctgaggtg ggtcagctac tctcctgaag    3229

aaataggtct cttttatgct ttaccatata tcaggaatta tatccaggat gcaatactca    3289

gacactagct tttttctcac ttttgtatta taaccaccta tgtaatctca tgttgttgtt    3349

ttttttttatt tacttatatg atttctatgc acacaaaaac agttatatta aagatattat    3409

tgttcacatt ttttattgaa ttccaaatgt agcaaaatca ttaaaacaaa ttataaaagg    3469

ga                                                                   3471
```

<210> 2
< 211> 890
< 212> PRT
< 213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Ser Gln Gly Ile Leu Ser Pro Pro Ala Gly Leu Leu Ser Asp Asp
1               5                   10                  15

Asp Val Val Val Ser Pro Met Phe Glu Ser Thr Ala Ala Asp Leu Gly
            20                  25                  30

Ser Val Val Arg Lys Asn Leu Leu Ser Asp Cys Ser Val Val Ser Thr
        35                  40                  45

Ser Leu Glu Asp Lys Gln Gln Val Pro Ser Glu Asp Ser Met Glu Lys
    50                  55                  60

Val Lys Val Tyr Leu Arg Val Arg Pro Leu Leu Pro Ser Glu Leu Glu
65                  70                  75                  80

Arg Gln Glu Asp Gln Gly Cys Val Arg Ile Glu Asn Val Glu Thr Leu
                85                  90                  95

Val Leu Gln Ala Pro Lys Asp Ser Phe Ala Leu Lys Ser Asn Glu Arg
            100                 105                 110

Gly Ile Gly Gln Ala Thr His Arg Phe Thr Phe Ser Gln Ile Phe Gly
```

```
        115                 120                 125

Pro Glu Val Gly Gln Ala Ser Phe Phe Asn Leu Thr Val Lys Glu Met
    130                 135                 140

Val Lys Asp Val Leu Lys Gly Gln Asn Trp Leu Ile Tyr Thr Tyr Gly
145                 150                 155                 160

Val Thr Asn Ser Gly Lys Thr His Thr Ile Gln Gly Thr Ile Lys Asp
                165                 170                 175

Gly Gly Ile Leu Pro Arg Ser Leu Ala Leu Ile Phe Asn Ser Leu Gln
            180                 185                 190

Gly Gln Leu His Pro Thr Pro Asp Leu Lys Pro Leu Leu Ser Asn Glu
        195                 200                 205

Val Ile Trp Leu Asp Ser Lys Gln Ile Arg Gln Glu Glu Met Lys Lys
    210                 215                 220

Leu Ser Leu Leu Asn Gly Gly Leu Gln Glu Glu Glu Leu Ser Thr Ser
225                 230                 235                 240

Leu Lys Arg Ser Val Tyr Ile Glu Ser Arg Ile Gly Thr Ser Thr Ser
                245                 250                 255

Phe Asp Ser Gly Ile Ala Gly Leu Ser Ser Ile Ser Gln Cys Thr Ser
            260                 265                 270

Ser Ser Gln Leu Asp Glu Thr Ser His Arg Trp Ala Gln Pro Asp Thr
        275                 280                 285

Ala Pro Leu Pro Val Pro Ala Asn Ile Arg Phe Ser Ile Trp Ile Ser
    290                 295                 300

Phe Phe Glu Ile Tyr Asn Glu Leu Leu Tyr Asp Leu Leu Glu Pro Pro
305                 310                 315                 320

Ser Gln Gln Arg Lys Arg Gln Thr Leu Arg Leu Cys Glu Asp Gln Asn
                325                 330                 335

Gly Asn Pro Tyr Val Lys Asp Leu Asn Trp Ile His Val Gln Asp Ala
            340                 345                 350

Glu Glu Ala Trp Lys Leu Leu Lys Val Gly Arg Lys Asn Gln Ser Phe
        355                 360                 365
```

```
Ala Ser Thr His Leu Asn Gln Asn Ser Ser Arg Ser His Ser Ile Phe
    370                 375                 380

Ser Ile Arg Ile Leu His Leu Gln Gly Glu Gly Asp Ile Val Pro Lys
385                 390                 395                 400

Ile Ser Glu Leu Ser Leu Cys Asp Leu Ala Gly Ser Glu Arg Cys Lys
                405                 410                 415

Asp Gln Lys Ser Gly Glu Arg Leu Lys Glu Ala Gly Asn Ile Asn Thr
            420                 425                 430

Ser Leu His Thr Leu Gly Arg Cys Ile Ala Ala Leu Arg Gln Asn Gln
        435                 440                 445

Gln Asn Arg Ser Lys Gln Asn Leu Val Pro Phe Arg Asp Ser Lys Leu
    450                 455                 460

Thr Arg Val Phe Gln Gly Phe Phe Thr Gly Arg Gly Arg Ser Cys Met
465                 470                 475                 480

Ile Val Asn Val Asn Pro Cys Ala Ser Thr Tyr Asp Glu Thr Leu His
                485                 490                 495

Val Ala Lys Phe Ser Ala Ile Ala Ser Gln Leu Val His Ala Pro Pro
            500                 505                 510

Met Gln Leu Gly Phe Pro Ser Leu His Ser Phe Ile Lys Glu His Ser
        515                 520                 525

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

Leu Asp Asp Asp Ile Glu Asn Glu Ala Asp Ile Ser Met Tyr Gly Lys
545                 550                 555                 560

Glu Glu Leu Leu Gln Val Val Glu Ala Met Lys Thr Leu Leu Leu Lys
                565                 570                 575

Glu Arg Gln Glu Lys Leu Gln Leu Glu Met His Leu Arg Asp Glu Ile
            580                 585                 590

Cys Asn Glu Met Val Glu Gln Met Gln Gln Arg Glu Gln Trp Cys Ser
        595                 600                 605

Glu His Leu Asp Thr Gln Lys Glu Leu Leu Glu Glu Met Tyr Glu Glu
    610                 615                 620
```

```
Lys Leu Asn Ile Leu Lys Glu Ser Leu Thr Ser Phe Tyr Gln Glu Glu
625                 630                 635                 640

Ile Gln Glu Arg Asp Glu Lys Ile Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu Gln
                645                 650                 655

Glu Ala Arg Gln Gln Ser Val Ala His Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu
            660                 665                 670

Ala Leu Arg Arg Ser Gln Arg Leu Ala Ala Ser Ala Ser Thr Gln Gln
        675                 680                 685

Leu Gln Glu Val Lys Ala Lys Leu Gln Gln Cys Lys Ala Glu Leu Asn
    690                 695                 700

Ser Thr Thr Glu Glu Leu His Lys Tyr Gln Lys Met Leu Glu Pro Pro
705                 710                 715                 720

Pro Ser Ala Lys Pro Phe Thr Ile Asp Val Asp Lys Lys Leu Glu Glu
                725                 730                 735

Gly Gln Lys Asn Ile Arg Leu Leu Arg Thr Glu Leu Gln Lys Leu Gly
            740                 745                 750

Glu Ser Leu Gln Ser Ala Glu Arg Ala Cys Cys His Ser Thr Gly Ala
        755                 760                 765

Gly Lys Leu Arg Gln Ala Leu Thr Thr Cys Asp Asp Ile Leu Ile Lys
    770                 775                 780

Gln Asp Gln Thr Leu Ala Glu Leu Gln Asn Asn Met Val Leu Val Lys
785                 790                 795                 800

Leu Asp Leu Arg Lys Lys Ala Ala Cys Ile Ala Glu Gln Tyr His Thr
                805                 810                 815

Val Leu Lys Leu Gln Gly Gln Val Ser Ala Lys Lys Arg Leu Gly Thr
            820                 825                 830

Asn Gln Glu Asn Gln Gln Pro Asn Gln Gln Pro Pro Gly Lys Lys Pro
        835                 840                 845

Phe Leu Arg Asn Leu Leu Pro Arg Thr Pro Thr Cys Gln Ser Ser Thr
    850                 855                 860

Asp Cys Ser Pro Tyr Ala Arg Ile Leu Arg Ser Arg Arg Ser Pro Leu
865                 870                 875                 880

Leu Lys Ser Gly Pro Phe Gly Lys Lys Tyr
                885                 890
```

<210> 3
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Una secuencia peptídica artificial

<400> 3
Leu Leu Ser Asp Asp Asp Val Val Val
1 5

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

<220>
< 223> Una secuencia peptídica artificial

<400> 4
Cys Ile Ala Glu Gln Tyr His Thr Val
1 5

<210> 5
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Una secuencia peptídica artificial

<400> 5
Ala Gln Pro Asp Thr Ala Pro Leu Pro Val
1 5 10

<210> 6
< 211> 21
< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> Un cebador sintetizado de forma artificial mediante PCR

<400> 6
ctacaagcac ccaaggactc t 21

<210> 7
< 211> 20
< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> Un cebador sintetizado de forma artificial mediante PCR

<400> 7
agatggagaa gcgaatgttt 20

<210> 8
< 211> 23
< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> Un cebador sintetizado de forma artificial mediante PCR

<400> 8
catccacgaa actaccttca act 23

<210> 9
< 211> 23
< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> Un cebador sintetizado de forma artificial mediante PCR

<400> 9
tctccttaga gagaagtggg gtg 23

<210> 10
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> Artificial

<220>
< 223> Un péptido sintetizado de forma artificial

<400> 10
Ser Leu Tyr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu
1 5

<210> 11
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> ratón

<400> 11
Leu Leu Ser Asp Glu Asp Val Val Asp
1 5

<210> 12
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> ratón

<400> 12
Ala Gln Pro Asp Thr Val Pro Val Ser Val
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un oligopéptido aislado de menos de 15 aminoácidos, en donde el oligopéptido se selecciona a partir del grupo que consiste en:

(a) un oligopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 4 y 5; y

(b) un oligopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 4 y 5, en la que 1 o 2 aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos, y en donde el oligopéptido tiene capacidad de inducir linfocitos T citotóxicos (CTL).

2. El oligopéptido según la reivindicación 1, en donde el oligopéptido tiene al menos una sustitución seleccionada entre el grupo que consiste en:

(a) el segundo aminoácido desde el extremo N-terminal es leucina o metionina, y

(b) el aminoácido C-terminal es valina o leucina.

3. El oligopéptido según la reivindicación 1, que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 4 y 5.

4. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/o la prevención de la recurrencia postoperatoria del mismo, en donde la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o varios oligopéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un polinucleótido que codifica el oligopéptido.

5. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 4, que se formula para la administración a un sujeto cuyo antígeno del HLA es HLA-A2.

6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 4, en donde el cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP).

7. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 4, que es una vacuna.

8. Un exosoma que presenta en su superficie un complejo que comprende el oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un antígeno del HLA.

9. El exosoma según la reivindicación 8, en el que el antígeno del HLA es HLA-A2.

10. El oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en un método para inducir una célula presentadora de antígeno.

11. Un método *in vitro* para inducir una célula presentadora de antígeno, en donde el método comprende una etapa seleccionada a partir del grupo que consiste en:

(a) poner en contacto una célula presentadora de antígeno con el oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, e

(b) introducir un polinucleótido que codifica el oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una célula presentadora de antígeno.

12. El oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en un método para inducir un CTL.

13. Un método *in vitro* para inducir un CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada a partir del grupo que consiste en:

(a) poner en contacto un linfocito T positivo para CD8 con una célula presentadora de antígeno y/o un exosoma que presenta el oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en su superficie, e

(b) introducir en un linfocito T positivo para CD8 un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad del receptor de linfocitos T (TCR) que se une a un complejo del oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un antígeno del HLA en la superficie de una célula presentadora de antígeno.

14. Un CTL aislado, que se dirige al oligopéptido según la reivindicación 1 o 2.

15. El CTL según la reivindicación 14, que es capaz de unirse a un complejo del oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un antígeno del HLA en la superficie de una célula presentadora de antígeno.

16. El CTL aislado, que se induce mediante el uso del oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

17. El CTL según la reivindicación 16, que es inducido por el método según la reivindicación 13.

18. Una célula presentadora de antígeno aislada que presenta en su superficie un complejo de un antígeno del HLA y el oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

19. La célula presentadora de antígeno según la reivindicación 18, que es inducida empleando el oligopéptido según la reivindicación 10 o por el método según la reivindicación 11.

20. Una vacuna para uso en un método para inducir una respuesta inmune contra el cáncer en un sujeto, en donde la vacuna al menos un ingrediente activo seleccionado a partir del grupo que consiste en:

(a) uno o varios oligopéptidos según una cualquiera las reivindicaciones 1 a 3;

(b) uno o varios polinucleótidos que codifican el oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;

(c) uno o varios CTLs aislados según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17;

(d) una o varias células presentadoras de antígeno aisladas según la reivindicación 18 o 19.

21. Una composición farmacéutica para uso en la inducción de un CTL, en donde la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o varios oligopéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un polinucleótido que codifica el oligopéptido o una célula presentadora de antígeno aislada según la reivindicación 18 o 19.

22. Uso de un ingrediente activo seleccionado a partir del grupo que consiste en:

(a) uno o varios oligopéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;

(b) uno o varios polinucleótidos que codifican el oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una forma expresable;

(c) una o varias células presentadoras de antígeno que presentan el oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

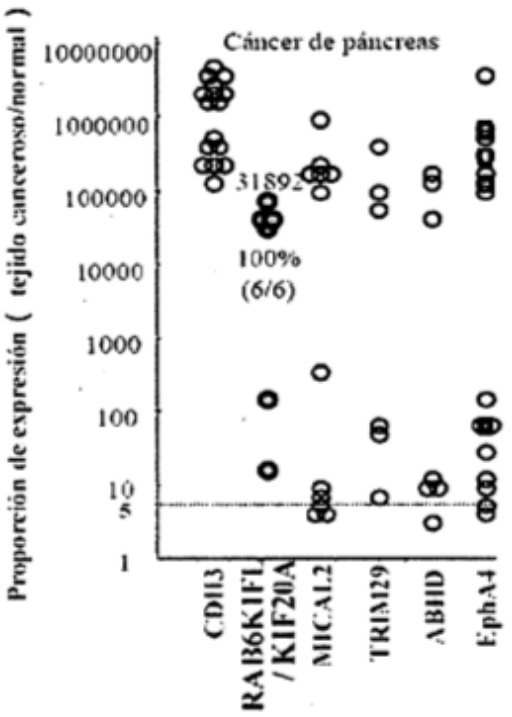
(d) uno o varios CTLs que son capaces de unirse a un complejo del oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un antígeno del HLA en la superficie de una célula presentadora de antígeno,

en la preparación de una composición farmacéutica o un agente farmacéutico para el tratamiento del cáncer.

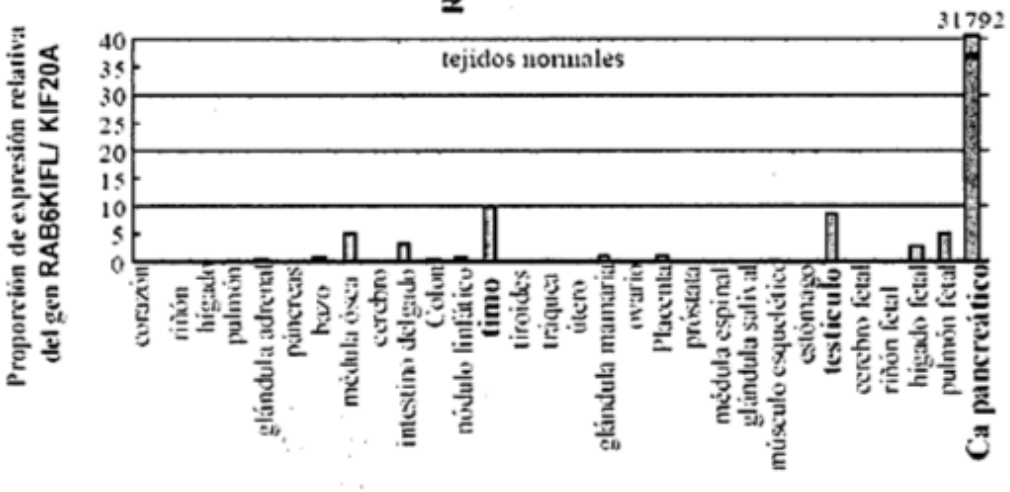
23. Un polinucleótido que codifica el oligopéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

[Fig. 1]

A



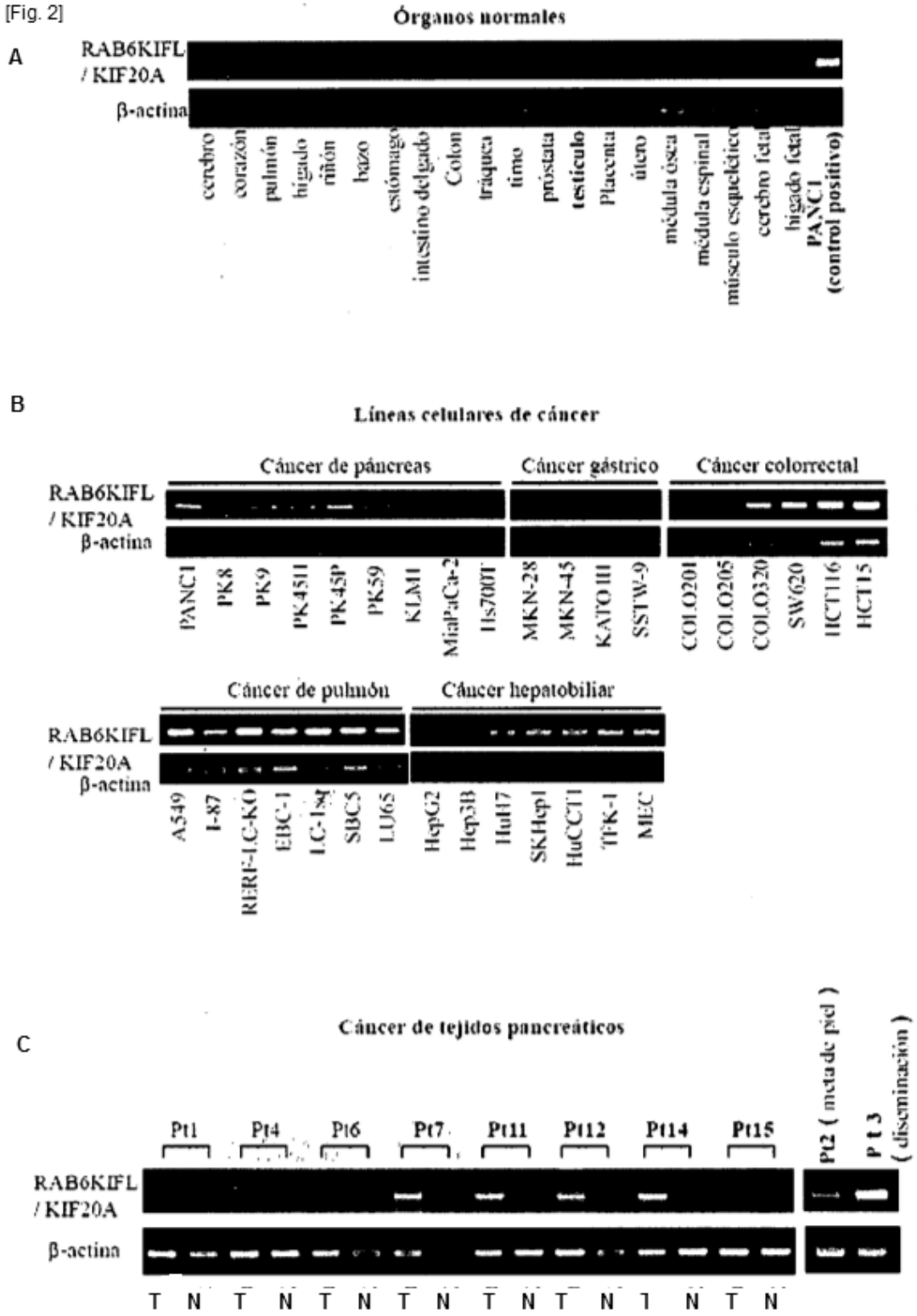
B



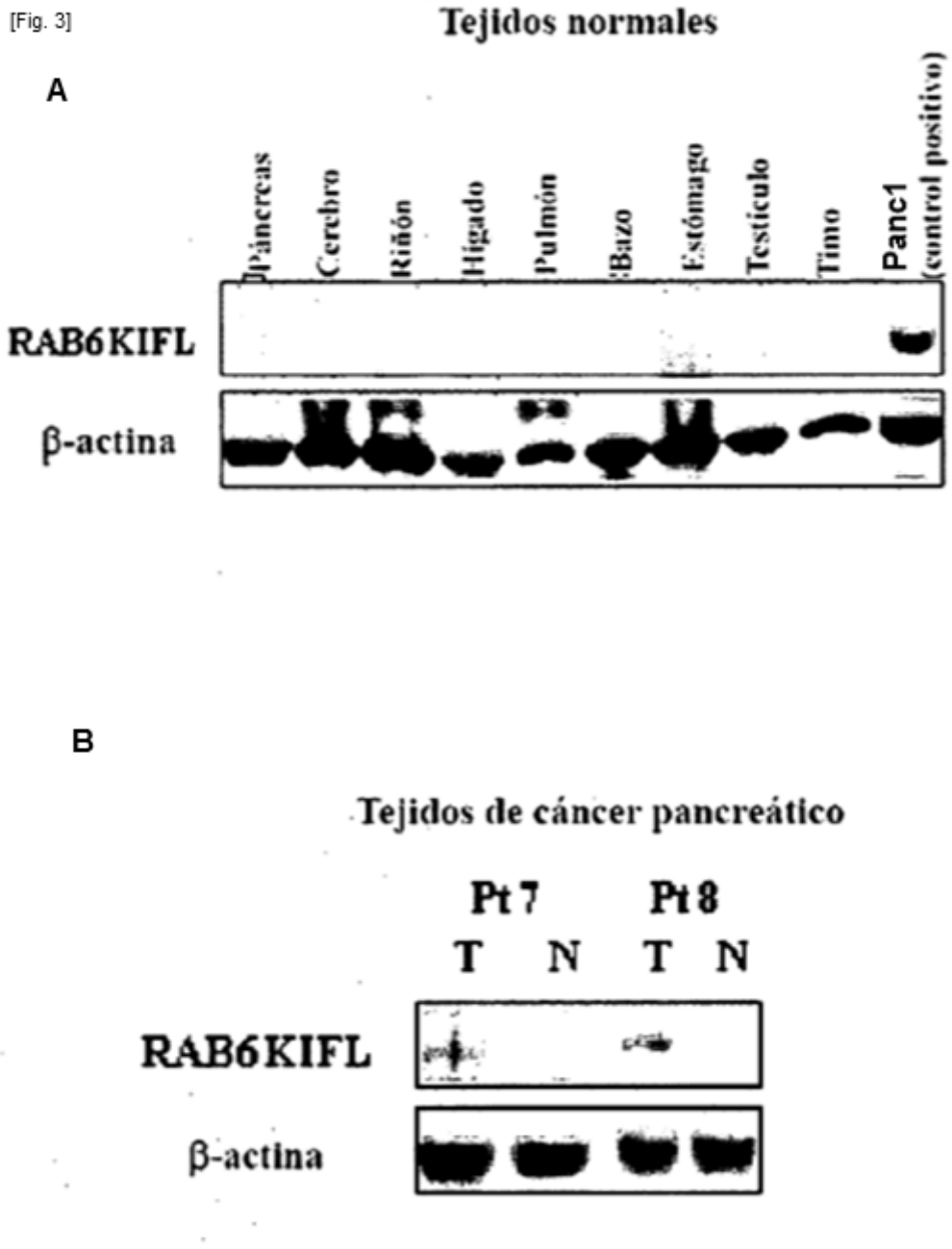
C

Diversas formas malignas	n	Índice positivo (%)	Proporción de expresión relativa (media)
Cáncer de páncreas	**6**	**100**	**31892**
Cáncer de pulmón de cél. peq.	15	100	22
Cáncer de vejiga	31	97	20471
Cáncer de pulmón de cél. no peq.	22	91	25779
Carcinoma colangiocelular	11	64	3781
Cáncer de mama	61	44	322
Cáncer de próstata	36	31	4
Carcinoma de células renales	11	27	5
Cáncer de esófago	13	15	3
Cáncer colorrectal	31	3	2
Cáncer gástrico	4	0	0

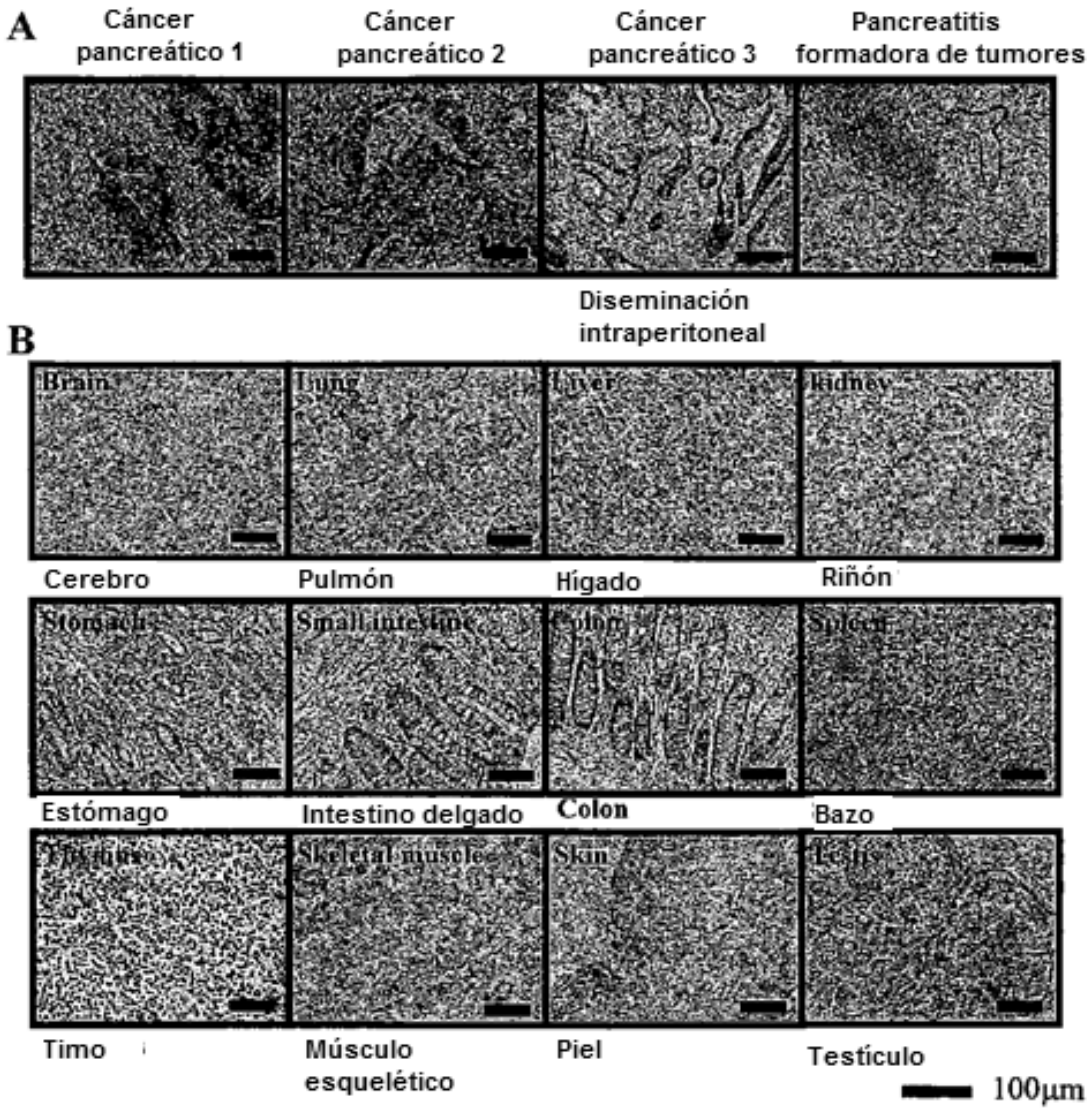
[Fig. 2]


A
Órganos normales
RAB6KIFL / KIF20A
β-actina
cerebro
corazón
pulmón
hígado
riñón
bazo
estómago
intestino delgado
Colon
tráquea
timo
próstata
testículo
Placenta
útero
médula ósea
médula espinal
músculo esquelético
cerebro fetal
hígado fetal
PANC1 (control positivo)
B
Líneas celulares de cáncer
Cáncer de páncreas
Cáncer gástrico
Cáncer colorrectal
RAB6KIFL / KIF20A
β-actina
PANC1
PK8
PK9
PK45H
PK45P
PK59
KLM1
MiaPaCa-2
Us700T
MKN-28
MKN-45
KATO III
SSTW-9
COLO201
COLO205
COLO320
SW620
HCT116
HCT15
Cáncer de pulmón
Cáncer hepatobiliar
RAB6KIFL / KIF20A
β-actina
A549
I-87
RERF-LC-KO
EBC-1
LC-1sq
SBC5
LU65
HepG2
Hep3B
Huh7
SKHep1
HuCCT1
TFK-1
MEC
C
Cáncer de tejidos pancreáticos
Pt1
Pt4
Pt6
Pt7
Pt11
Pt12
Pt14
Pt15
Pt2 (meta de piel)
Pt 3 (diseminación)
RAB6KIFL / KIF20A
β-actina
T N T N T N T N T N T N T N T N

[Fig. 3]

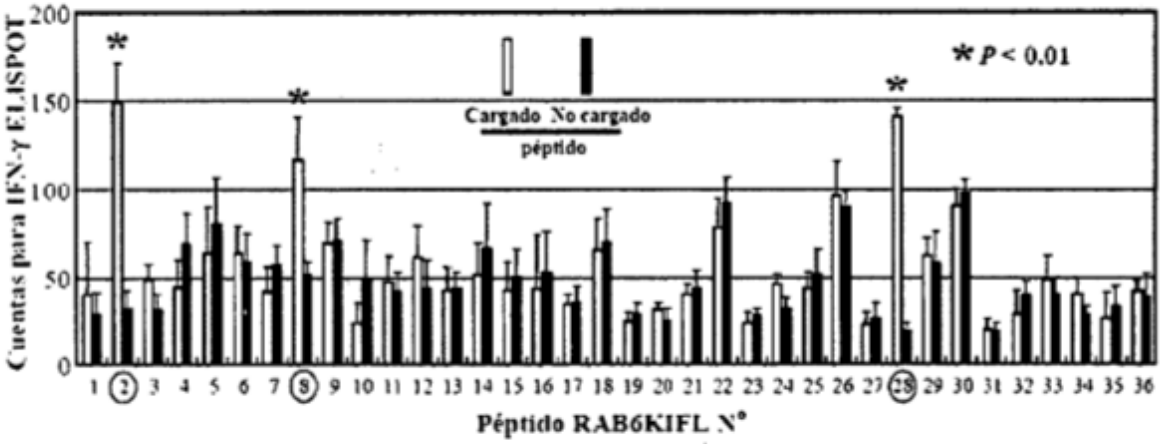

Tejidos normales
A
Páncreas
Cerebro
Riñón
Hígado
Pulmón
Bazo
Estómago
Testículo
Timo
Panc1 (control positivo)
RAB6KIFL
β-actina
B
Tejidos de cáncer pancreático
Pt 7
Pt 8
T
N
T
N
RAB6KIFL
β-actina

[Fig. 4]

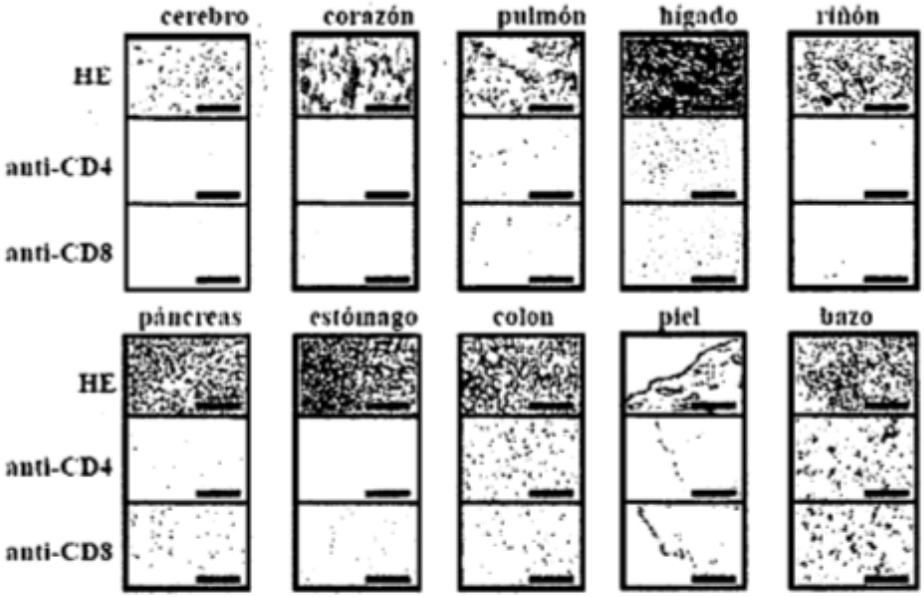

A
Cáncer pancreático 1
Cáncer pancreático 2
Cáncer pancreático 3
Pancreatitis formadora de tumores
Diseminación intraperitoneal
B
Brain
Lung
Liver
Kidney
Cerebro
Pulmón
Hígado
Riñón
Stomach
Small intestine
Colon
Spleen
Estómago
Intestino delgado
Colon
Bazo
Thymus
Skeletal muscle
Skin
Testis
Timo
Músculo esquelético
Piel
Testículo
100μm

[Fig. 5]

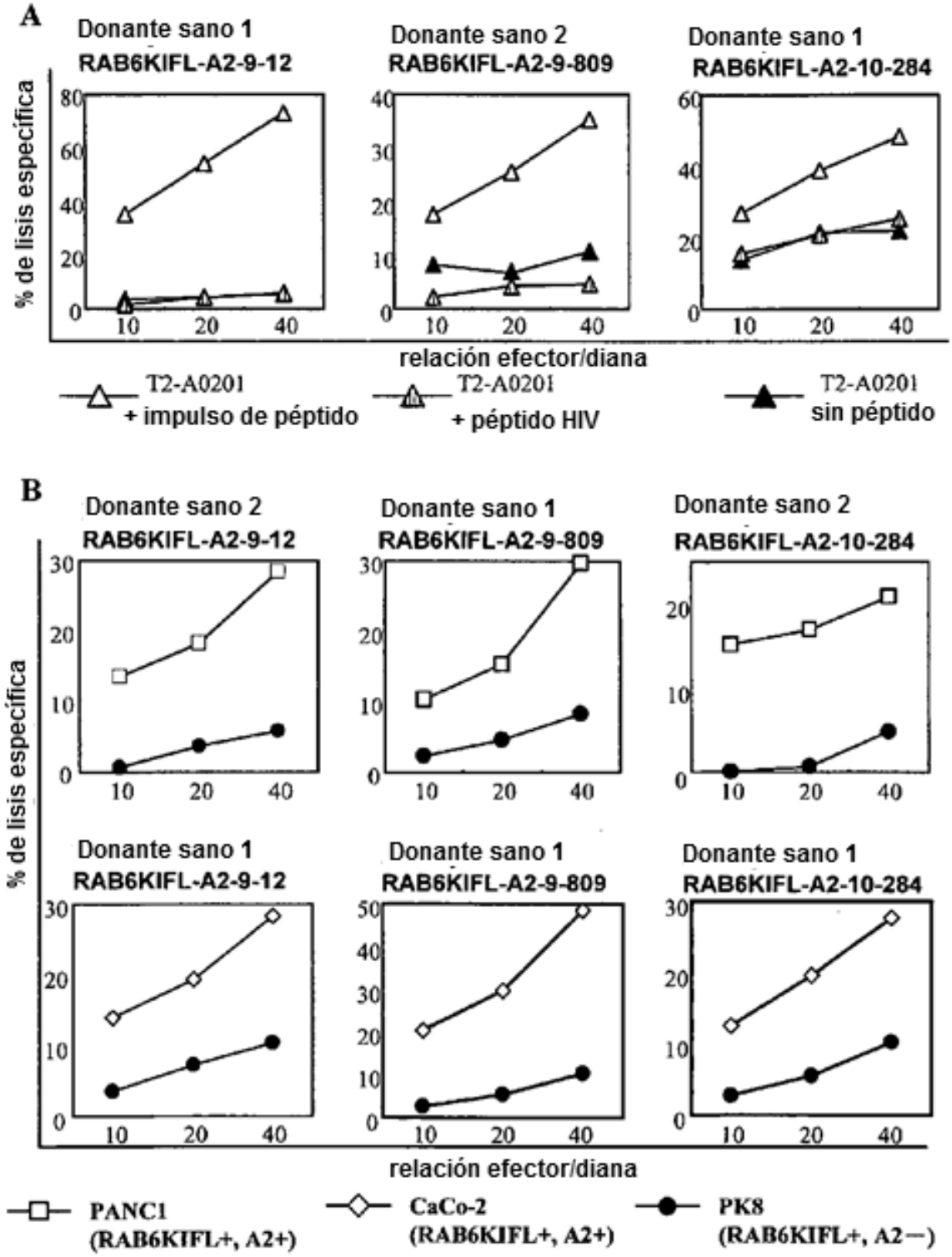
A


Cuentas para IFN-γ ELISPOT
200
150
100
50
0
* P < 0.01
Cargado No cargado
péptido
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
Péptido RAB6KIFL N°

B

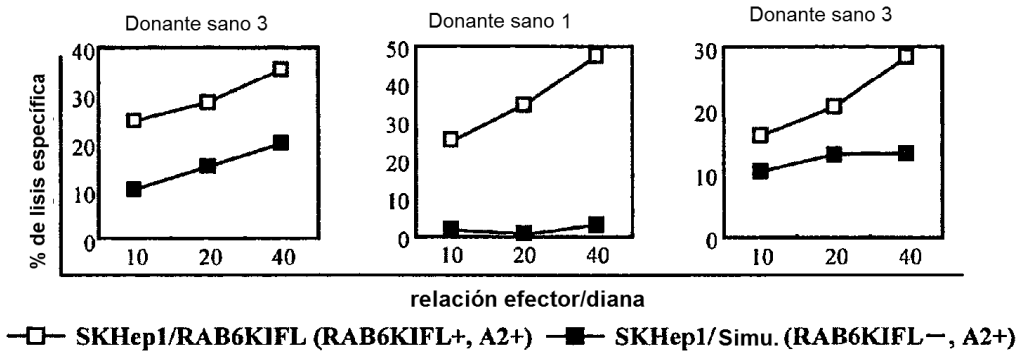

cerebro
corazón
pulmón
hígado
riñón
HE
anti-CD4
anti-CD8
páncreas
estómago
colon
piel
bazo
HE
anti-CD4
anti-CD8

[Fig. 6A-B]

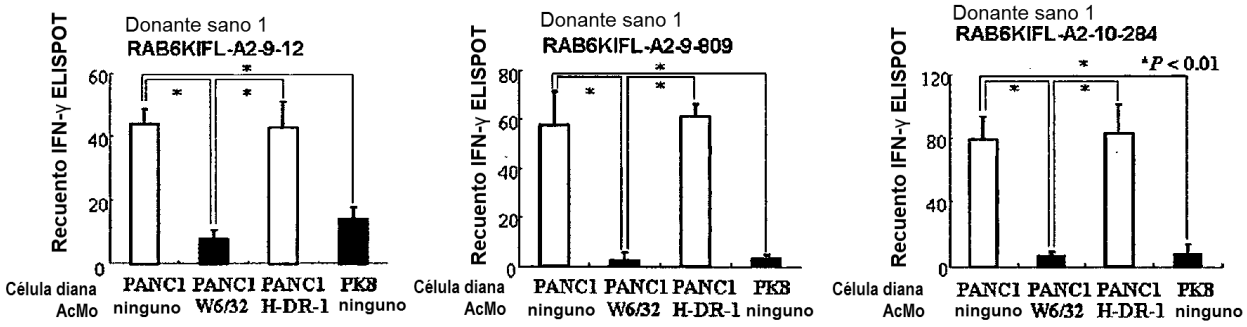

A
Donante sano 1
RAB6KIFL-A2-9-12
Donante sano 2
RAB6KIFL-A2-9-809
Donante sano 1
RAB6KIFL-A2-10-284
% de lisis específica
relación efector/diana
T2-A0201
+ impulso de péptido
T2-A0201
+ péptido HIV
T2-A0201
sin péptido
B
Donante sano 2
RAB6KIFL-A2-9-12
Donante sano 1
RAB6KIFL-A2-9-809
Donante sano 2
RAB6KIFL-A2-10-284
Donante sano 1
RAB6KIFL-A2-9-12
Donante sano 1
RAB6KIFL-A2-9-809
Donante sano 1
RAB6KIFL-A2-10-284
% de lisis específica
relación efector/diana
PANC1
(RAB6KIFL+, A2+)
CaCo-2
(RAB6KIFL+, A2+)
PK8
(RAB6KIFL+, A2−)

[Fig. 6C-D]

C


Donante sano 3
Donante sano 1
Donante sano 3
% de lisis específica
relación efector/diana
SKHep1/RAB6KIFL (RAB6KIFL+, A2+)
SKHep1/Simu. (RAB6KIFL−, A2+)

D


Donante sano 1
RAB6KIFL-A2-9-12
Donante sano 1
RAB6KIFL-A2-9-809
Donante sano 1
RAB6KIFL-A2-10-284
Recuento IFN-γ ELISPOT
*P < 0.01
Célula diana
AcMo
PANC1 PANC1 PANC1 PK8
ninguno W6/32 H-DR-1 ninguno