

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 011**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2009 E 09808048 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2328600**

54 Título: **Péptido de epítopo HIG2 y URLC10 y vacunas que contienen el mismo**

30 Prioridad:

19.08.2008 US 89972 P

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

08.04.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TSUNODA, TAKUYA;
OHSAWA, RYUJI y
YOSHIMURA, SACHIKO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 566 011 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptido de epítipo HIG2 y URLC10 y vacunas que contienen el mismo

Campo TécnicoCampo Técnico

- 5 La presente invención se refiere al campo de la ciencia biológica, más específicamente al campo de la terapia del cáncer. En particular, la presente invención se refiere a nuevos péptidos que son extremadamente eficaces como vacunas contra el cáncer, y a fármacos para el tratamiento y prevención de tumores.

Técnica de Antecedentes

- 10 Se ha demostrado que los CTLs CD8 positivos reconocen péptidos de epítipos derivados de los antígenos asociados a tumores (TAAs) que se encuentran en la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, y luego matan a las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia de antígeno de melanoma (MAGE) como el primer ejemplo de TAAs, se han descubierto muchos otros TAAs, principalmente a través de enfoques inmunológicos (NPL 1: Boon T, Int J Cancer 8 de mayo de 1993, 54(2): 177-80; NPL 2: Boon T y van der Bruggen P, J Exp Med 1 de marzo de 1996, 183(3): 725-9). Algunos de los TAAs están siendo actualmente
15 sometidos a desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas.

- La identificación de nuevos TAAs capaces de inducir respuestas inmunes antitumorales potentes y específicas, garantiza un desarrollo adicional y una aplicación clínica de las estrategias de vacunación con péptidos para diversos tipos de cáncer (NPL 3: Harris CC, J Natl Cancer Inst 16 de octubre de 1996, 88(20): 1442-55; NPL 4: Butterfield LH et al, Cancer Res 1 de julio de 1999, 59(13): 3134-42; NPL 5: Vissers JL et al, Cancer Res 1 de noviembre de 1999, 59(21): 5554-9; NPL 6: van der Burg SH et al, J Immunol 1 de mayo de 1996, 156(9): 3308-14; NPL 7: Tanaka F et al, Cancer Res 15 de octubre de 1997, 57(20): 4465-8; NPL 8: Fujie T et al, Int J Cancer 18 de enero de 1999, 80(2): 169-72; NPL 9: Kikuchi M et al, Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81(3): 459-66; NPL 10: Oiso M et al, Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81(3): 387-94). Hasta la fecha, ha habido varios informes de ensayos clínicos que utilizan estos péptidos derivados de antígenos asociados a tumores. Desafortunadamente, hasta la
20 fecha sólo 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 octubre de 2002, 20(20): 4169-80; NPL 12: Coulie PG et al., Immunol Rev octubre de 2002, 188:33-42; NPL 13: Rosenberg SA et al, Nat Med septiembre de 2004, 10(9): 909-15).

- Hay varios tipos de HLA-A en el mundo. De los genotipos de HLA conocidos, los genotipos de HLA-A0201, HLA-A0206, HLA-A1101, HLA-A2402, HLA-A2601, HLA-A3101 y HLA-A3303 se sabe que tienen una frecuencia de
30 expresión más alta que otros tipos (NPL 14: Lee K W, et al, Tissue Antigens 2005: 65:437-447). Sin embargo, cada uno de los genotipos tiene una secuencia diferente de aminoácidos y una afinidad diferente contra el péptido del epítipo (NPL 15: Journal of Immunological Methods, (1995), Vol 185, págs. 181-190.). Por ejemplo, el residuo de aminoácidos del dominio alfa 1 del genotipo HLA-A0206 difiere del genotipo HLA-A0201 (es decir, el residuo tirosina en el aminoácido 33 de SEQ ID NO: 8 está reemplazado por fenilalanina). Teniendo en cuenta estas diferencias, es
35 poco probable que un péptido de epítipo restringido por HLA-A0201 sea útil para un paciente que posee el genotipo HLA-A0206. Por consiguiente, un péptido útil para diversos tipos de pacientes sigue siendo un objetivo en la técnica.

- Se confirma que HIG2 (gen 2 inducible por hipoxia) y URLC10 (al que también se alude como LY6K; complejo de antígeno de linfocito 6, locus K) están supra-regulados en varios tejidos de cáncer tales como cáncer renal y cáncer de pulmón por el análisis de micromatrices (PTL 1: documento WO2005/019475, PTL 2: documento
40 WO2004/031413). Por consiguiente, HIG2 y URLC10 son objetivos interesantes para la inmunoterapia del cáncer y péptidos de epítipos inductores de CTL derivados de los mismos son buscados en la técnica.

- El documento WO2005/019475 describe muchos genes, incluido HIG2, que está sobre-expresado en carcinoma de células renales/RCC. También se describen ARNs y anticuerpos, así como péptidos inductores de CTL con el propósito de establecer estrategias para el tratamiento del cáncer. Además, con respecto a HIG2, experimentos que demuestran una proliferación celular potenciada como resultado de la sobre-expresión de HIG2 y una supresión de la proliferación celular debida a ARNs y anticuerpos se describen en el Ejemplo 4 y los Ejemplos 5-6 del documento WO2005/019475. Sin embargo, mientras que el documento WO2005/019475 describe que se pueden utilizar péptidos inductores de CTL como una estrategia contra el cáncer, la descripción está limitada al conocimiento común general, y no existen datos científicos que especifiquen cual de los numerosos antígenos asociados a tumores (TAAs) del documento WO2005/019475 pueda realmente utilizarse como un antígeno diana en la estrategia
45 terapéutica mediada por CTL.
50

El documento WO2006/090810 enseña no sólo la sobre-expresión de URLC10 en cáncer de pulmón, sino también un método para identificar péptidos de epítipos inductores de CTL. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 70 descrita en D2 (Tabla 2B) es idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2 en la presente solicitud. Sin embargo, el

documento WO2006/090810 falla en describir y/o confirmar el efecto inductor de CTL de las SEQ ID NOs: 2 ó 1 reivindicadas.

5 El documento WO2008/102557 (documento intermedio) muestra que secuencias idénticas a algunas de las secuencias de la presente solicitud (SEQ ID NO: 117/HIG2/A02 y SEQ ID NO: 288/URLC10/A02) son capaces de inducir CTLs y son terapéuticamente eficaces contra el cáncer. No obstante, las enseñanzas de estas secuencias en el documento WO2008/102557 están limitadas a un efecto específico para el antígeno restringido por HLA-A02, mientras que el uso reivindicado en la presente solicitud está limitado al antígeno restringido por HLA-A0206.

Lista de Citas

Bibliografía de No Patentes

- 10
- [NPL 1]: Boon T, Int J Cancer 8 de mayo de 1993, 54(2): 177-80
 - [NPL 2]: Boon T y van der Bruggen P, J Exp Med 1 de marzo de 1996, 183(3): 725-9
 - [NPL 3]: Harris CC, J Natl Cancer Inst 16 de octubre de 1996, 88(20): 1442-55
 - [NPL 4]: Butterfield LH et al., Cancer Res 1 de julio de 1999, 59(13): 3134-42
 - [NPL 5]: Vissers JL et al., Cancer Res 1 de noviembre de 1999, 59(21): 5554-9

15

 - [NPL 6]: van der Burg SH et al., J Immunol 1 de mayo de 1996, 156(9): 3308-14
 - [NPL 7]: Tanaka F et al., Cancer Res 15 de octubre de 1997, 57(20): 4465-8
 - [NPL 8]: Fujie T et al., Int J Cancer 18 de enero de 1999, 80(2): 169-72
 - [NPL 9]: Kikuchi M et al, Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81(3): 459-66
 - [NPL 10]: Oiso M et al., Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81 (3): 387-94

20

 - [NPL 11]: Belli F et al., J Clin Oncol 15 de octubre de 2002, 20(20): 4169-80
 - [NPL 12]: Coulie PG et al., Immunol Rev octubre de 2002, 188: 33-42
 - [NPL 13]: Rosenberg SA et al., Nat Med septiembre de 2004, 10(9): 909-15
 - [NPL 14]: NPL. Lee KW, et al., Tissue Antigens 2005: 65: 437-447
 - [NPL 15]: Journal of Immunological Methods, (1995), Vol. 185, págs. 181-190

25 Bibliografía de Patentes

- [PTL 1]: documento WO2005/019475
- [PTL 2]: documento WO2004/031413
- [PTL 3]: documento WO2006/090810
- [PTL 4]: documento WO2008/102557

30 Sumario de la Invención

35 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de una nueva aplicación de dos péptidos, que tienen una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En el contexto de la presente invención, células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) obtenidas de un donante sano se estimularon con péptidos candidatos derivados de HIG2 o URLC10. Se establecieron CTLs que reconocen específicamente células diana HLA-A0206 positivas pulsadas con los respectivos péptidos candidatos, y péptidos de epítomos restringidos por HLA-A0206 que pueden inducir respuestas inmunes potentes y específicas contra HIG2 o URLC10 presentadas en la superficie de células diana.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar péptidos que tengan la capacidad de inducción de CTL, así como una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ó 2.

Quando se administran a un sujeto, cuyo antígeno HLA es HLA-A0206, los presentes péptidos se presentan en la superficie de células presentadoras de antígeno y, a continuación, inducen CTLs que fijan como objetivo a los respectivos péptidos.

5 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar células presentadoras de antígeno y exosomas que presenten cualquiera de los presentes péptidos con el antígeno HLA-A0206, así como métodos para inducir células presentadoras de antígeno.

10 Una respuesta inmune anti-tumor es inducida por la administración de los presentes polipéptidos HIG2 o URLC10 o polinucleótido que codifica los polipéptidos, así como exosomas y células presentadoras de antígeno que presentan los polipéptidos HIG2 o URLC10. Por lo tanto, es aún otro objeto de la presente invención proporcionar agentes farmacéuticos que contengan los polipéptidos o polinucleótidos que los codifican, así como los exosomas y células presentadoras de antígeno como sus ingredientes activos que están destinados a la administración a un sujeto, cuyo antígeno HLA es HLA-A0206. Los agentes farmacéuticos de la presente invención encuentran uso como vacunas.

15 Además, es un objeto adicional de la presente invención proporcionar métodos para el tratamiento y/o la profilaxis (es decir, prevención) de cánceres (tumores), y/o la prevención de la recurrencia postoperatoria de los mismos, así como métodos para inducir CTLs, métodos para inducir una respuesta inmune contra el cáncer (tumores) y también inmunidad anti-tumor, en el que un sujeto tiene antígeno HLA-A0206, incluyendo estos métodos la etapa de administrar los péptidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, exosomas o las células presentadoras de antígeno que presentan la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o los agentes farmacéuticos de la invención. Además, los CTLs de la presente invención también encuentran uso como vacunas contra el cáncer. Ejemplos de cánceres diana incluyen, pero no se limitan a cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, NSCLC, osteosarcoma, cáncer de páncreas y tumores de tejidos blandos.

20 Ha de entenderse que tanto el resumen que antecede de la invención y la siguiente descripción detallada son realizaciones a modo de ejemplo y no restrictivas de la invención u otras realizaciones alternativas de la invención.

Breve Descripción de los Dibujos

25 Diversos aspectos y aplicaciones de la presente invención resultarán evidentes para el experto en la técnica tras la consideración de la breve descripción de las figuras y la descripción detallada de la presente invención y sus formas de realización preferidas que siguen:

30 [fig. 1] La Figura 1 incluye una serie de fotografías que representan los resultados del ensayo de IFN-gamma ELISPOT en CTLs que fueron inducidos con un péptido derivado de HIG2. Los CTLs en los pocillos n° 1, n° 2, n° 5, n° 7, n° 8, n° 10, n° 13 y n° 14 estimulados con HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) mostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica que las células diana fueron pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica que las células diana no habían sido pulsadas con péptido alguno.

35 [fig. 2] La Figura 2 representa una serie de gráficos de líneas que muestran los resultados del establecimiento de líneas de CTL estimuladas con HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) con ensayo IFN-gamma ELISA. Se demostró que las líneas de CTL establecidas mediante estimulación con HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) mostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica que las células diana fueron pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica que las células diana no habían sido pulsadas con péptido alguno.

40 [fig. 3] La Figura 3 representa un gráfico de líneas que muestra los resultados del establecimiento de un clon de CTL estimulado con HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) con ensayo IFN-gamma ELISA. Los resultados demuestran que el clon CTL establecido mediante estimulación con HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) mostró una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica que las células diana fueron pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica que las células diana no habían sido pulsadas con péptido alguno.

45 [fig. 4] La Figura 4 representa un gráfico de líneas que muestra la actividad de CTL específica contra las células diana que expresan HIG2 y HLA-A*0206. Células COS7 transfectadas con HLA-A*0206 solo y pulsadas con un péptido apropiado derivado de HIG2, o con HIG2 solo se prepararon como control. El clon CTL establecido con HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) mostró una alta actividad de CTL específica contra células COS7 transfectadas tanto con HIG2 como con HLA-A0206 (marca de rombo negro). Por otra parte, no se detectó actividad CTL específica significativa contra células diana que expresan HLA-A0206 (marca triangular en blanco) o HIG2 (círculo en blanco).

50 [fig. 5] La Figura 5 incluye una serie de fotografías que representan los resultados del ensayo de IFN-gamma ELISPOT en CTLs que fueron inducidos con un péptido derivado de URCL10. Los CTLs en el pocillo n° 7 estimulados con URCL10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2) mostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica que las células diana fueron pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica que las células diana no habían sido pulsadas con péptido alguno.

[fig. 6] La Figura 6 representa un gráfico de líneas que muestra los resultados del establecimiento de líneas de CTL estimuladas con URCL10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2) con ensayo IFN-gamma ELISA. Los resultados demuestran que la línea de CTL establecida mediante estimulación con URCL10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2) mostró una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica que las células diana fueron pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica que las células diana no habían sido pulsadas con péptido alguno.

[fig. 7] La Figura 7 representa un gráfico de líneas que muestra los resultados del establecimiento de líneas de CTL estimuladas con URCL10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2) con ensayo IFN-gamma ELISA. Los resultados demuestran que el clon CTL establecido mediante estimulación con URCL10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2) mostró una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica que las células diana fueron pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica que las células diana no habían sido pulsadas con péptido alguno.

[fig. 8] La Figura 8 representa un gráfico de líneas que muestra la actividad de CTL específica contra las células diana que expresan URLC10 y HLA-A*0206. Células COS7 transfectadas con la longitud completa del gen URLC10 solo o con el gen HLA-A*0206 solo se prepararon como control. El clon CTL establecido con URCL10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2) mostró una alta actividad de CTL específica contra células COS7 transfectadas tanto con HIG2 como con HLA-A0206 (marca de rombo negro). Por otra parte, no se detectó actividad CTL específica significativa contra células diana que expresan HLA-A0206 (marca triangular en blanco) o URLC10 (círculo en blanco). En las figuras, "R" significa Respondedor y "S" significa Estimulador.

Descripción de Realizaciones

Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria se pueden utilizar en la práctica o ensayo de realizaciones de la presente invención, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Sin embargo, antes de describir los presentes materiales y métodos, se ha de entender que la presente invención no se limita a tamaños, formas, dimensiones, materiales, metodologías, protocolos, etc. particulares describe en esta memoria, ya que éstos pueden variar de acuerdo con una experimentación y optimización rutinarias. Ha de entenderse también que la terminología utilizada en la descripción es con el fin de describir las versiones o realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que se limitará sólo por las reivindicaciones adjuntas.

En caso de conflicto, regirá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

I. Definiciones

Las palabras "un", "una", y "el", "la", tal como se utilizan en esta memoria, significan "al menos uno", a menos que se indique otra cosa específicamente.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en esta memoria para referirse a un polímero de residuos aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos aminoácido son un residuo modificado, o un residuo que se produce de forma no natural tal como un mimético químico artificial de un aminoácido que se produce de forma natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácido que se producen de forma natural.

El término "aminoácido", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a aminoácidos que se producen de forma natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos que se producen de forma natural. Aminoácidos que se producen de forma natural son los codificados por el código genético, así como los modificados después de la traducción en las células (p. ej., hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina). La frase "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) como un aminoácido que se produce de forma natural, pero que tiene un grupo R modificado o cadenas principales modificadas (p. ej., homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metionina-metil-sulfonio). La frase "mimético de aminoácido" se refiere a compuestos químicos que tienen diferentes estructuras, pero funciones similares a aminoácidos generales.

A los aminoácidos se puede aludir en esta memoria por sus comúnmente conocidos símbolos de tres letras o los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

Los términos "gen", "polinucleótidos", "nucleótidos" y "ácidos nucleicos" se utilizan indistintamente en esta memoria, a menos que se indique específicamente de otro modo y se les alude de manera similar a los aminoácidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

A menos que se defina lo contrario, el término "cáncer" se refiere a cánceres que sobre-expresan el gen HIG2 o URLC10. Ejemplos de cánceres que sobre-expresan HIG2 incluyen, pero no se limitan a, cáncer renal y carcinoma

de tejidos blandos; ejemplos de cánceres que sobre-expresan el gen URLC10 incluyen, pero no se limitan a cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), osteosarcoma, cáncer de páncreas y tumores de tejidos blandos.

5 A menos que se defina lo contrario, las expresiones "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" se utilizan indistintamente en esta memoria y, a menos que se indique específicamente otra cosa, se refieren a un subgrupo de linfocitos T que son capaces de reconocer células no autónomas (p. ej., células tumorales, células infectadas por virus) y que inducen la muerte de dichas células.

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.

II. Péptidos

15 Para demostrar que los péptidos de HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) y URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2) funcionan como un antígeno reconocido por linfocitos T citotóxicos (CTLs), estos péptidos fueron analizados para determinar si eran epítomos de antígenos restringidos por HLA-A0206. Después de la estimulación in vitro de células T por parte de células dendríticas (DCs) cargadas con estos péptidos, los CTLs se establecieron con éxito utilizando cada uno de los péptidos de HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) y URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2).

20 Estos CTLs establecidos demuestran que la potente actividad de CTL específica contra las células diana que expresan el antígeno HLA-A0206, que se pulsaron con péptidos respectivos. Los resultados en esta memoria demuestran que los péptidos pueden ser péptidos de epítomos de HIG2 y URLC10 restringidos por HLA-A0206. Dado que estos péptidos también pueden ser péptidos de epítomos de HIG2 o URLC10 restringidos por HLA-A0201 (documentos WO2008/102557, PCT/JP2008/000290), agente farmacéutico o composición que comprende los péptidos pueden ser aplicables tanto a sujetos HLA-A0201-positivos como a sujetos HLA-A0206-positivos.

25 Dado que el gen HIG2 o URLC10 está sobre-expresado en la mayoría de tejidos de cáncer tales como cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, NSCLC, osteosarcoma, cáncer de páncreas, cáncer renal y tumores de tejidos blandos, es un buen objetivo para la inmunoterapia. En particular, ejemplos de cáncer que sobre-expresan HIG2 incluyen cáncer renal y tumores de tejidos blandos. Además, ejemplos de cánceres que sobre-expresan URLC10 incluyen cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, NSCLC, osteosarcoma, cáncer de páncreas y tumores de tejidos blandos. Por lo tanto, la presente invención proporciona nonapéptidos (péptidos que consisten en nueve residuos aminoácidos) y decapeptidos (péptidos que consisten en diez residuos aminoácidos) que corresponden a péptidos de epítomos de HIG2 o URLC10 restringidos por HLA-A0206. Ejemplos particularmente preferidos de nonapéptidos y decapeptidos de la presente invención incluyen los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1 y 2. Más particularmente, ejemplos de péptidos de epítomos de HIG2 restringidos por HLA-A0206 incluyen el péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y ejemplos de péptidos de epítomos de URLC10 restringidos por HLA-A0206 incluyen el péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

35 En general, la modificación de uno, dos o más aminoácidos en una proteína no influirá en la función de la proteína, o en algunos casos incluso mejorará la función deseada de la proteína original. De hecho, péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos de una secuencia de aminoácidos en la que se han modificado (es decir, sustituido, eliminado, añadido y/o insertado) uno, dos o varios residuos aminoácidos en comparación con una secuencia de referencia original) se sabe que 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)

45 Los expertos en la técnica reconocen que adiciones o sustituciones individuales en una secuencia de aminoácidos que altera un aminoácido sencillo o un pequeño porcentaje de aminoácidos tienden a dar como resultado la conservación de las propiedades de la cadena lateral de aminoácido original. Como tales, se las alude convencionalmente como "sustituciones conservativas" o "modificaciones conservativas", en donde la alteración de una proteína resulta en una proteína modificada que tiene propiedades y funciones análogas a la proteína original. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Ejemplos de características de la cadena lateral de aminoácidos que son deseables para la conservación 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 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 ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene una base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene un compuesto aromático (H, F, Y, W). Además, los ocho grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son 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);
- Arginina (R), Lisina (K);
- 5 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, p. ej., Creighton, Proteins 1984).

10 Cuando se utilizan en el contexto de la inmunoterapia, los péptidos de la presente invención deberían presentarse en la superficie de una célula o exosoma, preferiblemente como un complejo con un antígeno HLA-A0206. Por lo tanto, es preferible seleccionar péptidos que no sólo induzcan CTLs, sino que también posean una elevada afinidad de unión al antígeno HLA-A0206. Aunque no son parte de la presente invención, los péptidos pueden modificarse mediante sustitución, inserción, delección y/o adición de los residuos aminoácidos para proporcionar un péptido modificado que tenga una afinidad de unión mejorada. Además de los péptidos que se muestran de forma natural, ya que ya se conoce la regularidad de las secuencias de péptidos que se muestran mediante la unión a antígenos HLA (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307). Se pueden introducir sustituciones no sólo en los aminoácidos terminales, sino también en la posición de reconocimiento TCR potencial de péptidos. Varios estudios han demostrado que las sustituciones de aminoácidos en un péptido pueden ser iguales o mejores que la original, por ejemplo CAP1, p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎, Her-2/neu_(369 a 377) o gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba et al. Cancer Res 57, 4570-4577, 1997, T.K. Hoffmann et al. J Immunol (2002) 1 de febrero; 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).

25 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 contra 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 se pone de manifiesto a partir de la búsqueda de homología que ni siquiera existe un péptido con 1 ó 2 diferencias de aminoácidos en comparación con el péptido objetivo, el péptido objetivo se puede modificar con el fin de aumentar su afinidad de unión con antígenos HLA, y/o aumentar su capacidad de inducción de CTL sin ningún peligro de tales efectos secundarios.

35 Aunque se espera que los péptidos modificados tal como se describió anteriormente sean altamente eficaces, los péptidos candidatos se examinan en cuanto a la presencia de la capacidad de inducción de CTL para seleccionar péptidos de mayor eficacia. En esta memoria, la frase "capacidad de inducción de CTL" indica la capacidad del péptido para inducir a los linfocitos citotóxicos (CTL) cuando se presentan en células presentadoras de antígenos. Además, "capacidad de inducción de CTL" incluye la capacidad del péptido de inducir la activación de CTL, la proliferación de CTL, fomentar la lisis mediante CTL de células diana y para aumentar la producción de CTL IFN-gamma.

40 La confirmación de la capacidad de inducción de CTL se consigue mediante la inducción de células presentadoras de antígeno que portan antígenos MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DCs)), o más específicamente DCs derivadas de leucocitos mononucleares de la sangre periférica humana, y después de la estimulación con los péptidos, la mezcladura con células CD8-positivas, y luego la medición del IFN-gamma producido y liberado por CTL contra las células diana. En calidad de sistema de reacción se pueden utilizar animales transgénicos que han sido producidos para expresar un antígeno HLA-A0206 humano (BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol agosto de 2000, 61(8): 764-79). Por ejemplo, las células diana pueden ser radio-marcadas con ⁵¹Cr y similar, y la actividad citotóxica se puede calcular a partir de la radiactividad liberada de las células diana, antígeno HLA que es HLA-A0206. Alternativamente, la capacidad de inducción de CTL se puede evaluar midiendo el IFN-gamma producido y liberado por CTL en presencia de células presentadoras de antígeno (APCs) que portan péptidos inmovilizados, y visualizando la zona de inhibición en los medios utilizando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

50 Los péptidos también se pueden enlazar a otras sustancias, siempre que el péptido enlazado resultante conserve el requisito de capacidad de inducción de CTL del péptido original. Ejemplos de sustancias adecuadas incluyen, pero no se limitan a: péptidos, lípidos, azúcares y cadenas de azúcares, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glicosilación, oxidación de la cadena lateral o

fosforilación, etc., con la condición de que las modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Estos tipos de modificaciones pueden llevarse a cabo para conferir funciones adicionales (p. ej., la función de fijación de objetivo, y la función de suministro) o para estabilizar el polipéptido.

5 Por ejemplo, para aumentar la estabilidad in vivo de un polipéptido, se conoce en la técnica introducir D-aminoácidos, miméticos de aminoácidos o aminoácidos no naturales; este concepto también puede ser adaptado a los presentes polipéptidos. La estabilidad de un polipéptido puede ensayarse de un cierto número de maneras. Por ejemplo, peptidasas y diversos medios biológicos tales como plasma y suero humanos, se puede utilizar para someter a ensayo la estabilidad (véase, p. ej., Verhoef et al, Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

10 Además, los péptidos de la presente invención se pueden enlazar a otros péptidos mediante espaciadores o enlazadores. Ejemplos de otros péptidos incluyen, pero no se limitan a péptidos inducibles por CTL derivados de otros TAAs. Alternativamente, dos o más péptidos de la presente invención pueden estar enlazados a través de espaciadores o enlazadores. Los péptidos unidos a través de espaciadores o enlazadores pueden ser iguales o diferentes entre sí. Los espaciadores o enlazadores no están específicamente limitados, pero son preferiblemente péptidos, más preferiblemente péptidos que tienen uno o más sitios de escisión que son capaces de ser escindidos por enzimas tales como peptidasas, proteasas y proteosomas. 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. Suttmuller et al., J Immunol 2000, 165: 7308-7315) o, uno a varios residuos lisina (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476, K.S. Kawamura et al., J Immunol 2002, 168: 5709-5715). El péptido de la presente invención abarca los péptidos enlazados a otros péptidos mediante espaciadores o enlazadores.

20 Los péptidos de la presente invención pueden existir en la superficie de una célula que porta antígenos MHC humanos (p. ej., célula presentadora de antígenos) o un exosoma como complejos en combinación con moléculas MHC y luego inducen CTLs. Las células y los exosomas se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, las células se pueden preparar poniéndolas en contacto con los péptidos de la presente invención, y los exosomas se pueden preparar recogiendo una fracción que contiene exosomas de las células
25 puestas en contacto con los péptidos de la presente invención (véase, p. ej., la Publicación de Solicitud de Patente japonesa Kohyo N° Hei 11-510507 y WO99/03499). Los péptidos de la presente invención abarcan los péptidos que existen en la superficie de una célula o un exosoma como complejos en combinación con moléculas MHC.

En esta memoria, los péptidos de la presente invención también se pueden describir como "péptido(s) HIG2 o URLC10" o "polipéptido(s) HIG2 o URLC10".

30 III. Preparación de péptidos

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar utilizando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar sintéticamente, utilizando 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, es decir, purificar o aislar de manera que estén
35 sustancialmente libres de otras proteínas de células huésped que se producen de forma natural y fragmentos de las mismas, o cualesquiera otras sustancias químicas.

Un péptido de la presente invención se puede obtener a través de síntesis química basada en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Ejemplos de métodos de síntesis de péptidos convencionales que pueden ser adaptados a la síntesis incluyen, pero no se limitan a:

- 40 • (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 (in Japanese), Maruzen Co., 1985;
- 45 • (v) Development of Pharmaceuticals (volumen segundo) (en japonés), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;
- (vi) documento WO99/67288; y
- (vii) Barany G. y Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, Nueva York, 1980, 100-118.

50 Alternativamente, los presentes péptidos pueden obtenerse adaptando cualesquiera métodos de ingeniería genética conocidos para la producción de péptidos (p. ej., Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss y

Curtiss, Methods in Enzymology (comps. Wu et al.) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, primero, un vector adecuado que alberga un polinucleótido que codifica el péptido objetivo en una forma expresable (p. ej., aguas abajo de una secuencia reguladora que corresponde a una secuencia de promotor) se prepara y se transforma en una célula huésped adecuada. La célula huésped se cultiva después 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 los péptidos de la presente invención mencionados anteriormente. Estos incluyen polinucleótidos derivados del gen HIG2 o URLC10 que se produce de forma natural (SEQ ID NO: 3 o 5, GenBank N° de Acceso NM_013332 o NM_017527), así como los que tienen una secuencia de nucleótidos modificada de forma conservadora de los mismos. En esta memoria, la frase "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 todo el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina es especificada por un codón, el codón puede ser alterado a cualesquiera codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Variaciones de ácido nucleico de este tipo son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada una de las secuencias de ácidos nucleicos en esta memoria que codifica un péptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto ordinario reconocerá que cada uno de los codones en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina, y TGG, que es habitualmente el único codón para triptófano) puede ser modificado para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada una de las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un péptido se describe implícitamente en cada una de las secuencias descritas.

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

El polinucleótido de la presente invención puede codificar múltiples péptidos de la presente invención, con o sin intervenir en secuencias de aminoácidos intermedias. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos intermedia puede proporcionar un sitio de escisión (p. ej., secuencia de reconocimiento de enzimas) del polinucleótido o los péptidos traducidos. Además de ello, 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, dichos polinucleótidos recombinantes se pueden preparar mediante la manipulación de polinucleótidos mediante técnicas recombinantes convencionales utilizando, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

Se pueden utilizar tanto las técnicas de síntesis recombinantes como químicas para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, un polinucleótido puede ser producido mediante inserción en un vector apropiado, que puede expresarse cuando es transfectado en una célula competente. Alternativamente, un polinucleótido puede ser amplificado utilizando técnicas de PCR o la expresión en huéspedes adecuados (véase, p. ej., Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989). Alternativamente, un polinucleótido puede ser sintetizado utilizando las técnicas en fase sólida tal como se describe en Beaucage SL e 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 invención y células huéspedes que albergan los vectores también se incluyen en la presente invención.

V. Exosomas

La presente descripción proporciona, además, vesículas intracelulares denominadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de esta invención y antígenos HLA en su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, utilizando los métodos detallados en la Publicación de la Solicitud de Patente japonesa Kohyo N° Hei 11-510507 y el documento WO99/03499, y se pueden preparar utilizando APCs obtenidos de pacientes que son sometidos a tratamiento y/o prevención. Los exosomas de esta invención pueden ser inoculados como vacunas, de una manera similar a los péptidos de esta invención.

En el contexto de la presente invención, el tipo de antígenos HLA incluidos en los complejos debería ser HLA-A0206, y el sujeto al que se inoculan los exosomas debe poseer el antígeno HLA-A0206. Típicamente, en la clínica, el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento es investigado por adelantado, lo que permite la selección adecuada de los pacientes que se espera se beneficien del tratamiento con los exosomas de la presente descripción.

VI. Células presentadoras de antígenos (APCs)

La presente invención también proporciona APCs aisladas que presentan complejos formados entre antígenos HLA-A0206 y los péptidos de esta invención en su superficie. Las APCs, que se obtienen poniendo en contacto los péptidos de esta invención, o introduciendo los nucleótidos que codifican los péptidos de esta invención en una forma expresable se pueden derivar de pacientes que son sometidos a un 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, los exosomas, o células T citotóxicas.

Las APCs no se limitan a un tipo particular de células e incluyen células dendríticas (DCs), células de Langerhans, macrófagos, células B y células T activadas, que son conocidos por presentar antígenos proteicos en su superficie celular con el fin de ser reconocidos por linfocitos. Dado que la DC es una APC representativa que tiene la más fuerte acción inductora de CTL entre las APCs, APCs preferibles de la presente invención son DCs.

Por ejemplo, una APC se puede obtener induciendo DCs procedentes de monocitos de la sangre periférica y después poniéndolas en contacto (estimándolas) con los péptidos de esta invención in vitro, ex vivo o in vivo. Cuando los péptidos de esta invención se administran a los sujetos cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206, las APCs que presentan los péptidos de esta invención son inducidas en el cuerpo del sujeto. La frase "inducción de la APC" incluye poner en contacto (estimular) una célula con los péptidos de esta invención, o los nucleótidos que codifican los péptidos de la presente invención para presentar complejos formados entre antígenos HLA-A0206 y los péptidos de esta invención en la superficie de la célula. Alternativamente, después de introducir 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 APCs de un primer sujeto cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206,

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

c: administrar las APCs cargadas con péptido a un segundo sujeto cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206.

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 uso de péptidos de esta invención para fabricar una composición farmacéutica que induce células presentadoras de antígenos. Además, la presente descripción proporciona un método o procedimiento para la fabricación de una composición farmacéutica que induce células presentadoras de antígenos, en donde el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un soporte farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención también proporciona los péptidos de la presente invención para inducir células presentadoras de antígenos. Las APCs obtenidos mediante la etapa b se pueden administrar al sujeto como una vacuna.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, las APCs tienen un alto nivel de capacidad de inducción de CTL. En la expresión "alto nivel de capacidad de inducción de CTL", el alto nivel es con relación al nivel contactado por APC en con ningún péptido o péptidos que no puede inducir el CTL. APCs de este tipo que tienen un alto nivel de capacidad de inducción de CTL se pueden preparar por 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 ADNs o ARNs. Ejemplos de métodos de introducción incluyen, sin limitaciones particulares, diversos métodos convencionalmente realizados en este campo tales como la lipofección, electroporación y el método de fosfato de calcio. Más específicamente, se puede llevar a cabo tal como se describe en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; Traducción Japonesa Publicada de la Publicación Internacional N° 2000-509281. Mediante la transferencia del gen en APCs, el gen se somete a transcripción, traducción y similares en la célula, y luego la proteína obtenida es procesada por MHC de Clase I o Clase II, y prosigue a través de una ruta de presentación para presentar péptidos.

VII. Células T citotóxicas (CTLs)

Una célula T citotóxica inducida contra cualquiera de los péptidos de la presente invención refuerza la respuesta inmune que fija como objetivo endotelios asociados a tumores in vivo y, por lo tanto, se puede utilizar como vacunas, de una manera similar a los péptidos en sí. Por lo tanto, la presente invención también proporciona células T citotóxicas aisladas que son inducidas o activadas específicamente por cualquiera de los presentes péptidos.

Células T citotóxicas de este tipo se pueden obtener (1) administrando los péptidos de la presente invención a un sujeto y después recogiendo las células T citotóxicas del sujeto o (2) poniendo de contacto (estimulando) APCs derivadas de sujetos, y células CD8-positivas, o leucocitos mononucleares de la sangre periférica, in vitro con los péptidos de la presente invención.

Las células T citotóxicas, que han sido inducidas por la estimulación de las APCs que presentan los péptidos de esta invención, pueden derivarse de pacientes que son sometidos a un tratamiento y/o prevención y poseen antígeno HLA-A0206, y se pueden administrar por sí mismas o en combinación con otros fármacos, incluyendo los péptidos de esta invención o exosomas con el propósito de regular efectos. Las células T citotóxicas obtenidas 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, las células T citotóxicas pueden reconocer (es decir, unirse a) un complejo formado entre un HLA-A0206 y el péptido de la presente invención sobre una superficie de una célula diana con el receptor de células T y luego atacar a la célula diana para inducir la muerte de la célula diana. Las células diana pueden ser células que expresan endógenamente HIG2 o URLC10, o células que son transfectadas con el gen HIG2 o URLC10; y células que presentan un péptido de esta invención en la superficie celular debido a la estimulación por el péptido también pueden servir como blancos de ataque de un CTL activado.

VIII. Receptor de células T (TCR)

La presente descripción también proporciona un polinucleótido compuesto por polipéptidos que codifican una secuencia de ácidos nucleicos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de células T (TCR), y métodos de utilizar el mismo. Las subunidades de TCR tienen la capacidad de formar TCRs que confieren especificidad a células T contra células tumorales que presentan péptidos HIG2 o péptidos URLC10 con un antígeno HLA-A0602. Mediante el uso de los métodos conocidos en la técnica, se puede identificar la secuencia de ácidos nucleicos de cadenas alfa y beta del TCR expresado en el CTL inducido con el péptido de esta invención (documento WO2007/032255 y Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Los TCR de derivados se pueden unir al péptido HIG2 o URLC10 que se presenta en las células diana con alta avididad y, opcionalmente, pueden mediar en el exterminio eficiente de células diana que presentan el péptido HIG2 o URLC10 con el antígeno HLA-A0602 in vivo e in vitro.

La secuencia de ácidos nucleicos que codifican las subunidades de TCR se puede incorporar en vectores adecuados, p. ej., vectores retrovirales. Estos vectores son bien conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos o los vectores que los contienen se pueden transferir de manera útil en una célula T, por ejemplo una célula T de un paciente cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206. Ventajosamente, la presente descripción proporciona una composición disponible para la venta que permite una rápida modificación de células T del propio paciente (o las de otro mamífero) para producir rápida y fácilmente las células T modificadas que tienen excelentes propiedades exterminadoras de celulares cancerígenas.

También, la presente descripción proporciona CTLs que se preparan mediante la transducción con un polinucleótido que tiene la secuencia de ácidos nucleicos que codifica los polipéptidos de subunidades de TCR que se unen a un complejo formado entre el péptido HIG2 o URLC10 y un antígeno HLA-A0206. Los CTLs transducidos son capaces de albergar a las células cancerígenas in vivo, y pueden expandirse por métodos de cultivo bien conocidos in vitro (p. ej., Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Las células T de la presente descripción se pueden utilizar para formar una composición inmunogénica útil en el tratamiento o la prevención de cáncer en un paciente en necesidad de terapia o protección (documento WO2006/031221).

IX. Agentes o composiciones farmacéuticas

Los términos "prevención" y "profilaxis" se utilizan indistintamente en esta memoria para referirse a cualquier actividad que reduce la carga de mortalidad o morbilidad de la enfermedad. La prevención y la profilaxis pueden producirse "en los niveles de prevención primaria, secundaria y terciaria". Si bien la prevención y la profilaxis primaria evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles secundario y terciario de la prevención y la profilaxis abarcan actividades dirigidas a la prevención y profilaxis de la progresión de una enfermedad y la aparición de los síntomas, así como reducen el impacto negativo de una enfermedad ya establecida al restaurar la función y reducir las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y la profilaxis pueden incluir una amplia gama de terapias profilácticas destinadas a aliviar la gravedad del trastorno particular, p. ej., reduciendo la proliferación y metástasis de tumores.

El tratamiento y/o la profilaxis de cáncer y/o la prevención de la 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 la supresión de la aparición de cáncer, la regresión del tumor y la reducción o inhibición de metástasis. El tratamiento eficaz y/o la profilaxis del cáncer disminuyen la mortalidad y mejora el pronóstico de individuos que tienen cáncer, disminuye los niveles de marcadores tumorales en la sangre y alivia los síntomas detectables que acompañan al cáncer. Por ejemplo, la reducción o mejora de los síntomas constituye el tratamiento eficaz y/o la profilaxis incluye una reducción de 10%, 20%, 30% o más, o una enfermedad estable.

Dado que la expresión de HIG2 o URLC10 está incrementada en varios tipos de cáncer en comparación con los tejidos normales, los péptidos de esta invención o polinucleótidos que codifican tales péptidos se pueden utilizar para el tratamiento y/o para la profilaxis del cáncer, y/o la prevención de la recurrencia postoperatoria del mismo. Por lo tanto, la presente invención proporciona un agente o composición farmacéutica para tratar y/o prevenir el cáncer, y/o prevenir la recurrencia postoperatoria del mismo, que incluye uno o más de los péptidos de esta invención, o 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 farmacéuticos. Además, las células T citotóxicas antes mencionadas que fijan como objetivo a cualquiera de los péptidos de la presente invención también se pueden utilizar como el ingrediente activo de los presentes agentes o composiciones farmacéuticos. En el contexto de la presente invención, la frase "fijar como objetivo un péptido" se refiere a reconocer (es decir, unirse a) un complejo formado entre un antígeno HLA-A0206 y un péptido en una superficie de la célula diana con el receptor de células T, y luego atacar la célula diana para inducir la muerte de la célula diana.

5

La presente descripción también proporciona el uso de un ingrediente activo seleccionado de entre:

(a) un péptido de la presente invención,

10

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

(c) una APC de la presente invención, y

(d) células T citotóxicas de la presente invención

en la fabricación de una composición farmacéutica o agente para el tratamiento de cáncer.

La presente descripción proporciona, además, un ingrediente activo seleccionado de entre:

15

(a) un péptido de la presente invención,

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

(c) una APC de la presente invención, y

(d) células T citotóxicas de la presente invención

20

para uso en el tratamiento de cáncer.

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

25

(a) un péptido de la presente invención,

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

(c) una APC de la presente invención, y

(d) células T citotóxicas de la presente invención

30

como ingredientes activos.

En otra realización, la presente descripción también proporciona un método o procedimiento para la fabricación de una composición o agente farmacéutico para tratar el cáncer, en donde el método o procedimiento incluye la etapa de mezclar un ingrediente activo con un soporte farmacéutica o fisiológicamente aceptable, en el que el ingrediente activo se seleccionado entre:

35

(a) un péptido de la presente invención,

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

(c) una APC de la presente invención, y

(d) células T citotóxicas de la presente invención.

40

Alternativamente, la composición o el agente farmacéutico de la presente invención pueden utilizarse para una o ambas de la profilaxis del cáncer y la prevención de la recurrencia postoperatoria del mismo.

Los presentes agentes o composiciones farmacéuticos encuentran uso como una vacuna. En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" (al que también se alude como una "composición inmunogénica") se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad antitumoral tras la inoculación en animales.

5 Los agentes o composiciones farmacéuticos de la presente invención se pueden utilizar para tratar y/o prevenir cánceres, y/o para la prevención de la recurrencia postoperatoria de los mismos en sujetos o pacientes, incluyendo seres humanos y cualquier otro mamífero incluyendo, pero no limitado a, ratón, rata, cobaya, conejo, gato, perro, oveja, cabra, cerdo, ganado, caballo, mono, babuino y chimpancé, particularmente un animal de importancia comercial o un animal domesticado.

10 De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1 y 2 son péptidos de epítopos restringidos por HLA-A0206 que pueden inducir una respuesta inmune potente y específica contra células diana que expresan HIG2 o URLC10, y HLA-A0206. Por lo tanto, los presentes agentes o composiciones farmacéuticos que incluyen cualquiera de estos polipéptidos con la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1 y 2 son particularmente
15 adecuados para la administración a sujetos, cuyo antígeno HLA es HLA-A0206. Lo mismo se aplica a agentes o composiciones farmacéuticos que incluyen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos polipéptidos.

Los cánceres a ser tratados por los agentes o composiciones farmacéuticos de la presente invención no están limitados, e incluyen todos los tipos de cánceres en los que está implicado HIG2 o URLC10, incluyendo, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, NSCLC, osteosarcoma, cáncer de páncreas, carcinoma renal y tumores de tejidos blandos. En particular, los agentes o
20 composiciones farmacéuticos que fijan como objetivo HIG2 son preferiblemente aplicables a carcinoma renal y tumores de tejidos blandos, y los agentes o composiciones farmacéuticos que fijan como objetivo URLC10 son preferiblemente aplicables a cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, NSCLC, osteosarcoma, cáncer de páncreas y tumores de tejidos blandos.

Los presentes agentes o composiciones farmacéuticos pueden contener, además de los ingredientes activos antes mencionados, otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTLs contra células cancerígenas, otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, o similares. En esta memoria, los otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTLs contra células cancerígenas se ejemplifican por
25 antígenos específicos para cáncer (p. ej., TAAs identificados), pero no se limitan a los mismos.

Si es necesario, los agentes o composiciones farmacéuticos 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, p. ej., cualquiera de los presentes péptidos. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir agentes o composiciones anti-inflamatorios, analgésicos, agentes quimioterapéuticos, y similares. Además de incluir
30 otras sustancias terapéuticas en el propio medicamento, los medicamentos de la presente invención también se pueden administrar secuencial o simultáneamente con uno o más de otros agentes o composiciones farmacológicas. Las cantidades de medicamento y agente o composición farmacológica dependen, por ejemplo, de qué tipo de agente o agentes o composición o composiciones farmacológicas se utilicen, de la enfermedad que esté siendo
35 tratada y la programación y vías de administración.

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

Los presentes agentes o composiciones farmacéuticos pueden ser incluidos en artículos de manufactura y kits que contienen materiales útiles para el tratamiento de las condiciones patológicas de la enfermedad a tratar, p. ej., cáncer. El artículo de manufactura puede incluir un recipiente de cualquiera de los presentes agentes o composiciones farmacéuticos con una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo.
45 Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. La etiqueta en el recipiente debe indicar el agente o composiciones que se utilizan para el tratamiento o la prevención de uno o más estados de la enfermedad. La etiqueta también puede indicar instrucciones para la administración, etcétera.

Además del recipiente descrito anteriormente, un kit que incluye un agente farmacéutico o composiciones de la presente invención opcionalmente puede incluir, además, un segundo recipiente 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 para su
50 uso.

Las composiciones farmacéuticas pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, incluir una película metálica o de plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador
55 puede acompañarse de instrucciones para la administración.

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

Los péptidos de esta invención se pueden administrar directamente como un agente o composición farmacéutico o, si es necesario, que ha sido formulada por métodos de formulación convencionales. En este último caso, además de los péptidos de esta invención, soportes, excipientes y similares que se utilizan habitualmente para fármacos se pueden incluir, según proceda, sin limitaciones particulares. Ejemplos de soportes de este tipo son agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón fosfato, fluido de cultivo y similares. Además, los agentes o composiciones farmacéuticos pueden contener, según sea necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, agentes tensioactivos y similares. Los agentes o composiciones farmacéuticos de esta invención pueden ser utilizados para propósitos contra el cáncer.

Los péptidos de esta invención se pueden preparar como una combinación compuesta de dos o más de los péptidos de la invención, para inducir el CTL in vivo. La combinación de péptidos puede adoptar la forma de un cóctel o pueden conjugarse entre sí utilizando técnicas estándares. Por ejemplo, los péptidos se pueden unir químicamente o expresar como una única secuencia de polipéptidos de fusión. Los péptidos en la combinación pueden ser los mismos o diferentes. Mediante la administración de los péptidos de esta invención, los péptidos se presentan en una alta densidad mediante el antígeno HLA-A0206 en APCs, a continuación se inducen CTLs que reaccionan específicamente hacia el complejo formado entre el péptido presentado y el antígeno HLA-A0206. Alternativamente, las APCs que presentan cualquiera de los péptidos de esta invención en su superficie celular, que pueden ser obtenidas mediante la estimulación de APCs (p. ej., DCs) derivadas de los sujetos cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206 con los péptidos de la presente invención, se pueden administrar al sujeto y, como resultado, los CTLs son inducidos en el sujeto y puede aumentarse la agresividad hacia las células cancerígenas tal como el cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, NSCLC, osteosarcoma, cáncer de páncreas, carcinoma renal y tumores de tejidos blandos.

Los agentes o composiciones farmacéuticos para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que incluyen un péptido de esta invención como el ingrediente activo, también pueden incluir un adyuvante conocido por establecer eficazmente la inmunidad celular. Alternativamente, se pueden administrar con otros ingredientes activos, y pueden ser administrados por formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a un compuesto que potencia la respuesta inmunitaria contra la proteína cuando se administra junto (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. 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 de ello, las formulaciones de liposomas, formulaciones granulares en las que el péptido se une a perlas de un diámetro de unos pocos micrómetros, y formulaciones en las que un lípido está unido al péptido se pueden utilizar convenientemente.

Los agentes o composiciones farmacéuticos de la presente invención pueden incluir, además, un componente que ceba CTL. Lípidos se han identificado como agentes o composiciones capaces de cebar CTL in vivo contra antígenos virales. Por ejemplo, residuos de ácido palmítico pueden estar fijados a los grupos épsilon- y alfa-amino de un residuo lisina y luego pueden unirse a un péptido de la invención. El péptido lipidado puede ser administrado ya sea directamente en una micela o partícula, incorporado en un liposoma o emulsionado en un adyuvante. Como otro ejemplo de cebado de lípidos de respuestas de CTL, lipoproteínas de E. coli tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina (P3CSS) se pueden utilizar para cebar CTL cuando se fija covalentemente a un péptido apropiado (véase, p. ej., Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).

El método de administración puede ser oral, por inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, o similar, y la administración sistémica o administración local a la vecindad de los sitios fijados como objetivo. La administración se puede realizar por administración única o impulsada por múltiples administraciones. La dosis de los péptidos de esta invención puede ajustarse de manera apropiada de acuerdo con la enfermedad a tratar, la edad del paciente, peso, 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 cada pocos días a cada pocos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar adecuadamente una dosis adecuada.

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

Los agentes o composiciones farmacéuticos de la presente invención también pueden contener ácidos nucleicos que codifican los péptidos descritos en esta memoria en una forma expresable. En esta memoria, la frase "en una forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando se introduce en una célula, será expresado in vivo como un polipéptido que induce una inmunidad anti-tumor. En una realización a modo de ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos del polinucleótido de interés incluye elementos reguladores necesarios para la expresión del polinucleótido. El o los polinucleótidos se pueden equipar de modo que se logre una inserción estable en el genoma de la célula diana (véase, p. ej., Thomas KR y Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 para una descripción de vectores de casete de recombinación homóloga). Véase, p. ej., Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; Patentes de EE.UU.

N^os. 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y documento WO 98/04720. Ejemplos de tecnologías de suministro basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", suministro facilitado (bupivacaína, polímeros, mediado por péptidos), complejos de lípidos catiónicos, y suministro mediado por partículas ("pistola de genes") o mediado por presión (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N^o 5.922.687).

- 5 Los péptidos de la presente invención también pueden ser expresadas por vectores virales o bacterianos. Ejemplos de vectores de expresión incluyen huéspedes virales atenuados tales como vacuna o de la viruela aviar. Este enfoque implica el uso de virus vacuna, p. ej., como un vector para expresar secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. Tras la introducción en un huésped, el virus vacuna recombinante expresa el péptido inmunogénico y, con ello, provoca una respuesta inmune. Vectores vacuna y métodos útiles en protocolos de inmunización se describen, p. ej., en la patente de EE.UU. N^o 4.722.848. Ejemplos de otro vector incluyen BCG (Bacilo Calmette Guerin). Vectores de BCG se describen en Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60. Resultará evidente una amplia diversidad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o la inmunización, p. ej., vectores de adenovirus y virus adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores de Salmonella typhi, vectores de toxina destoxificada ántrax, y similares. Véase, p. ej., 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.

El suministro de un polinucleótido a un sujeto puede ser directa, en cuyo caso el sujeto es expuesto directamente a un vector portador de polinucleótidos, o indirecta, en cuyo caso las células se transforman primero con el polinucleótido de interés in vitro, a continuación las células son trasplantado en el sujeto. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapias génicas in vivo y ex vivo.

- 20 Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu y Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan y Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215). Métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar también para la presente invención se describen en comps. 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.

- 30 El método de administración puede ser oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, o similar, y encuentra uso la administración sistémica o la administración local en la vecindad de los sitios fijados como objetivo. La administración se puede realizar por administración única o impulsada por múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el soporte adecuado o células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de esta invención se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con la enfermedad 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 puede administrarse una vez cada pocos días a una vez cada pocos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar adecuadamente la dosis adecuada.

35 X. Métodos que utilizan los péptidos, exosomas, APCS y CTLs

- Los péptidos de la presente invención y polinucleótidos que codifican estos péptidos pueden utilizarse para la inducción de APCs y CTLs. Los exosomas y 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 con tal que los compuestos no inhiban su capacidad de inducción de CTL. Por lo tanto, cualquiera de los agentes o composiciones farmacéuticos mencionados anteriormente de la presente invención se pueden utilizar para la inducción de CTLs y, además de ello, los que incluyen los péptidos y polinucleótidos también se pueden utilizar para la inducción de APC como se comenta más adelante.

(1) Método de inducir células presentadoras de antígenos (APCs)

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

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

- 50 a: poner en contacto APCs cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206 con los péptidos de la presente invención,
y
b: introducir los polipéptidos de la presente invención en una forma expresable en APCs, cuyo antígeno HLA-A es HLA A0206.

Métodos de este tipo para inducir APCs se realizan preferiblemente in vitro o ex vivo. Cuando los métodos se realizan in vitro o ex vivo, las APCs a ser inducidas se pueden obtener de un sujeto a tratar o de otros cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206.

(2) Método de inducir CTLs

5 Además de ello, 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 de receptor de células T (TCR) que reconoce (es decir, se une a) un complejo de los péptidos de la presente invención y un antígeno HLA-A0206 en una superficie celular. Preferiblemente, los métodos para inducir CTLs incluyen al menos una etapa seleccionada entre:

a: poner en contacto una célula T CD8-positiva con una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA-A0206 y un péptido de la presente invención, y

15 b: introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad TCR que reconoce un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA-A0206 en una célula T CD8-positiva.

Cuando los péptidos de esta invención se administran a un sujeto, el CTL es inducido en el cuerpo del sujeto, y se potencia la fuerza de la respuesta inmune que fija como objetivo las células cancerígenas. Alternativamente, los péptidos y polinucleótidos que codifican los péptidos se pueden utilizar para un método terapéutico ex vivo, en el que APCs derivadas del sujeto y células CD8-positivas, o leucocitos mononucleares de la sangre periférica se ponen en contacto (estimulan) con los péptidos de esta invención in vitro, y después de la inducción de CTL, las células CTL activados se devuelven al sujeto. Por ejemplo, el método puede incluir etapas de:

a: recoger APCs del sujeto cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206:

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

25 c: mezclar las APCs de la etapa b con células T CD₈⁺ cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206, y co-cultivar para inducir CTLs: y

d: recoger células T CD₈⁺ del co-cultivo de la etapa c.

Aunque no de acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de los péptidos de esta invención para la fabricación de una composición farmacéutica que induce CTLs. Además, se proporciona un método o procedimiento para la fabricación de un agente o composición farmacéutico que induce CTLs, en donde el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente descripción con un soporte farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención proporciona también el péptido de la presente invención para inducir CTLs.

35 Las células T CD⁸⁺ que tienen actividad citotóxica, obtenidas en la etapa d, se pueden administrar al sujeto en forma de una vacuna. Las APCs a mezclar con las células T CD⁸⁺ en la etapa c anterior también se pueden preparar mediante la transferencia de genes que codifican los presentes péptidos en las APCs tal como se detalla anteriormente en la sección "VI. Células presentadoras de antígenos"; pero no se limitan a las mismas y para el presente método se puede utilizar cualquier APC o exosoma que presente efectivamente los presentes péptidos a las células T.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar a un experto ordinario en la fabricación y el uso de la misma. Los ejemplos no pretenden de modo alguno limitar el alcance de la invención.

40 EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Líneas celulares

PSCCA0922 (HLA-A0206) se adquirió de Pharma SNP Consortium; PSC. Línea de células linfoblastoide B humana, y COS7 se adquirieron de ATCC.

45 Péptidos candidatos derivados de HIG2 y URLC10

Péptidos 9-meros y 10-meros derivados de HIG2 o URLC10 fueron sintetizados por Sigma (Sapporo, Japón) o Biosynthesis Inc. (Lewisville, TX) de acuerdo con un método de síntesis en fase sólida estándar y se purificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (HPLC). La pureza (> 90%) y la identidad de los péptidos

se determinaron mediante HPLC analítica y análisis de espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a razón de 20 mg/ml y se almacenaron a -80 grados C.

Inducción de CTL in vitro

5 Se utilizaron células dendríticas (DCs) derivadas de monocitos como células presentadoras de antígenos (APCs) para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra péptidos presentados en el antígeno leucocitario humano (HLA). Las DCs fueron generadas in vitro tal como se describe en otro lugar (Nakahara S et al., Cancer Res 15 de julio de 2003, 63(14): 4112-8). Específicamente, células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) aisladas de un voluntario normal (HLA-A0206 positivo) mediante solución de Ficoll-Plaques (Pharmacia) se separaron por adherencia a una placa de cultivo tisular de plástico (Becton Dickinson) con el fin de enriquecerlas como la fracción de monocito. La población enriquecida en monocitos se cultivó en presencia de 1000 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (R&D System) y 1000 U/ml de interleuquina (IL)-4 (R&D System) en Medio AIM-V (Invitrogen) que contiene suero autólogo (AS) inactivado por calor al 2%. Después de 7 días de cultivo, las DCs inducidas por citoquinas se pulsaron con 20 micro-g/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en presencia de 3 micro-g/ml de beta2-microglobulina durante 3 h a 37 grados C. en Medio AIM-V. Las células generadas parecían expresar moléculas asociadas a DC tales como CD80, CD83, CD86 y HLA de clase II, en sus superficies celulares (datos no mostrados). Estas DCs pulsadas con péptidos se inactivaron a continuación mediante mitomicina C (MMC) (30 micro-g/ml durante 30 min) y se mezclaron en una relación 1:20 con células T CD8+ autólogas, obtenidas por selección positiva con el kit de aislamiento de CD8-positivo (Dyna). Estos cultivos se establecieron en placas de 48 pocillos (Corning); cada uno de los pocillos contenía 1.5×10^4 DCs pulsadas con péptidos, 3×10^5 células T CD8+ y 10 ng/ml de IL-7 (R&D System) en 0,5 ml de AIM-V/medio AS al 2%. Tres días más tarde, estos cultivos se suplementaron con IL-2 (CHIRON) a una concentración final de 20 UI/ml. Los días 7 y 14, las células T se estimularon adicionalmente con las DCs pulsadas con péptidos autólogas. Las DCs se prepararon cada vez de la misma manera descrita anteriormente. CTL fue ensayado contra células PSCCA0922 pulsadas con péptido después de la 3ª ronda de estimulación con péptidos el día 21 (Tanaka H et al., Br J Cancer 5 de enero de 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 20 de abril de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 15 de diciembre de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci mayo de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Proceso de expansión de CTL

30 CTLs se expandieron en cultivo utilizando un método similar al descrito por Riddell et al. (Walter EA et al., N Engl J Med 19 de octubre de 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med febrero de 1996, 2(2): 216-23). Un total de 5×10^4 CTLs se suspendieron en 25 ml de medio AIM-V/AS al 5% con 2 tipos de líneas de células linfoblastoides B humanas, inactivadas por MMC, en presencia de 40 ng/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen). Un día después de iniciar los cultivos, se añadieron 120 UI/ml de IL-2 a los cultivos. Los cultivos fueron alimentados con medio AIM-V/AS al 5% que contenía 30 UI/ml de IL-2 los días 5, 8 y 11 (Tanaka H et al., Br J Cancer 5 de enero de 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 20 de abril de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 15 de diciembre de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci mayo de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Establecimiento de clones de CTL

40 Se hicieron las diluciones para que tuvieran 0,3, 1 y 3 CTLs/pocillo en 96 placas de microtitulación de fondo redondo (Nalge Nunc International). Los CTLs se cultivaron con 7×10^4 células/pocillo de 2 tipos de líneas de células linfoblastoides B humanas, 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 y 125 U/ml de IL-2 en un total de 150 micro-l/pocillo de AIM-V que contenía AS al 5%. 50 micro-l/pocillo de IL-2 se añadieron al medio 10 días más tarde, de modo que la IL-2 se convirtió en 125 U/ml en la concentración final. La actividad CTL de los CTLs se ensayó en el 14º día, y los clones de CTL se expandieron utilizando el mismo método anterior.

Actividad de CTL específica

45 Para examinar la actividad de CTL específica, se realizaron el ensayo de inmunoabsorción por puntos ligado a enzima (ELISPOT) para interferón (IFN)-gamma y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para IFN-gamma. Específicamente, PSCCA0922 pulsadas con péptido (1×10^4 /pocillo) se prepararon como células estimuladoras. Las células cultivadas en 48 pocillos se utilizaron como células respondedoras. El ensayo ELISPOT para IFN-gamma y el ensayo ELISA para IFN-gamma se realizaron bajo un proceso de fabricación.

Establecimiento de las células que expresan de manera forzada uno o ambos del gen diana y el gen HLA-A0206

55 El ADNc que codifica un marco de lectura abierto de los genes diana (HIG2; SEQ ID NO: 3 y URLC10; SEQ ID NO: 5) o HLA-A0206 (SEQ ID NO: 7) se amplificó mediante PCR. El producto amplificado mediante PCR se clonó en el vector pcDNA3.1 myc-His (Invitrogen). Los plásmidos contenían uno o ambos de los genes diana y HLA-A0206 se transfectoron en COS7 utilizando lipofectamina (Invitrogen) de acuerdo con los procesos recomendados por el fabricante. Brevemente, $2,5 \times 10^6$ células COS7 se pulsaron con 10 micro-g de plásmido a 140 V y 1000 micro F.

Después de 2 días de la transfección, las células transfectadas fueron tratadas con solución de disociación celular y se utilizaron como las células diana para el ensayo de actividad de CTL.

Resultados

Expresión mejorada de HIG2 y URLC10 en los cánceres

5 Los datos del perfil de expresión génica globales, obtenidos a partir de diversos cánceres utilizando la micro-matriz de ADNc revelaron que la expresión de HIG2 (GenBank N° de acceso NM_013332; SEQ ID NO: 3) y URLC10 (GenBank N° de acceso NM_017527; SEQ ID NO: 5) fue elevada. La expresión de HIG2 fue elevada válidamente en 19 de 20 cánceres renales y 7 de 9 tumores de tejidos blandos en comparación con tejidos normales correspondientes. La expresión de URLC10 fue elevada válidamente en 29 de 29 cánceres de vejiga, 15 de 16
10 cánceres de cuello uterino, 7 de 7 carcinomas colangiocelulares, 7 de 19 cánceres de esófago, 3 de 3 cáncer gástricos, 24 de 27 NSCLC, 15 de 19 osteosarcomas, 4 de 5 cánceres de páncreas y 33 de 43 tumores de tejidos blandos en comparación con los tejidos normales correspondientes.

Inducción de CTL con el péptido de HIG2 restringido con HLA-A0206 y establecimiento de líneas CTL estimuladas con péptidos derivados de HIG2

15 CTLs para el péptido derivados de HIG2 fueron generados de acuerdo con los protocolos tal como se describen en "Materiales y Métodos". La actividad de CTL específica para péptidos se determinó mediante el ensayo ELISPOT para IFN-gamma (Figura 1). Los resultados en esta memoria muestran que HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) demuestra una potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control. Además de ello, las células en los números de pocillos positivos 1, 2, 5, 7, 8, 10, 13 y 14 estimuladas con SEQ ID NO: 1 se expandieron
20 para establecer líneas de CTL. Las actividades de CTL de esas líneas de CTL se determinaron el ensayo ELISA para IFN-gamma (Figura 2). Los resultados en esta memoria muestran que todas las líneas de CTL demuestran una potente producción de IFN-gamma contra las células diana pulsadas con el péptido correspondiente en comparación con las células diana sin el pulso de péptidos. Por lo tanto, HIG2-A0206-9-4 puede inducir potentes líneas de CTL contra las células diana que expresan HLA-A0206.

Establecimiento de clones de CTL estimulados con péptidos derivados de HIG2

La dilución limitante de estas líneas de CTL se realizó de acuerdo con los protocolos recogidos en la sección de "Materiales y Métodos" anterior. El establecimiento de un clon de CTL de la línea de CTL HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) se muestra en la Figura 3. Estos clones de CTL tenían actividades de CTL potentes y específicas contra la diana pulsada por péptidos, en comparación con las actividades contra la diana sin pulso de péptidos.

Actividad específica de CTL contra las células diana que expresan HIG2 y HLA-A0206

Los clones de CTL establecidos generados contra HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) se examinaron en cuanto a su capacidad para reconocer las células diana que expresan HIG2 y HLA-A0206. La actividad específica de CTL contra COS7 transfectadas tanto con el gen HLA-A0206 como con la molécula HIG2 de longitud completa, que sirve como un modelo específico para las células diana que expresan endógenamente HIG2 y HLA-A0206, se sometió a ensayo
35 utilizando como células efectoras el clon CTL producido por HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1). COS7 transfectadas con HLA-A0206 pero no HIG2 de longitud completa y pulsadas con otro péptido (HIG2-9-8: YLLGVVLTLL) y COS7 transfectadas con HIG2 de longitud completa pero no HLA-A0206 se prepararon como controles. Los clones de CTL que demuestran la actividad de CTL específica más alta contra COS7 eran los transfectados tanto con HIG2 como con HLA-A0206 (Figura 4).

40 Los resultados en esta memoria demuestran claramente que HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) es procesado de forma natural y es presentado en la superficie de la célula diana con la molécula HLA-A0206 y reconoce CTL. Por lo tanto, HIG2-A0206-9-4 puede servir como una vacuna contra el cáncer que fija como objetivo células cancerígenas expresadas con HIG2 en un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A0206.

Inducción de CTL con el péptido de URLC10 restringido con HLA-A0206 y establecimiento de líneas CTL estimuladas con péptidos derivados de URLC10

45 CTLs para los péptidos derivados de URLC10 fueron generados de acuerdo con los protocolos tal como se describen en "Materiales y Métodos". La actividad de CTL específica para péptidos se determinó mediante el ensayo ELISPOT para IFN-gamma (Figura 5). Los resultados en esta memoria muestran que URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2) muestra una potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control. Además de
50 ello, las células en el pocillo positivo número 7 estimuladas con SEQ ID NO: 2 se expandieron y se estableció la línea CTL. La actividad de CTL de la línea de CTL se determinó mediante el ensayo ELISA para IFN-gamma (Figura 6). El resultado en esta memoria muestra que la línea CTL demuestra una potente producción de IFN-gamma contra las células diana pulsadas con el péptido correspondiente en comparación con células diana sin pulso de péptidos. Por lo tanto, URLC10-A0206-10-211 puede inducir una potente línea de CTL.

Establecimiento del clon de CTL estimulado con el péptido derivado de URLC10

5 La dilución limitante de estas líneas de CTL se realizó de acuerdo con los protocolos recogidos en la sección de "Materiales y Métodos" anterior. El establecimiento del clon de CTL de la línea de CTL URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2) se muestra en la Figura 7. Este clon de CTL tiene una actividad de CTL potente y específica contra la diana pulsada por el péptido en comparación con las actividades contra la diana sin pulso de péptidos.

Actividad específica de CTL contra las células diana que expresan URLC10 y HLA-A0206

10 Los clones de CTL establecidos producidos contra URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2) fueron examinados en cuanto a su capacidad para reconocer las células diana que expresan URLC10 y HLA-A0206. La actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas tanto con el gen URLC10 de longitud completa como con la molécula HLA-A0206, que sirve como un modelo específico para las células diana que expresan endógenamente URLC10 y HLA-A0206, se sometió a ensayo utilizando como células efectoras el clon CTL producido por URLC10- A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2). COS 7 transfectadas con URLC10 de longitud completa, pero no HLA-A0206 y COS 7 transfectadas con HLA-A0206 pero no URLC10 de longitud completa se prepararon como controles. El clon de CTL que demuestra la actividad de CTL específica más alta contra COS7 era el transfectado tanto con URLC10 como con HLA-A0206 (Figura 8).

15 Los resultados en esta memoria demuestran claramente que URLC10-A0206-10-211 SEQ ID NO: 2) es procesado de forma natural y es presentado en la superficie de la célula diana con la molécula HLA-A0206 y reconoce CTL. Además de ello, URLC10-A0206-10-211 puede servir como una vacuna contra el cáncer que fija como objetivo células cancerígenas que expresan URLC10 en un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A0206.

20 En conclusión, se identificaron nuevos péptidos HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO: 1) y URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO: 2) del epítipo HLA-A0206 y demostraron ser aplicables para la inmunoterapia del cáncer en un sujeto cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206.

Aplicabilidad Industrial

25 La presente invención describe nuevos TAAs, en particular los derivados de HIG2 o URLC10 que inducen respuestas inmunes anti-tumorales potentes y específicos y tienen aplicabilidad a una amplia gama de tipos de cáncer. TAAs de este tipo justifican su posterior desarrollo como vacunas de péptidos contra enfermedades asociadas con HIG2 o URLC10, p. ej., cánceres tales como cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), osteosarcoma, cáncer de páncreas , carcinoma renal y tumores de tejidos blandos.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDO DE EPÍTOPO HIG2 Y URLC10 Y VACUNAS QUE CONTIENEN EL MISMO

<130> ONC-A0815P

5 <150> US 61/089.972

<151> 19-08-2008

<160> 8

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

10 <211> 9

<212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 1

Val Leu Asn Leu Tyr Leu Leu Gly Val
1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

20 < 213> Artificial

<220>

< 223> Un péptido sintetizado artificialmente

<400> 2

Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu
1 5 10

25 <210> 3

<211> 1372

<212> ADN

< 213> Homo sapiens

<220>

30 < 221> CDS

<222> (206) ... (397)

<400> 3

gcacgagggc gcttttgtct ccggtgagtt ttgtggcggg aagcttctgc gctggtgctt 60

agtaaccgac tttcctcggg actcctgcac gacctgctcc tacagccggc gatccactcc 120

cggctgttcc cccggagggg ccagaggcct ttcagaagga gaaggcagct ctgtttctct 180

gcagaggagt agggtccttt cagcc atg aag cat gtg ttg aac ctc tac ctg 232

ES 2 566 011 T3

	Met	Lys	His	Val	Leu	Asn	Leu	Tyr	Leu	
	1				5					
tta ggt gtg gta ctg acc cta ctc tcc atc ttc gtt aga gtg atg gag										280
Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu Ser Ile Phe Val Arg Val Met Glu										
10			15		20				25	
tcc cta gaa ggc tta cta gag agc cca tcg cct ggg acc tcc tgg acc										328
Ser Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ser Pro Ser Pro Gly Thr Ser Trp Thr										
			30		35				40	
acc aga agc caa cta gcc aac aca gag ccc acc aag ggc ctt cca gac										376
Thr Arg Ser Gln Leu Ala Asn Thr Glu Pro Thr Lys Gly Leu Pro Asp										
			45		50				55	
cat cca tcc aga agc atg tga taagacctcc ttccatactg gccatatttt										427
His Pro Ser Arg Ser Met										
			60							
ggaacactga cctagacatg tccagatggg agtcccattc ctagcagaca agctgagcac										487
cgttgtaacc agagaactat tactaggcct tgaagaacct gtctaactgg atgctcattg										547
cctgggcaag gcctgtttag gccggttgcg gtggctcatg cctgtaatcc tagcactttg										607
ggaggctgag gtgggtggat cacctgaggt caggagtctg agaccagcct cgccaacatg										667
gcgaaacccc atctctacta aaaatacaaa agttagctgg gtgtggtggc agaggcctgt										727
aatcccagtt ccttgggagg ctgaggcggg agaattgctt gaaccgggg acggaggttg										787
cagtgaaccg agatcgcact gctgtacca gcctgggcca cagtgaaga ctccatctca										847
aaaaaaaaa gaaaagaaaa agcctgttta atgcacaggt gtgagtggat tgcttatggc										907
tatgagatag gttgatctcg ccttaccoc ggggtctggt gtatgctgtg ctttctcag										967
cagtatggct ctgacatctc ttagatgtcc caacttcagc tgttgggaga tggatatt										1027
ttcaacccta cttcctaaac atctgtctgg ggttccttta gtcttgaatg tcttatgctc										1087
aattatttgg tgttgagcct ctcttcaca agagctcctc catgtttggg tagcagttga										1147
agaggttgty tgggtgggct gttgggagtg aggatggagt gttcagtgcc catttctcat										1207
tttacatttt aaagtcgttc ctccaacata gtgtgtattg gtctgaaggg ggtggtggga										1267
tgccaaagcc tgctcaagtt atggacattg tggccacat gtggcttaa tgattttttc										1327
taactaataa agtgaatat atatttcaaa aaaaaaaaaa aaaaa										1372

<210> 4

<211> 63

5 <212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 566 011 T3

cag aac cca agg agg tgc aaa tgg aca gag cca tac tgc gtt ata gcg 625
 Gln Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr Cys Val Ile Ala
 115 120 125

gcc gtg aaa ata ttt cca cgt ttt ttc atg gtt gcg aag cag tgc tcc 673
 Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys Gln Cys Ser
 130 135 140

gct ggt tgt gca gcg atg gag aga ccc aag cca gag gag aag cgg ttt 721
 Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys Arg Phe
 145 150 155 160

ctc ctg gaa gag ccc atg ccc ttc ttt tac ctc aag tgt tgt aaa att 769
 Leu Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile
 165 170 175

cgc tac tgc aat tta gag ggg cca cct atc aac tca tca gtg ttc aaa 817
 Arg Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys
 180 185 190

gaa tat gct ggg agc atg ggt gag agc tgt ggt ggg ctg tgg ctg gcc 865
 Glu Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly Leu Trp Leu Ala
 195 200 205

atc ctc ctg ctg ctg gcc tcc att gca gcc ggc ctc agc ctg tct tga 913
 Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

gccacgggac tgccacagac tgagccttcc ggagcatgga ctcgctccag accgttgtca 973

cctgttgcat taaacttggt ttctgttgat tacctcttgg tttgacttcc cagggtcttg 1033

ggatgggaga gtgggatca ggtgcagttg gctcttaacc ctcaagggtt ctttaactca 1093

cattcagagg aagtccagat ctctgagta gtgattttgg tgacaagttt ttctcttga 1153

aatcaaacct tgtaactcat ttattgctga tggccactct tttccttgac tcccctctgc 1213

ctctgagggc ttcagtattg atggggaggg aggcctaagt accactcatg gagagtatgt 1273

gctgagatgc ttccgacctt tcaggtgacg caggaacact gggggagtct gaatgattgg 1333

ggtgaagaca tccttgaggt gaagactcc tcagcatggg gggcagtggg gcacacgtta 1393

gggctgcccc cattccagtg gtggaggcgc tgtggatggc tgcttttctt caacctttcc 1453

taccagattc caggaggcag aagataacta attgtgttga agaaacttag acttcacca 1513

ccagctggca cagggtcaca gattcataaa ttcccacag tgtgtgttca acatctgaaa 1573

cttaggccaa gtagagagca tcagggtaaa tggcgttcat ttctctgtta agatgcagcc 1633

atccatgggg agctgagaaa tcagactcaa agttccacca aaaacaaata caaggggact 1693

tcaaaagttc acgaaaaaat tgaattaa gataaaaatt aa 1735

<210> 6

<211> 223

5 <212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 566 011 T3

Met Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg Ala
1 5 10 15

Pro Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg Gly
20 25 30

Ala Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu Gly Ala Pro Arg
35 40 45

Ala Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu
50 55 60

Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg Val Trp Thr Asp Ala Asn Leu Thr
65 70 75 80

Ala Arg Gln Arg Asp Pro Glu Asp Ser Gln Arg Thr Asp Glu Gly Asp
85 90 95

Asn Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg Glu Asn Thr Phe Glu Cys
100 105 110

Gln Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr Cys Val Ile Ala
115 120 125

Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys Gln Cys Ser
130 135 140

Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys Arg Phe
145 150 155 160

Leu Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile
165 170 175

Arg Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys
180 185 190

Glu Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly Leu Trp Leu Ala
195 200 205

Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ser
210 215 220

<210> 7

<211> 1098

<212> ADN

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 221> CDS

<222> (1) ... (1098)

ES 2 566 011 T3

<400> 7

atg gcc gtc atg gcg ccc cga acc ctc gtc ctg cta ctc tcg ggg gct	48
Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala	
1 5 10 15	
ctg gcc ctg acc cag acc tgg gcg ggc tct cac tcc atg agg tat ttc	96
Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe	
20 25 30	
tac acc tcc gtg tcc cgg ccc ggc cgc ggg gag ccc cgc ttc atc gca	144
Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala	
35 40 45	
gtg ggc tac gtg gac gac acg cag ttc gtg cgg ttc gac agc gac gcc	192
Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala	
50 55 60	
gcg agc cag agg atg gag ccg cgg gcg ccg tgg ata gag cag gag ggt	240
Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly	
65 70 75 80	
ccg gag tat tgg gac ggg gag aca cgg aaa gtg aag gcc cac tca cag	288
Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln	
85 90 95	
act cac cga gtg gac ctg ggg acc ctg cgc ggc tac tac aac cag agc	336
Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser	
100 105 110	
gag gcc ggt tct cac acc gtc cag agg atg tat ggc tgc gac gtg ggg	384
Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly	
115 120 125	
tcg gac tgg cgc ttc ctc cgc ggg tac cac cag tac gcc tac gac ggc	432
Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly	
130 135 140	
aag gat tac atc gcc ctg aaa gag gac ctg cgc tct tgg acc gcg gcg	480
Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala	
145 150 155 160	
gac atg gca gct cag acc acc aag cac aag tgg gag gcg gcc cat gtg	528
Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val	
165 170 175	
gcg gag cag ttg aga gcc tac ctg gag ggc acg tgc gtg gag tgg ctc	576
Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu	
180 185 190	
cgc aga tac ctg gag aac ggg aag gag acg ctg cag cgc acg gac gcc	624
Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala	
195 200 205	

ES 2 566 011 T3

ccc aaa acg cat atg act cac cac gct gtc tct gac cat gaa gcc acc 672
 Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr
 210 215 220

ctg agg tgc tgg gcc ctg agc ttc tac cct gcg gag atc aca ctg acc 720
 Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
 225 230 235 240

tgg cag cgg gat ggg gag gac cag acc cag gac acg gag ctc gtg gag 768
 Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
 245 250 255

acc agg cct gca ggg gat gga acc ttc cag aag tgg gcg gct gtg gtg 816
 Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
 260 265 270

gtg cct tct gga cag gag cag aga tac acc tgc cat gtg cag cat gag 864
 Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
 275 280 285

ggt ttg ccc aag ccc ctc acc ctg aga tgg gag ccg tct tcc cag ccc 912
 Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro
 290 295 300

acc atc ccc atc gtg ggc atc att gct ggc ctg gtt ctc ttt gga gct 960
 Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala
 305 310 315 320

gtg atc act gga gct gtg gtc gct gct gtg atg tgg agg agg aag agc 1008
 Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser
 325 330 335

tca gat aga aaa gga ggg agc tac tct cag gct gca agc agt gac agt 1056
 Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser
 340 345 350

gcc cag ggc tct gat gtg tct ctc aca gct tgt aaa gtg tga 1098
 Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val
 355 360 365

<210> 8

<211> 365

5 <212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
 20 25 30

Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
 35 40 45

Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala

ES 2 566 011 T3

Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala
305 310 315 320

Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser
325 330 335

Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser
340 345 350

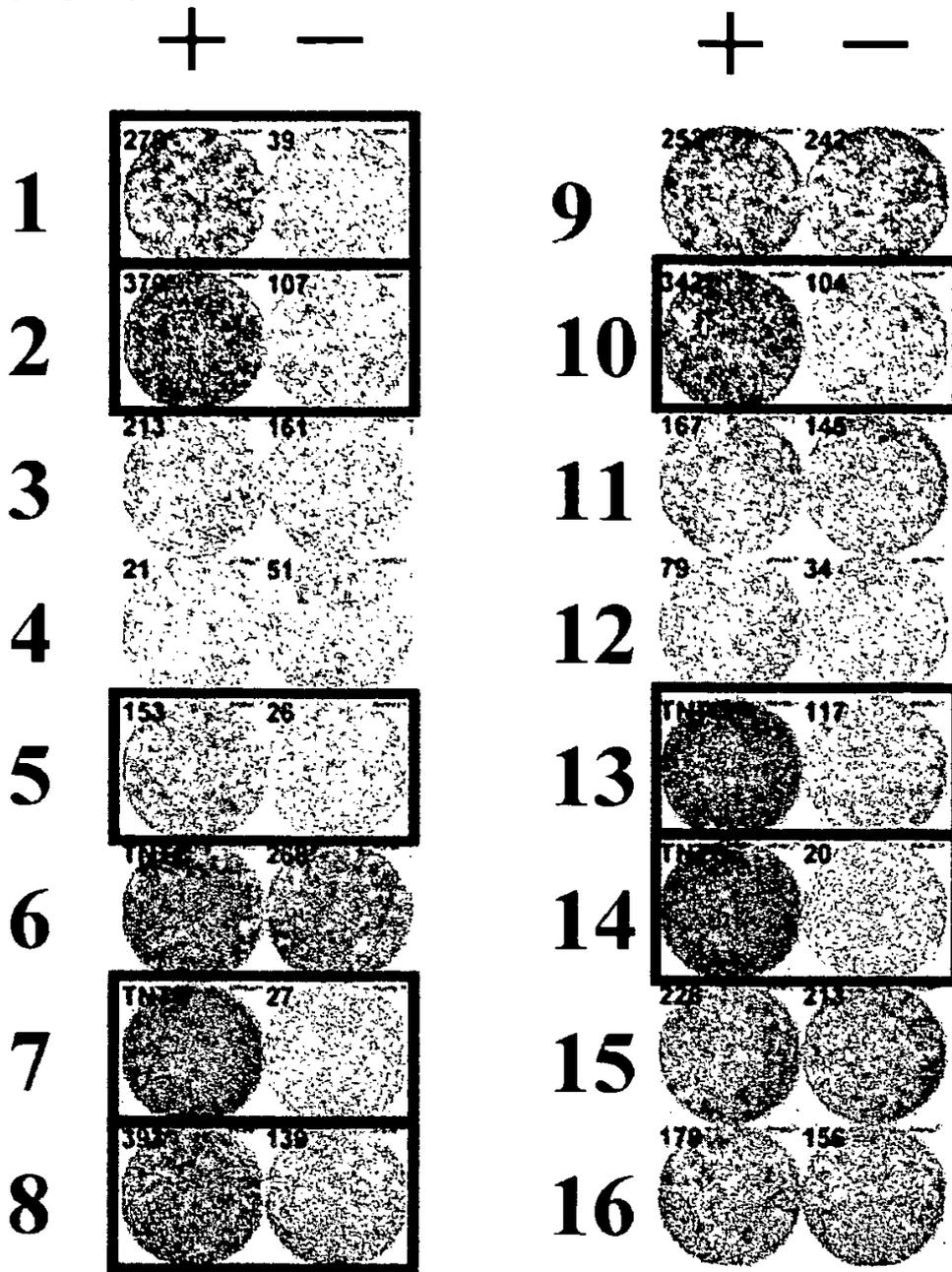
Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val
355 360 365

REIVINDICACIONES

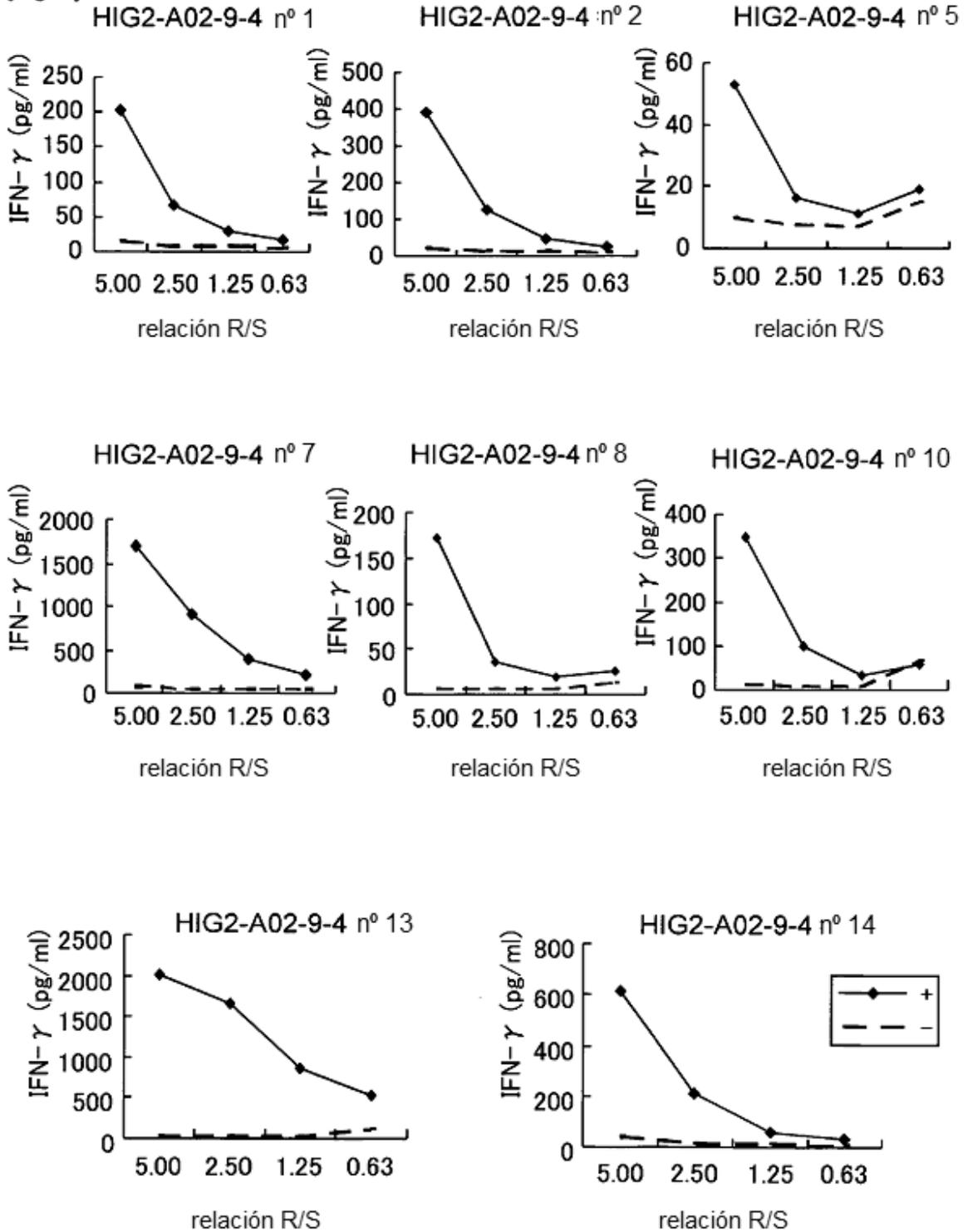
1. Un agente farmacéutico, en donde el agente comprende uno o más péptidos que tienen capacidad de inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL), en donde el péptido es un nonapéptido o decapeptido y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 1,
- 5 o uno o más polinucleótidos que codifican un péptido de este tipo, en combinación con un soporte farmacológicamente aceptable para uso en un propósito seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) tratamiento de cáncer en un sujeto cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206,
- (ii) profilaxis de cáncer en un sujeto cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206,
- (iii) prevenir la recurrencia postoperatoria de cáncer en un sujeto cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206 y
- 10 (iv) combinaciones de los mismos.
2. El agente farmacéutico de la reivindicación 1, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), osteosarcoma, cáncer de páncreas, carcinoma renal y tumores de tejidos blandos.
- 15 3. El agente farmacéutico de la reivindicación 1, que se formula como una vacuna.
4. Un método *in vitro* para inducir una célula presentadora de antígenos con elevada capacidad de inducción de CTL, en el que el método comprende la etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) poner en contacto una célula presentadora de antígenos con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2 y 1, en donde el péptido es un nonapéptido o
- 20 decapeptido; y
- (b) introducir un polinucleótido que codifica un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2 y 1 en una célula presentadora de antígenos, en donde el péptido es un nonapéptido o decapeptido,
- en donde la célula presentadora de antígenos expresa un antígeno HLA-A0206.
- 25 5. Un método *in vitro* para inducir CTL utilizando un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2 y 1, en el que el péptido es un nonapéptido o decapeptido, y en el que el CTL reconoce un complejo de un antígeno HLA-A0206 y dicho péptido.
6. Una célula presentadora de antígenos aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA-A0206 y un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID
- 30 NOs: 2 y 1, en donde el péptido es un nonapéptido o decapeptido.
7. Un CTL aislado que reconoce un complejo de un antígeno HLA-A0206 y un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2 y 1, en donde el péptido es un nonapéptido o decapeptido.
8. Un agente para uso en inducir *in vivo* una célula presentadora de antígenos con elevada capacidad de inducción de CTL, en donde el agente comprende:
- 35 (a) uno o más péptidos que tienen capacidad de inducción de CTL, en donde dicho péptido es un nonapéptido o decapeptido y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2 y 1; o
- (b) uno o más polinucleótidos que codifican un péptido de este tipo;
- 40 en donde la célula presentadora de antígenos expresa un antígeno HLA-A0206,
- para uso en un método de inducir una respuesta inmune.
9. Un agente para uso en inducir una respuesta inmune contra el cáncer en un sujeto, cuyo antígeno HLA-A es HLA-A0206, en donde dicho agente comprende:
- (a) uno o más péptidos que tienen capacidad de inducción de CTL, en donde dicho péptido es un nonapéptido
- 45 o decapeptido y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2 y 1;

- (b) uno o más polinucleótidos que codifican un péptido de este tipo;
 - (c) una o más células presentadoras de antígenos de la reivindicación 6;
 - (d) uno o más CTLs aislados de la reivindicación 7; o
 - (e) una combinación de los mismos.
- 5 10. El agente de la reivindicación 9, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, NSCLC, osteosarcoma, cáncer de páncreas, carcinoma renal y tumores de tejidos blandos.

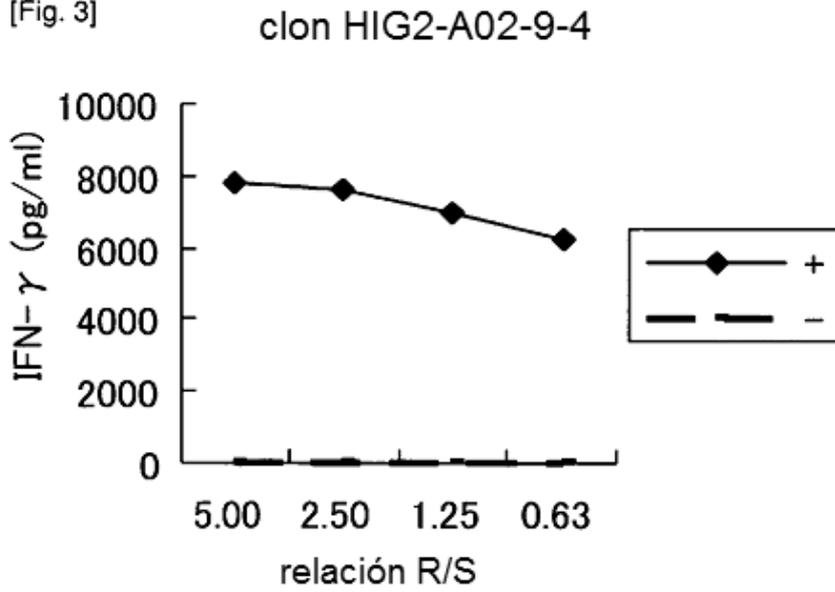
[Fig. 1]



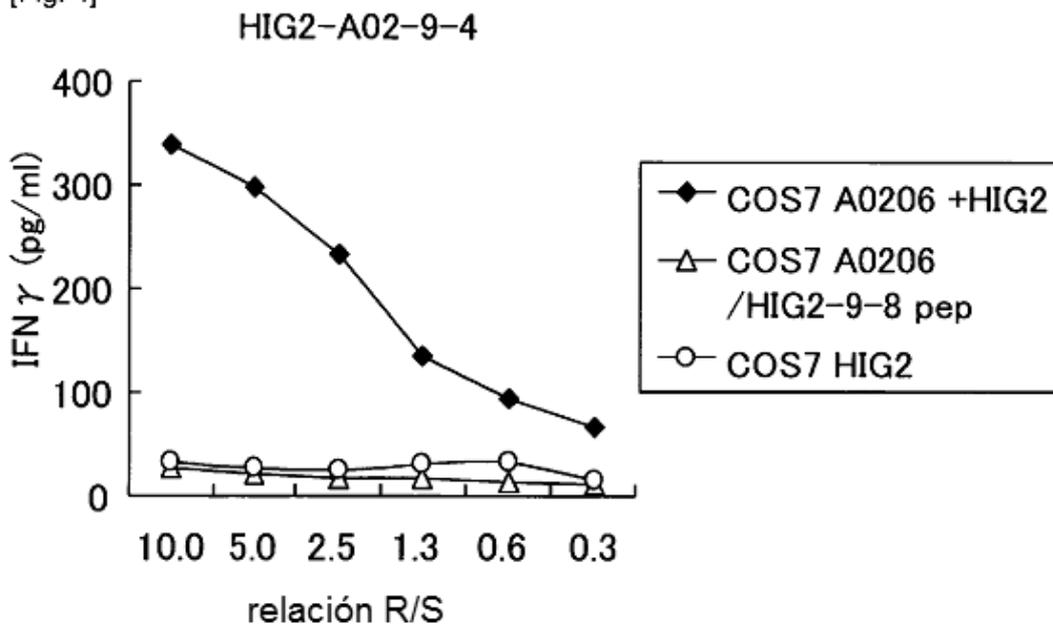
[Fig. 2]



[Fig. 3]

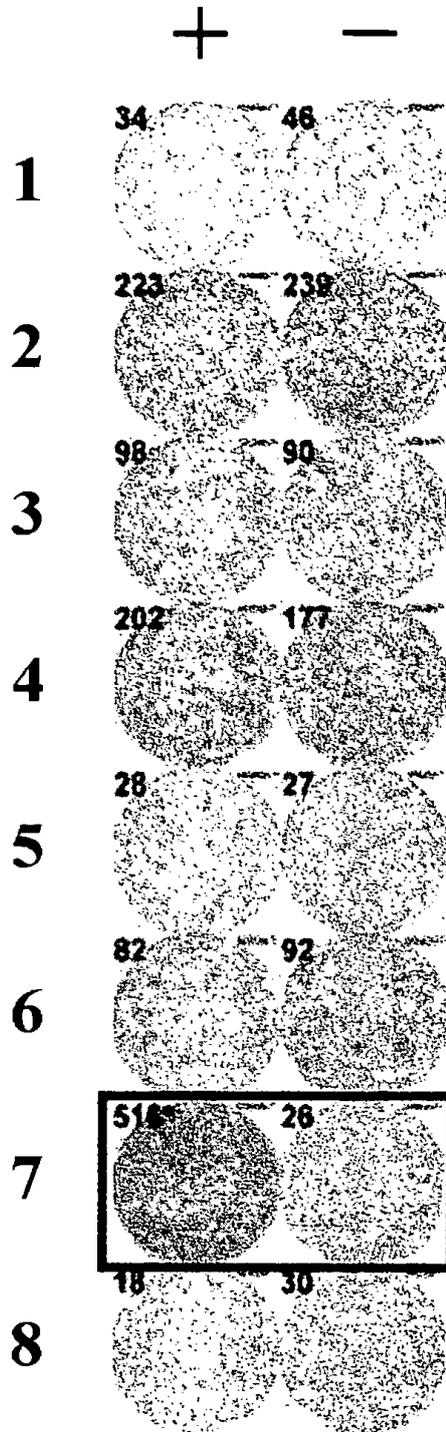


[Fig. 4]

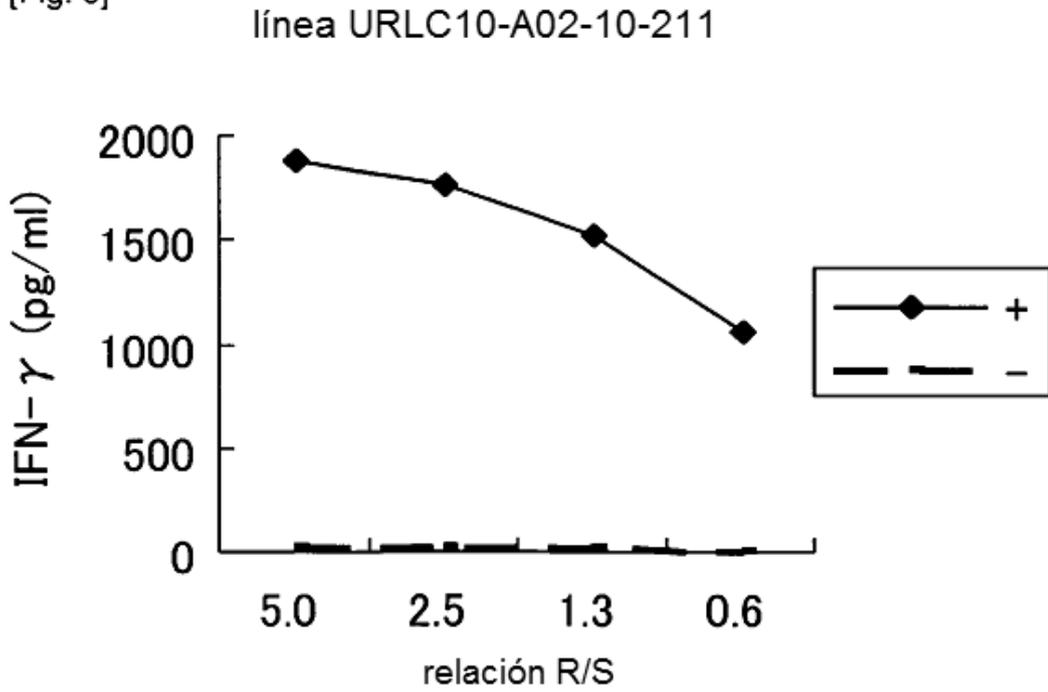


[Fig. 5]

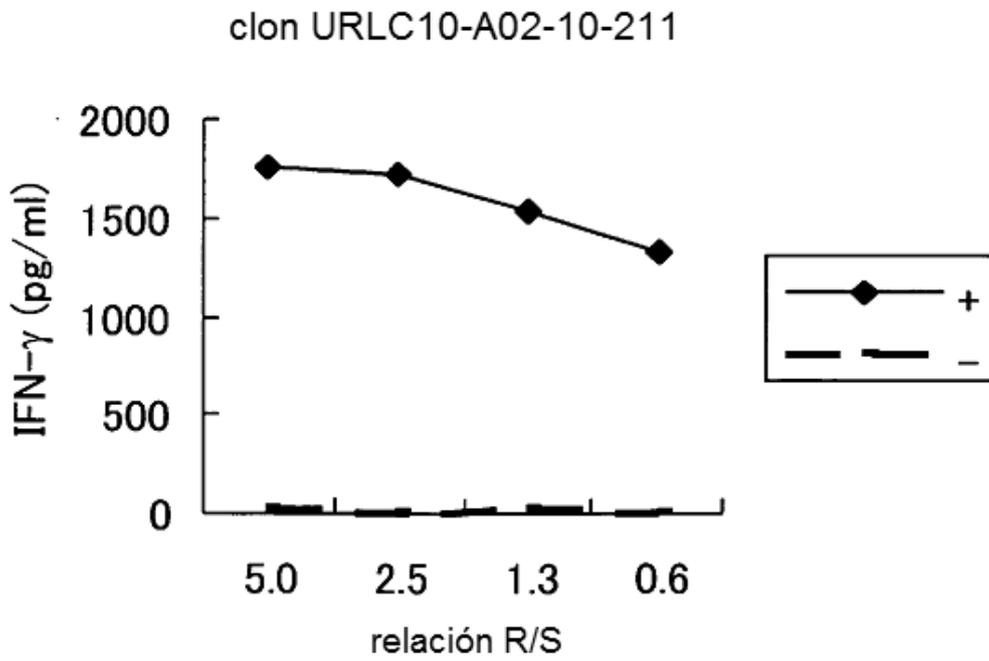
URLC10-A02-10-211



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

