

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 367**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2009 E 09802730 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2321411**

54 Título: **Péptidos con epítomos de la MELK y vacunas que los contienen**

30 Prioridad:

01.08.2008 US 85663 P

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

31.05.2016

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 y
OHSAWA, RYUJI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 572 367 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

Péptidos con epítomos de la MELK y vacunas que los contienen

5 **Sector técnico**

El presente invento se refiere al sector de la ciencia biológica, más específicamente al sector de la terapia de un cáncer. En particular, el presente invento se refiere a unos nuevos péptidos, que son extremadamente eficaces como vacunas contra un cáncer, y a unos fármacos para tratar y prevenir tumores.

10 **Técnica de Antecedentes**

Se ha demostrado que unos CTLs (acrónimo de Cytotoxic T Lymphocytes = linfocitos T citotóxicos) positivos para CD8 reconocen a unos péptidos con epítomos, que se derivan de los antígenos asociados a tumores (TAAs, acrónimo de "tumor-associated antigens"), que se encuentran en moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC, acrónimo de "major histocompatibility complex") de la clase I, y luego matan a las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia de antígenos de melanoma (MAGE) como el primer ejemplo de TAAs, se han descubierto muchos otros TAAs, principalmente mediante enfoques inmunológicos (Boon T, Int J Cancer 8 de May de 1993, 54(2): 177-80; Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1 de Mar de 1996, 183(3): 725-9). Algunos de estos TAAs están experimentando actualmente un desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas.

La identificación de unos nuevos TAAs, que son capaces de inducir unas potentes y específicas respuestas inmunitarias antitumorales, garantiza el desarrollo ulterior y la aplicación clínica de unas estrategias de vacunación con péptidos para diversos tipos de cáncer (Harris CC, J Natl Cancer Inst 16 de Oct de 1996, 88(20): 1442-55; Butterfield LH y colaboradores, Cancer Res 1 de Jul de 1999, 59(13): 3134-42; Vissers JL y colaboradores, Cancer Res 1 de Nov de 1999, 59(21): 5554-9; van der Burg SH y colaboradores, J Immunol 1 de May de 1996, 156(9): 3308-14; Tanaka F y colaboradores, Cancer Res 15 de Oct de 1997, 57(20): 4465-8; Fujie T y colaboradores, Int J Cancer 18 de Ene de 1999, 80(2): 169-72; Kikuchi M y colaboradores, Int J Cancer 5 de May de 1999, 81(3): 459-66; Oiso M y colaboradores, Int J Cancer 5 de May de 1999, 81(3): 387-94). Hasta la fecha, ha habido varios informes sobre unas pruebas clínicas que utilizan estos péptidos que se derivan de antígenos asociados a tumores. Por desgracia, en estas pruebas de vacunas contra un cáncer hasta ahora sólo se ha observado una baja tasa de respuestas objetivas (Bellí F y colaboradores, J Clin Oncol 15 de Oct de 2002, 20(20): 4169-80; Coulie PG y colaboradores, Immunol Rev Oct de 2002, 188: 33-42; Rosenberg SA y colaboradores, Nat Med Sep de 2004, 10(9): 909-15).

Recientemente, se han desarrollado unos algoritmos para la predicción de unas secuencias de péptidos que se fijan a un HLA (acrónimo de "human leukocyte antigen" = antígeno leucocitario humano) de clase I (Journal of Immunological Methods, (1995), Vol. 185, págs. 181-190, J. Immunol., (1994), Vol. 152, págs. 163-175, protein science = ciencia de las proteínas, (2000), tomo 9, págs. 1838-1846). No obstante, es difícil estimar si un péptido de epítopo predicho puede ser procesado naturalmente en las células diana y expresado en la superficie de las células diana con una molécula de HLA. Además, los algoritmos, por ejemplo el BIMAS (http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) (Parker KC, y colaboradores, (1994) J Immunol.; 152(1):163-75.; Kuzushima K, y colaboradores, (2001) Blood.; 98(6):1872-81.), pueden sugerir unos péptidos que se fijan a las moléculas de HLA menos que rigurosamente (Bachinsky MM, y colaboradores, Cancer Immun. 2005 Mar 22; 5:6.). Así, la identificación de unos péptidos con epítomos sigue siendo un desafío y difícil.

La MELK, acrónimo de "maternal embryonic leucine zipper kinase" = cinasa del dominio cremallera de leucina embrionaria materna, como un nuevo miembro de la familia de cinasas de serina-treonina snfl/AMPK, que está implicada en el desarrollo embrionario de mamíferos (Heyer BS y colaboradores, Dev Dyn. Ago de 1999 215(4):344-51). Se mostró que el gen desempeña un cometido importante en la renovación de células madre (Nakano I y colaboradores, J Cell Biol. 1 de Ago de 2005, 170(3):413-27), en la progresión del ciclo celular (Blot J y colaboradores, Dev Biol. 15 de Ene de 2002, 241(2):327-38; Seong HA y colaboradores, Biochem J. 1 de Feb de 2002, 361(Pt 3):597-604) y en el empalme de un pre-ARNm (Vulsteke V y colaboradores, J Biol Chem. 5 de Mar de 2004, 279(10):8642-7. Epub 29 de Dic de 2003). Por añadidura, mediante un análisis del perfil de la expresión génica usando una micromatriz de ADNc de todo el genoma, que contiene 23.040 genes, se mostró recientemente que la expresión de la MELK es regulada al alza en el caso de un cáncer de mama (Lin ML y colaboradores, Breast Cancer Res. 2007; 9 (1):R17, documentos de patentes internacionales WO2006/016525, WO2008/023841). De hecho, la MELK es regulada al alza en varias células cancerosas, por ejemplo, en células de cánceres de pulmón, de vejiga, de linfoma y cervicales (véanse los documentos WO2004/031413, WO2007/013665, y WO2006/085684). Unos análisis por transferencia de bórñon Northern realizados en múltiples tejidos humanos y linajes de células cancerosas demostró que la MELK era sobreexpresada a un nivel significativamente alto en una gran mayoría de los cánceres de mama y de los linajes de células, pero no era expresada en unos órganos vitales humanos (el corazón, el hígado, el pulmón y el riñón) (véase el documento WO2006/016525). El documento WO2005/073374 divulga un nonapéptido (SEQ ID NO: 127 en el documento WO2005/073374) que comprende los últimos 4 aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 del presente invento, así como unos usos clínicos de éste como un agente que induce a los CTL. El documento WO2005/073374 divulga varios péptidos procedentes de la MELK, en donde esos péptidos son

presentados en un antígeno HLA y son reconocidos por los CTL. Además de esto, se mostró que la supresión de la expresión de la MELK por el ARNsi inhibe significativamente el crecimiento de las células cancerosas humanas. De acuerdo con esto, se considera que la MELK es una diana apropiada para la inmunoterapia de un cáncer, y puede esperarse que unos péptidos con epítomos derivados de ella sirvan como unos agentes inmunoterapéuticos de cáncer, que son eficaces en el tratamiento de un gran conjunto de tipos de cáncer.

Resumen del invento

El presente invento se basa en parte en el descubrimiento de unas dianas apropiadas de inmunoterapia. Debido a que los TAAs generalmente son percibidos por el sistema inmunitario como "proprios", y por lo tanto con frecuencia no tienen ninguna inmunogenicidad innata, el descubrimiento de unas dianas apropiadas es de extrema importancia. Reconociendo que la MELK ha sido identificada como regulada al alza en tejidos cancerosos de un cáncer de mama, un cáncer de vejiga, un cáncer cervical, un carcinoma colangio-celular, una leucemia mieloide crónica (CML), un cáncer colorrectal, una endometriosis, un cáncer de esófago, un cáncer gástrico, un cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), un linfoma, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un carcinoma de riñón y un cáncer de pulmón de células pequeñas (SCC), el presente invento tiene como objetivo a esta proteína cinasa del dominio cremallera de leucina embrionaria materna (MELK) (SEQ ID NO: 94), que es codificada por el gen con el n° de acceso al GenBank (banco de genes) NM_014791 (SEQ ID NO: 93) para un ulterior análisis. En particular, unos productos del gen de la MELK, que contienen unos péptidos con epítomos que inducen a unos CTLs específicos para las correspondientes moléculas, se seleccionaron para su estudio. Unas células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) obtenidas de un donante sano fueron estimuladas usando unos péptidos candidatos a la fijación a HLA-A*2402 ó HLA-A*0201, que se derivan de la MELK. Se establecieron unos CTLs, que reconocen específicamente a unas células diana positivas para HLA-A24 ó HLA-A02, pulsados con los respectivos péptidos candidatos, y se identificaron unos péptidos con epítomos que están restringidos a HLA-A24 ó HLA-A02, que pueden inducir unas potentes y específicas respuestas inmunitarias contra la MELK, expresados sobre la superficie de celulares tumorales. Estos resultados demuestran que la MELK es fuertemente inmunogénica y que los epítomos de ésta son unas dianas eficaces para la inmunoterapia de tumores.

Correspondientemente, es un objeto del presente invento poner a disposición unos péptidos que sean capaces de inducir CTLs así como una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. Por añadidura, el presente invento contempla unos péptidos modificados, que tienen una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, en la que uno, dos o más aminoácidos son reemplazados, suprimidos, incorporados y/o añadidos, siempre y cuando que los péptidos modificados retengan la capacidad original para inducir los CTLs.

Cuando son administrados a un sujeto, los presentes péptidos son presentados sobre la superficie de unas células que expresan antígenos y luego inducen a unos CTLs que están dirigidos contra los respectivos péptidos. Por lo tanto, es un objeto de presente invento poner a disposición unas células presentadoras de antígenos, que presentan a cualquiera de los presentes péptidos, así como unos métodos para inducir células presentadoras de antígenos. Una respuesta inmunitaria antitumoral es inducida mediante la administración de los presentes polipéptidos de la MELK o de unos polinucleótidos que codifican los polipéptidos, así como unos exosomas y unas células presentadoras de antígenos, que presentan a los polipéptidos de la MELK. Por lo tanto, es otro objeto del presente invento poner a disposición unos agentes farmacéuticos o unas composiciones que contienen los polipéptidos o los polinucleótidos que los codifican, así como los exosomas y las células presentadoras de antígenos como sus ingredientes activos. Los agentes farmacéuticos del presente invento se utilizan como vacunas.

Un objeto adicional del presente invento es poner a disposición unos métodos para el tratamiento y/o la profilaxis (es decir, la prevención) de cánceres (tumores), y/o la prevención de la recurrencia postoperatoria de éstos, así como unos métodos para inducir CTLs, unos métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra endotelios asociados a tumores y también una inmunidad antitumoral, cuyos métodos incluyen la etapa de administrar los polipéptidos de la MELK, los polinucleótidos que codifican polipéptidos de la MELK, los exosomas o las células presentadoras de antígenos, que presentan los polipéptidos de la MELK, o los agentes farmacéuticos del invento. Por añadidura, los CTLs del invento encuentran utilización también como vacunas contra un cáncer. Ejemplos de cánceres incluyen, pero no están restringidos a, un cáncer de mama, un cáncer de la vejiga, un cáncer cervical, unos carcinomas colangio-celulares, una CML, un cáncer colorrectal, una endometriosis, un cáncer de esófago, un cáncer gástrico, un cáncer de hígado, un NSCLC, un linfoma, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un carcinoma de riñón y un SCC.

Breve descripción de los dibujos

Varios aspectos y usos del presente invento son evidentes para un experto en la especialidad después de considerar la breve descripción de las figuras y la descripción detallada del presente invento y sus formas de realización preferidas tal como sigue:

[fig. 1] La Figura 1 incluye una serie de fotografías, (a) - (i) que describen los resultados de un ensayo IFN-gamma ELISPOT con unos CTLs que fueron inducidos con unos péptidos derivados de la MELK. Los CTLs, que fueron estimulados en el pocillo número #5 con el MELK-A24-9-326 (SEQ ID NO: 14) (a), en el #3 con el MELK-A24-9-78

(SEQ ID NO: 21) (b), en el #4 con el MELK-A24-10-637 (SEQ ID NO: 23) (c), en el #4 con el MELK-A24-10-532 (SEQ ID NO: 27) (d), en el #5 con el MELK-A02-9-138 (SEQ ID NO: 36) (e), en el #3 con el MELK-A02-9-193 (SEQ ID NO: 46) (f), en el #1 con el MELK-A02-9-171 (SEQ ID NO: 57) (g), en el #2 con el MELK-A02-9-71 (SEQ ID NO: 60), (h) y en el #2 con el MELK-A02-9-532 (SEQ ID NO: 62) (i), mostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con el testigo, respectivamente. Las células en los pocillos designados con un cuadro rectangular fueron expandidas para establecer unos linajes de CTL. En las Figuras, "+" indica que las células diana en el pocillo fueron pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica que las células diana no habían sido pulsadas con cualesquiera péptidos.

[fig.2] La Figura 2 incluye una serie de gráficos de líneas, (a) - (i), que representan la producción de IFN-gamma de unos linajes de CTLs estimulados con las SEQ ID NO: 14 (a), SEQ ID NO: 21 (b), SEQ ID NO: 23 (c), SEQ ID NO: 27 (d), SEQ ID NO: 36 (e), SEQ ID NO: 46 (f), SEQ ID NO: 57 (g), SEQ ID NO: 60 (h) y SEQ ID NO: 62 (i) con el ensayo ELISA de IFN-gamma. Los linajes de CTLs establecidos mediante estimulación con cada péptido mostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con el testigo. En las Figuras, "+" indica que las células diana en el pocillo fueron pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica que las células diana no habían sido pulsadas con cualesquiera péptidos.

[fig.3] La Figura 3 representa la producción de IFN-gamma del clon de CTL establecido mediante dilución restringida del linaje de CTL estimulado con la SEQ ID NO: 27. Los resultados representados en el presente contexto demuestran que el clon de CTL establecido mediante estimulación con la SEQ ID NO: 27 mostraba una potente producción de IFN-gamma en comparación con el testigo. En las Figuras, "+" indica que las células diana en el pocillo fueron pulsadas con la SEQ ID NO: 27 y "-" indica que las células diana no habían sido pulsadas con cualesquiera péptidos.

[fig.4] La Figura 4 se compone de unos gráficos de líneas (a) y (b) que representan una actividad específica de CTL de los clones de CTL establecidos con la MELK-A02-9-138 (SEQ ID NO: 36) (a) o con la MELK-A02-9-171 (SEQ ID NO: 57) (b) contra unas células diana que expresan exógenamente la MELK y el HLA-A*0201. Las células diana fueron preparadas transfectado concomitantemente células COS7 con la longitud plena de ambos genes de las moléculas de la MELK y HLA-A*0201 (-rombo cerrado-), y las células diana testigos fueron preparadas transfectado células COS7 con el gen de la molécula de HLA-A*0201, y pulsando con un péptido inapropiado que es diferente de los péptidos con los que habían sido establecidos los clones de CTLs (-triángulo abierto-), o transfectado unas células COS7 con el gen de la MELK (-círculo abierto-). El clon de CTL establecido con la MELK-A02-9-138 (SEQ ID NO: 36) (a) y con la MELK -A02-9-171 (SEQ ID NO: 57) (b) mostraba una potente producción de IFN-gamma contra células COS7 transfectadas tanto con el MELK como con HLA-A*0201 (-rombo cerrado) en comparación con los testigos (-triángulo abierto-, -círculo cerrado-).

Descripción de unas formas de realización

Aunque cualesquiera métodos o materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente contexto se pueden utilizar en la práctica o en ensayo de unas formas de realización del presente invento, los métodos, equipos y materiales preferidos son descritos ahora. No obstante, antes de que se describan los presentes materiales y métodos, se ha de entender que el presente invento no está restringido a los tamaños, las formas, las dimensiones, los materiales, las metodologías, los protocolos, etc., particulares que se describen en el presente contexto, puesto que éstas/os pueden variar de acuerdo con una experimentación y una optimización rutinarias. También se ha de entender que la terminología usada en la descripción es solamente para el objetivo de la descripción de las versiones o formas de realización particulares, y no se pretende restringir el alcance del presente invento, que sólo será restringido por las reivindicaciones adjuntas.

I. Definiciones

La palabra "el" tal como se usa en el presente contexto significa "por lo menos un" siempre y cuando que no se indique específicamente otra cosa.

Los conceptos de "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente contexto para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los conceptos se aplican a unos polímeros de aminoácidos en los que uno o varios residuos de aminoácidos es (son) un(os) residuo(s) modificado(s), o un residuo que no se presenta en la naturaleza, tal como un compuesto químico artificial que es mimético de un correspondiente aminoácido que se presenta en la naturaleza, así como a unos polímeros de aminoácidos que se presentan en la naturaleza.

El concepto de "aminoácido" tal como se usa en el presente contexto se refiere a unos aminoácidos que se presentan en la naturaleza y a unos aminoácidos sintéticos, así como a unos compuestos análogos a aminoácidos y a unos compuestos miméticos de aminoácidos, que tienen una función similar a la de los aminoácidos que se presentan en la naturaleza. Los aminoácidos que se presentan en la naturaleza son aquéllos que son codificados por el código genético, así como aquéllos que son modificados después de su traducción en unas células (por ejemplo, la hidroxiprolina, el gamma-carboxiglutamato y la O-fosfoserina). La frase "compuesto análogo a un aminoácido" se refiere a unos compuestos que tienen la misma estructura química básica (un carbono en posición alfa unido a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) que un aminoácido que se presenta en la naturaleza pero que tienen un grupo R modificado o unos entramados modificados (p.ej, la homoserina, la norleucina, la metionina, el sulfóxido, el metionina metil sulfonio). La frase "compuesto mimético de un aminoácido"

se refiere a unos compuestos químicos, que tienen diferentes estructuras pero tienen unas funciones similares a las de unos aminoácidos generales.

5 A los aminoácidos se puede hacer referencia en lo sucesivo por medio de sus símbolos de tres letras que son usualmente conocidos, o por medio de los símbolos de una sola letra tal como es recomendado por la Comisión de Nomenclatura bioquímica IUPAC-IUB.

10 Los conceptos de "gen", "polinucleótidos", "nucleótidos" y "ácidos nucleicos" se usan de un modo intercambiable en el presente contexto y, a menos que se indique específicamente otra cosa distinta, se designan de un modo similar al de los aminoácidos por medio de sus códigos de una sola letra que son usualmente aceptados.

15 A menos que se defina otra cosa distinta, el concepto de "cáncer" se refiere a los cánceres que sobreexpresan el gen de la MELK, que incluyen unos ejemplos de éstos, pero estando restringidos a, un cáncer de mama, un cáncer de vejiga, un cáncer cervical, un carcinoma colangio-celular, una leucemia mieloide crónica (CML), un cáncer colorrectal, una endometriosis, un cáncer de esófago, un cáncer gástrico, un cáncer de hígado, un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), un linfoma, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un carcinoma de riñón y un cáncer de pulmón de células pequeñas (SCC).

20 A menos que se defina otra cosa distinta, los conceptos de "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" se usan en el presente contexto de un modo intercambiable, y a menos que se indique específicamente otra cosa distinta, ellos se refieren a un conjunto subordinado de linfocitos T que son capaces de reconocer a unas células no propias (por ejemplo, células tumorales, células infectadas por virus) y de inducir la muerte de tales células.

25 A menos que se defina otra cosa distinta, todos los conceptos técnicos y científicos usados en el presente contexto tienen el mismo significado que se comprende usualmente por una persona con experiencia ordinaria en la especialidad a la que pertenece este invento.

II. Péptidos

30 Para demostrar que unos péptidos derivados de la MELK funcionan como un antígeno que es reconocido por linfocitos T citotóxicos (CTLs), unos péptidos derivados de la MELK (SEQ ID NO: 93) fueron analizados para determinar si ellos eran unos epítomos de antígenos restringidos por HLA-A24 o HLA-A02, que son unos alelos de HLA que se encuentran corrientemente (Date Y y colaboradores, Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A y colaboradores, J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT y colaboradores, J Immunol 152: 3913-24, 1994). Unos
35 candidatos para unos péptidos derivados de la MELK que se fijan al HLA-A24 o al HLA-A02, fueron identificados basándose en sus afinidades de fijación al HLA-A24 o al HLA-A02. Después de una estimulación in vitro de las células T por unas células dendríticas (DCs) cargadas con estos péptidos, unos CTLs se establecieron con éxito usando los siguientes péptidos:

40 MELK-A24-9-326 (SEQ ID NO: 14),
MELK-A24-9-78 (SEQ ID NO: 21),
MELK-A24-10-637 (SEQ ID NO: 23),
MELK-A24-10- 532 (SEQ ID NO: 27),
MELK-A02-9-138 (SEQ ID NO: 36),
MELK- A02-9-193 (SEQ ID NO: 46),
45 MELK- A02-9-171 (SEQ ID NO: 57),
MELK- A02-9-71 (SEQ ID NO: 60),

y

50 MELK-A02-9-532 (SEQ ID NO: 62),
Estos CTLs establecidos muestran una potente actividad específica para los CTL contra unas células diana pulsadas con unos respectivos péptidos. Estos resultados del presente contexto demuestran que la MELK es un antígeno reconocido por los CTL y que los péptidos pueden ser unos péptidos con epítomos de la MELK restringidos por el HLA-A24 o el HLA-A02.

55 Puesto que el gen de la MELK es sobreexpresado en la mayoría de los tejidos cancerosos, tales como un cáncer de mama, un cáncer de vejiga, un cáncer cervical, un carcinoma colangio-celular, un CML, un cáncer colorrectal, una endometriosis, un cáncer de esófago, un cáncer gástrico, un cáncer de hígado, un NSCLC, un linfoma, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un carcinoma de riñón y un SCC, él es una buena diana para una inmunoterapia. Así, el presente invento proporciona un nonapéptido (un péptido que se compone de nueve residuos de aminoácidos), que corresponde a un epítomo de la MELK que es reconocido por
60 los CTL. El presente invento se orienta al péptido que se compone de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 36.

65 Por lo general, ciertos programas lógicos (software) actualmente disponibles en el internet, tales como los que se describen en la cita de Parker KC y colaboradores, J Immunol 1 de Ene de 1994, 152(1): 163-75, se pueden usar para calcular las afinidades de fijación entre diversos péptidos y antígenos HLA con ayuda de un ordenador (in silico). La afinidad de fijación con unos antígenos HLA se puede medir tal como se describe, p.ej. en las referencias de Parker KC y colaboradores, J Immunol 1 de Ene de 1994, 152(1): 163-75; y de Kuzushima K y colaboradores,

Blood 2001, 98(6): 1872-81. Los métodos para determinar una afinidad de fijación se describen, p.ej. en Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190.; Protein Science, 2000, 9: 1838-1846. Así el presente invento comprende unos péptidos de la MELK que se fijan a unos antígenos HLA que son identificados mediante tales programas conocidos

El nonapéptido del presente invento puede ser flanqueado por unos residuos de aminoácidos adicionales siempre y cuando que el péptido resultante retenga la capacidad para inducir los CTLs. Tales péptidos, que tienen una capacidad para inducir los CTLs, tienen típicamente menos que 40 aminoácidos, con frecuencia menos que aproximadamente 20 aminoácidos, y usualmente menos que aproximadamente 15 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos particular que flanquea al nonapéptido del presente invento (el péptido que se compone de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 36) no está restringida y se puede componer de cualquier tipo de aminoácidos siempre y cuando que ella no perjudique a la capacidad para inducir los CTLs del péptido original. Así, el presente invento proporciona, por lo tanto, unos péptidos que tienen la capacidad para inducir los CTLs y que incluyen la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 36.

Por lo general, la modificación de uno, dos o más aminoácidos en una proteína no influirá sobre la función de la proteína, y en algunos casos, incluso mejorará la función deseada de la proteína original. En efecto, se sabe que unos péptidos modificados (es decir, unos péptidos que se componen de una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios residuos de aminoácidos han sido modificados (es decir, reemplazados, suprimidos, añadidos o insertados en comparación con la secuencia original de referencia) retienen la actividad biológica del péptido original (Mark y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13). Así, en una forma de realización, los péptidos del presente invento pueden tener tanto la capacidad para inducir los CTLs como una secuencia de aminoácidos seleccionada SEQ ID NO: 36, en la que uno, dos o incluso más aminoácidos han sido añadidos, insertados, suprimidos y/o reemplazados.

Los expertos en la especialidad reconocen que una modificación individual de una secuencia de aminoácidos, que altera un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos, tiende a dar como resultado la conservación de las propiedades de la original cadena lateral de aminoácido. Como tales, ellas son designadas frecuentemente como "sustituciones conservativas" o "modificaciones conservativas", en las que la alteración de una proteína da como resultado una proteína modificada, que tiene una función análoga a la de la proteína original. Unas tablas de sustituciones conservativas que proporcionan unos aminoácidos que son funcionalmente similares, son bien conocidas en la especialidad. Unos ejemplos de características de cadenas laterales de aminoácidos, que son deseables de conservar incluyen, por ejemplo, los aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), los aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), y unas cadenas laterales que tienen en común los siguientes grupos funcionales o las siguientes características; una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene un grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene un átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene un ácido carboxílico y una amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene una base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene un grupo aromático (H, F, Y, W). Por añadidura, los siguientes ocho conjuntos contienen en cada caso unos aminoácidos que son aceptados en la técnica como sustituciones conservativas para otro:

- 1) alanina (A), glicina (G);
- 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) asparagina (N), glutamina (Q);
- 4) arginina (R), lisina (K);
- 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V);
- 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W);
- 7) serina (S), treonina (T); y
- 8) cisteína (C), metionina (M) (véase, p.ej. Creighton, Proteins 1984).

Se considera también que tales péptidos modificados conservativamente son péptidos del presente invento. No obstante, los péptidos del presente invento no están restringidos a éstos y pueden incluir unas modificaciones no conservativas, siempre y cuando que el péptido modificado retenga la capacidad del péptido original para inducir CTLs. Además de esto, los péptidos modificados no deberían excluir a unos péptidos que sean capaces de inducir los CTLs de unas variantes polimórficas, unos homólogos interespecies, y unos alelos de la MELK.

Para retener la requerida capacidad para inducir CTLs se puede modificar (insertar, suprimir, añadir y/o sustituir) un pequeño número (por ejemplo, 1, 2 o varios) o un pequeño porcentaje de aminoácidos. En el presente contexto, el concepto de "varios" significa 5 o menos aminoácidos, por ejemplo, 4 o 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos que deben de ser modificados es de manera preferida de 20 % o menos, de manera más preferida de 15 % o menos, de manera todavía más preferida de 10 % o menos, o de 1 a 5 %.

El análisis de la homología de la MELK-A-02-9-138 (SEQ ID NO: 36) confirmó que este péptido no tiene ninguna significativa homología con unos péptidos que se deriven de cualesquiera otros productos de genes humanos conocidos. Así, disminuye significativamente la posibilidad de que este péptido genere una respuesta inmunitaria desconocida o indeseada cuando sea usado para la inmunoterapia. Correspondientemente, se espera que este

péptido sea muy útil para inducir una inmunidad contra la MELK en pacientes de tumores en unas células cancerosas, tales como un cáncer de mama, un cáncer de vejiga, un cáncer cervical, un carcinoma colangio-celular, una CML, un cáncer colorrectal, una endometriosis, un cáncer de esófago, un cáncer gástrico, un cáncer de hígado, un NSCLC, un linfoma, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un carcinoma de riñón y un SCC.

Cuando sean usados en el contexto de la inmunoterapia, los péptidos del presente invento deberían ser presentados sobre la superficie de una célula o un exosoma, de manera preferida como un complejo con un antígeno HLA. Por ello, se deberán seleccionar de manera preferida unos péptidos que no sólo induzcan a los CTLs sino que posean también una alta afinidad de fijación para el antígeno HLA. A este fin, los péptidos pueden ser modificados mediante una sustitución, inserción, supresión y/o adición de los residuos de aminoácidos para producir un péptido modificado que tiene una afinidad de fijación mejorada. Además de los péptidos que se presentan en la naturaleza, puesto que ya se conoce la regularidad de las secuencias de péptidos que se muestran mediante fijación a antígenos HLA (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), unas modificaciones basadas en tal regularidad puede ser introducida en los péptidos inmunogénicos del presente invento. Los péptidos, que poseen una alta afinidad de fijación al HLA-A02, tienen su segundo aminoácido desde el extremo terminal de N sustituido por leucina o metionina, y/o el aminoácido situado junto al extremo terminal de C sustituido por valina o leucina. Así, los péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 36, en la que el segundo aminoácido desde el extremo terminal de N está sustituido por leucina o metionina, y/o en la que el extremo terminal de C está sustituido por valina o leucina, son abarcados por el presente invento. Las sustituciones pueden ser introducidas no sólo junto a los aminoácidos terminales sino también junto a la posición del reconocimiento del TCR potencial de los péptidos. Varios estudios han demostrado que unas sustituciones de aminoácidos en un péptido pueden ser iguales al original o mejores que el original, por ejemplo, CAP1, p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎, Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ o gp 100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba y colaboradores. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann y colaboradores. J Immunol. (2002) Feb 1;168(3):1338-47., S. O. Dionne y colaboradores. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 y S. O. Dionne y colaboradores. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

El presente invento contempla también la adición de uno o dos aminoácidos al extremo terminal de N y/o C de los péptidos descritos. Tales péptidos modificados, que tienen una alta afinidad de fijación a un antígeno HLA y que han conservado la capacidad de inducir los CTLs, son incluidos también dentro del presente invento.

Sin embargo, cuando la secuencia peptídica es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, luego pueden ser inducidos ciertos efectos secundarios tales como ciertas enfermedades autoinmunitarias y/o unos síntomas alérgicos frente a unas sustancias específicas. Por ello, se prefiere realizar en primer lugar unas búsquedas de homología usando unas bases de datos que están disponibles con el fin de evitar unas situaciones en las que la secuencia del péptido coincida con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando a partir de las búsquedas de homología se haya esclarecido que no existe ni siquiera un sólo péptido con 1 o 2 diferencias de aminoácidos, en comparación con el péptido objetivo, el péptido objetivo puede ser modificado con el fin de aumentar su afinidad de fijación a los antígenos HLA, y/o aumentar su capacidad para inducir los CTLs sin que exista ningún peligro de tales efectos secundarios.

A pesar de que se espera que sean altamente eficaces unos péptidos que tienen una alta afinidad de fijación para los antígenos HLA que se han descrito más arriba, los péptidos candidatos, que son seleccionados de acuerdo con la presencia de una alta afinidad de fijación como un indicador, son examinados ulteriormente en cuanto a la presencia de la capacidad para inducir CTLs. En el presente contexto, la expresión "capacidad para inducir CTLs" indica la capacidad del péptido para inducir linfocitos citotóxicos (CTLs), cuando él es presentado sobre unas células presentadoras de antígenos. Además, la expresión "capacidad para inducir CTLs" incluye la capacidad del péptido para inducir una activación de CTLs, una proliferación de CTLs, promover la lisis por los CTLs de las células diana, y aumentar la producción de IFN-gamma por los CTLs.

La confirmación de la capacidad para inducir CTLs se efectúa induciendo unas células presentadoras de antígenos, que son portadoras de antígenos del MHC humano (por ejemplo, los linfocitos B, los macrófagos, y las células dendríticas (DCs)) estimulando con los péptidos, mezclando las células presentadoras de antígenos, que han sido inducidas, con unas células positivas para CD8, y midiendo luego el IFN-gamma producido y liberado por los CTL contra las células diana. De manera preferida, las células presentadoras de antígenos son unas DCs derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana. Como el sistema de reacción, unos animales transgénicos que han sido producidos para expresar un antígeno HLA humano (por ejemplo, los que se han descrito en la cita de BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8): 764-79, artículos relacionados, libros, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response [Inducir la vinculación de la respuesta de CTL mediante una vacuna con un epítipo mínimo en ratones transgénicos HLA A*0201/DR1: dependencia de la respuesta de los T(H) restringidos por HLA de clase II]. Por ejemplo, las células diana pueden ser marcadas radiactivamente con ⁵¹Cr u otros similares, y la actividad citotóxica puede ser calculada a partir de la radiactividad liberada por las células diana. Alternativamente, la capacidad para inducir CTLs puede ser determinada midiendo el IFN-gamma producido y liberado por los CTL en presencia de unas células presentadoras de antígenos

(APCs), que son portadoras de péptidos inmovilizados, y visualizando la zona de inhibición en los medios usando unos anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

Como un resultado de la determinación de la capacidad para inducir CTLs de los péptidos, tal como se ha descrito más arriba, se descubrió que estos péptidos, de los que se ha predicho que tienen una alta afinidad de fijación a un antígeno HLA, no tienen necesariamente una alta capacidad para inducir CTLs. Sin embargo, en el caso del nonapéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 36 se encontró una capacidad particularmente alta para inducir CTLs.

Además de las modificaciones más arriba descritas, los péptidos del presente invento pueden ser unidos a otras sustancias, siempre y cuando que el péptido unido resultante conserve la requerida capacidad para inducir CTLs del péptido original. Unos ejemplos de sustancias apropiadas incluyen, pero no están restringidas a: péptidos, lípidos, azúcares y cadenas de azúcares, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener unas modificaciones tales como una glicosilación, una oxidación de cadenas laterales, o una fosforilación, etc., con la condición de que las modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Estas clases de modificaciones se pueden realizar para conferir funciones adicionales (por ejemplo, una función de dirección a un objetivo y una función de entrega) o para estabilizar al polipéptido.

Por ejemplo, para aumentar la estabilidad in vivo de un polipéptido, en la especialidad técnica se conoce el hecho de introducir unos D-aminoácidos, unos compuestos miméticos de aminoácidos o unos aminoácidos no naturales; este concepto se puede adaptar también a los presentes polipéptidos. La estabilidad de un polipéptido se puede ensayar de un cierto número de maneras. Por ejemplo, las peptidasas y diversos medios biológicos, tales como un plasma y un suero humanos, se pueden usar para ensayar la estabilidad (véase, p.ej., Verhoef y colaboradores, Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

Adicionalmente, los péptidos del presente invento pueden ser unidos a otros péptidos a través de unos espaciadores o engarzadores. Unos ejemplos de otros péptidos incluyen, pero no están restringidos a, unos péptidos inducibles por CTL derivados de otros TAAs. Alternativamente, dos o más péptidos del presente invento pueden ser unidos a través de unos espaciadores o engarzadores. Los péptidos unidos a través de unos espaciadores o engarzadores pueden ser iguales o diferentes unos de otros. Los espaciadores o engarzadores no están restringidos específicamente, pero ellos son preferiblemente unos péptidos, de manera más preferida unos péptidos que tienen uno o más sitios de disociación, que son capaces de ser disociados por unas enzimas tales como peptidasas, proteasas y proteasomas. Unos ejemplos de engarzadores o espaciadores incluyen, pero no están restringidos a: AAY (P. M. Daftarian y colaboradores, J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Suttmüller y colaboradores, J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) o, de uno a varios residuos de lisina (S. Ota y colaboradores, Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura y colaboradores, J Immunol. 2002, 168: 5709-5715). Los péptidos del presente invento comprenden aquellos péptidos que están unidos con otros péptidos a través de espaciadores o engarzadores.

Los péptidos del presente invento pueden existir sobre la superficie de una célula que es portadora de unos antígenos del MHC humano (por ejemplo, una célula presentadora de antígenos) o de un exosoma en forma de unos complejos en combinación con unas moléculas del MHC e inducen luego a los CTLs. Las células y los exosomas se pueden producir mediante unos métodos bien conocidos en la especialidad, por ejemplo, las células se pueden producir poniendo en contacto con los péptidos del presente invento, y los exosomas se pueden producir recogiendo una fracción que contiene exosomas a partir de las células que han sido puestas en contacto con los péptidos del presente invento (véanse, por ejemplo, la Solicitud de Patente Japonesa Kohyo Publications Nos. Hei 11-510507 y el documento WO99/03499). Los péptidos del presente invento comprenden aquellos péptidos, que existen sobre la superficie de una célula o de un exosoma en forma de unos complejos en combinación con unas moléculas del MHC.

En el presente contexto, los péptidos del presente invento pueden ser descritos también como "péptido(s) de la MELK" o "polipéptido(s) de la MELK"

III. Preparación de péptidos de la MELK

Los péptidos del presente invento se pueden preparar usando unas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar sintéticamente, usando una tecnología de ADN recombinante o mediante una síntesis química. Un péptido del invento se puede sintetizar individualmente o como unos polipéptidos más largos, que se componen de dos o más péptidos. Los péptidos se pueden aislar luego, por ejemplo se pueden purificar o aislar de tal manera que estén sustancialmente exentos de otras proteínas celulares del anfitrión que se presentan en la naturaleza, y de unos fragmentos de éstas, o de otras sustancias químicas.

Un péptido del presente invento se puede obtener mediante una síntesis química basada en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Ejemplos de unos métodos convencionales de síntesis de péptidos que pueden ser adaptados a la síntesis incluyen, pero no están restringidos a:

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966;
- (ii) The Proteins, tomo 2, Academic Press, Nueva York, 1976;
- (iii) Peptide Synthesis (en japonés), Maruzen Co., 1975;

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

Alternativamente, los presentes péptidos se pueden obtener adaptando cualquier método de ingeniería genética conocido para producir péptidos (p.ej., Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (coordinadores de edición Wu y colaboradores.) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, primeramente se prepara un vector apropiado, que alberga a un polinucleótido que codifica el péptido objetivo en una forma expresable (por ejemplo, secuencia abajo de una secuencia reguladora que corresponde a una secuencia promotora) y se transforma en una célula anfitriona apropiada. La célula anfitriona se cultiva luego para producir el péptido de interés. El péptido se puede producir también in vitro adoptando un sistema de traducción in vitro.

IV. Polinucleótidos

El presente invento proporciona también un polinucleótido que codifica cualquiera de los péptidos antes mencionados del presente invento. Éstos incluyen unos polinucleótidos que se derivan del gen de la MELK que se presenta en la naturaleza (n° de acceso al GenBank NM_014791 (SEQ ID NO: 93) así como aquéllos que tienen una secuencia de nucleótidos modificada conservativamente. En el presente contexto, la frase "secuencia de nucleótidos modificada conservativamente" se refiere a las secuencias que codifican unas secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos que son funcionalmente idénticos, codifica cualquier proteína establecida. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos ellos el aminoácido alanina. Así, en cualquier posición en la que la alanina es especificada por un codón, el codón puede ser alterado en uno de los codones correspondientes que se han descrito sin alterar al polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que constituyen una especie de variaciones modificadas conservativamente. Cada secuencia de ácido nucleico mencionada en el presente contexto, que codifica un péptido, describe también cualquier posible variación silenciosa del ácido nucleico. Una persona con experiencia ordinaria en la especialidad reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto el AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y el TGG, que es generalmente el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. correspondientemente, cualquier variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un péptido, es descrita implícitamente en cada secuencia divulgada.

El polinucleótido del presente invento se puede componer de un ADN, un ARN y unos derivados de los mismos. Un ADN se compone de manera adecuada de unas bases tales como A, T, C, y G, y T se reemplaza por U en un ARN.

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

Para producir los polinucleótidos del presente invento, se pueden emplear tanto unas técnicas de síntesis recombinantes como unas químicas. Por ejemplo, un polinucleótido se puede producir por inserción dentro de un vector apropiado, que puede ser expresado cuando se ha transfectado dentro de una célula competente. Alternativamente, un polinucleótido se puede amplificar usando técnicas de PCR o la expresión en unos anfitriones adecuados (véase, p.ej., la cita de Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989). Alternativamente, un polinucleótido se puede sintetizar usando las técnicas de fase sólida, que se han descrito en Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes y colaboradores, EMBO J 1984, 3: 801-5.

Los vectores que contienen el polinucleótido del presente invento y las células anfitrionas que albergan estos vectores también se incluyen en el presente invento.

V. Exosomas

El presente invento proporciona además unas vesículas intracelulares denominadas exosomas, que presentan los complejos formados entre los péptidos de este invento y los antígenos HLA sobre su superficie. Unos exosomas se pueden preparar, por ejemplo, usando los métodos detallados en el documento de publicación de solicitud de patente japonesa Kohyo n° Hei 11-510507 y en el documento WO99/3499, y se pueden preparar usando unas APCs obtenidas a partir de unos pacientes, que están sometidos a tratamiento y/o prevención. Los exosomas de este invento se pueden inocular como vacunas, de una manera similar a los péptidos de este invento.

El tipo de antígenos HLA que están contenidos en los complejos debe coincidir con el del sujeto que requiere tratamiento y/o prevención. Por ejemplo, en la población japonesa, es predominante el HLA-A24, en particular el HLA-A2402, y por lo tanto sería apropiado para el tratamiento de un paciente japonés. El uso del tipo A24 o del tipo A02, que es altamente expresado entre los japoneses y los caucásicos es favorable para la obtención de unos resultados efectivos, y también se pueden usar unos subtipos tales como el A2402 o el A0201. Típicamente, en el sector clínico, el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento, se investiga por adelantado, lo que permite la selección apropiada de unos péptidos que tienen altos niveles de afinidad de fijación para el antígeno particular, o que tienen la capacidad de inducir CTLs mediante presentación de antígenos. Además, con el fin de obtener unos péptidos que tengan tanto una alta afinidad de fijación y una capacidad de inducir CTLs, se puede realizar la sustitución, la inserción o la adición de 1, 2 o varios aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido parcial de la MELK que se presenta en la naturaleza. Cuando se usa un exosoma que incluye el antígeno HLA A02, se puede emplear un péptido que tiene la secuencia SEQ ID NO: 36.

VI. Células presentadoras de antígenos (APCs)

El presente invento también proporciona unas APCs aisladas, que presentan sobre su superficie unos complejos formados entre los antígenos HLA y los péptidos de este invento. Las APCs que se obtienen poniendo en contacto los péptidos de este invento, o introduciendo los nucleótidos que codifican los péptidos de este invento en una forma expresable, se pueden obtener a partir de unos pacientes que son sometidos a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar como vacunas por sí solas o en combinación con otros fármacos, que incluyen los péptidos de este invento, 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 conocidas por presentar antígenos proteicos sobre su superficie celular con el fin de ser reconocidos por linfocitos. Puesto que una DC es una APC representativa, que tiene el más fuerte efecto de inducir CTLs entre las APCs, las DCs se emplean como las APCs del presente invento.

Por ejemplo, una APC se puede obtener induciendo DCs a partir de monocitos de sangre periférica y luego poniéndolas en contacto (estimulándolas) con los péptidos de este invento in vitro, ex vivo o in vivo. Cuando los péptidos de este invento son administrados a los sujetos, las APCs que presentan los péptidos de este invento son inducidas en el cuerpo del sujeto. La expresión "inducir las APC" incluye poner en contacto (estimular) una célula con los péptidos de este invento, o los nucleótidos que codifican los péptidos de este invento para presentar los complejos formados entre los antígenos HLA y los péptidos de este invento sobre la superficie de la célula. Después de la introducción de los péptidos de este invento en las APCs para permitir que las APCs presenten los péptidos, las APCs se pueden administrar al sujeto como una vacuna. Por ejemplo, la administración ex vivo puede incluir las etapas de:

- a: recoger las APCs procedentes de un primer sujeto;
- b: poner en contacto con el péptido a las APCs de la etapa a, y
- c: administrar las APCs cargadas con el péptido a un segundo sujeto.

El primer sujeto y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo, o pueden ser individuos diferentes. Alternativamente, de acuerdo con el presente invento, se proporciona el uso de los péptidos de este invento para la producción de una composición farmacéutica que induce células presentadoras de antígenos. Además, el presente invento proporciona un método o procedimiento para la producción de una composición farmacéutica destinada a inducir células presentadoras de antígenos, en donde el método o procedimiento incluye la etapa de añadir y mezclar o de formular el péptido del presente invento con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por añadidura, el presente invento proporciona también los péptidos del presente invento para inducir células presentadoras de antígenos. Las APCs obtenidas en la etapa (b) se pueden administrar al sujeto como una vacuna.

De acuerdo con un aspecto del presente invento, las APCs del presente invento tienen un alto nivel de capacidad de inducir CTLs. En el concepto "alto nivel de capacidad de inducir CTLs", el alto nivel es relativo al nivel de las APCs que no están en contacto con ningún péptido o con unos péptidos que no pueden inducir las CTLs. Tales APCs, que tienen un alto nivel de capacidad de inducir CTLs, se pueden producir mediante un método que incluye la etapa de transferir unos genes que contienen polinucleótidos, que codifican los péptidos de este invento, a unas APCs in vitro. Los genes introducidos pueden presentarse en forma de ADN o ARN. Ejemplos de métodos para la introducción incluyen, sin restricciones particulares, diversos métodos que se llevan a cabo convencionalmente en este sector, tales como la lipofección, la electroporación y el método de fosfato de calcio. Más específicamente, él se puede llevar a cabo tal y como se describe en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; en la traducción japonesa publicada del documento de publicación Internacional n° 2000-509281. Transfiriendo el gen dentro de APCs, el gen es sometido a transcripción, traducción u otros similares en la célula, y luego, la proteína obtenida es procesada por el MHC de Clase I o Clase II, y avanza por una ruta de presentación para presentar péptidos.

VII. Células T citotóxicas (CTLs)

Una célula T citotóxica inducida contra cualquiera de los péptidos del presente invento refuerza la respuesta inmunitaria dirigiéndose hacia endotelios asociados a tumores in vivo, y por lo tanto se puede usar como vacunas, de un modo similar a los péptidos propiamente dichos. De esta manera, el presente invento proporciona también

Tales células T citotóxicas se pueden obtener (1) administrando el péptido del presente invento a un sujeto y recogiendo luego las células T citotóxicas a partir del sujeto, o (2) poniendo en contacto (estimulando) las APCs derivadas del sujeto con unas células positivas para CD8, o a unos leucocitos mononucleares de sangre periférica in vitro con los péptidos del presente invento y luego aislando las células T citotóxicas.

Las células T citotóxicas, que han sido inducidas por estimulación con APCs y que presentan los péptidos de este invento, se pueden derivar de unos pacientes, que son sometidos a tratamiento y/o prevención, y pueden ser administradas por sí solas o en combinación con otros fármacos que incluyen los péptidos de este invento, o unos exosomas con la finalidad de regular los efectos. Las células T citotóxicas, que se han obtenido, actúan específicamente contra unas células dianas que presentan los péptidos de este invento, o, por ejemplo, los mismos péptidos que se han usado para la inducción. Dicho de otra manera, las células T citotóxicas pueden reconocer (es decir, pueden fijarse a) un complejo formado entre un antígeno HLA y el péptido del presente invento sobre la superficie de una célula diana con el receptor de células T, y luego puede atacar a la célula diana para inducir la muerte de esta célula diana. Las células diana pueden ser unas células que expresan endógenamente la MELK, o unas células que son transfectadas con el gen de la MELK; y unas células que presentan un péptido de este invento sobre la superficie celular debido a la estimulación con el péptido, pueden servir también como dianas del ataque de los CTLs activados.

VIII. Receptor de células T (TCR)

El presente invento proporciona también una composición que contiene una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica unos polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de células T (TCR), y unos métodos para usarla. Las subunidades del TCR tienen la capacidad de formar unos TCRs que confieren una especificidad a las células T frente a las células tumorales que presentan la MELK. Usando los métodos conocidos en la especialidad, puede ser identificada la secuencia de ácidos nucleicos de las cadenas alfa- y beta del TCR que es expresada en el CTL inducido con un péptido del presente invento (documento WO2007/032255 y Morgan y colaboradores, J Immunol, 171, 3288 (2003)). Los TCRs derivados se pueden fijar al péptido de MELK que es presentado sobre las células diana con una alta avidéz, y opcionalmente pueden mediar una aniquilación eficiente de las células diana que presentan el péptido de MELK in vivo e in vitro.

La secuencia de ácidos nucleicos, que codifica las subunidades del TCR, puede ser incorporada en unos vectores apropiados, p.ej. en unos vectores retrovíricos. Estos vectores son bien conocidos en la especialidad. Los ácidos nucleicos, o los vectores que los contienen, pueden ser transferidos provechosamente a una célula T, por ejemplo, a una célula T procedente de un paciente. Ventajosamente, el invento proporciona una composición disponible en estantes, que permite una rápida modificación de unas células T propias de un paciente (o las de otro mamífero) para producir rápida y fácilmente unas células T modificadas que tienen unas excelentes propiedades para aniquilar a células cancerosas.

Por lo tanto, el presente invento proporciona unos CTLs, que son preparados mediante transducción con los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de subunidades del TCR, que se fijan al péptido de la MELK, p.ej. la SEQ ID NO: 36 en el contexto del HLA-A02. Los CTLs transducidos son capaces de dirigirse hacia unas células cancerosas in vivo, y pueden ser expandidos mediante unos métodos de cultivación in vitro bien conocidos (véase, p.ej. Kawakami y colaboradores, J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Las células T del invento se pueden usar en forma de una composición inmunógena, que es apropiada para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un paciente que necesita una terapia o protección (documento WO2006/031221).

IX. Agentes o composiciones farmacéuticos/as

Los conceptos de "prevención y profilaxis" incluyen cualquier actividad que reduzca la carga de la mortalidad o morbilidad procedente de una enfermedad. La prevención y la profilaxis pueden tener lugar "en niveles de prevención primaria, secundaria y terciaria". Si bien la prevención y la profilaxis primarias evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles de prevención y profilaxis secundarias y terciarias abarcan unas actividades destinadas a la prevención y la profilaxis de la progresión de una enfermedad y el brote de síntomas, así como la reducción del impacto negativo de una enfermedad ya establecida, restaurando la función y reduciendo las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y la profilaxis pueden incluir una amplia gama de terapias profilácticas dirigidas a aliviar la gravedad del trastorno particular, por ejemplo, a reducir la proliferación y la metástasis de tumores.

El tratamiento y/o la profilaxis de un cáncer o de un tumor y/o la prevención de una recurrencia postoperatoria del mismo, incluyen cualquiera de las siguientes etapas, tales como la extirpación quirúrgica de células cancerosas, la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la involución o la regresión de un tumor, la inducción de la remisión

y supresión de la aparición de un cáncer, la regresión de un tumor y la reducción o la inhibición de unas metástasis. El tratamiento eficaz y/o la profilaxis de un cáncer disminuye(n) la mortalidad y mejora(n) el pronóstico de los individuos que tienen un cáncer, disminuye(n) los niveles de marcadores tumorales en sangre y alivia los síntomas detectables que acompañan a un cáncer. Por ejemplo, la reducción o la mejoría de los síntomas constituye un

tratamiento eficaz y/o la profilaxis, incluye(n) un 10 %, 20%, 30 % o más de reducción, o una enfermedad estable.

Puesto que la expresión de la MELK es regulada al alza en varios tipos de cáncer, en comparación con un tejido normal, los péptidos de este invento o los polinucleótidos que codifican tales péptidos, se pueden usar para el tratamiento y/o para la profilaxis de un cáncer o de un tumor, y/o para la prevención de la recurrencia postoperatoria del mismo. Por lo tanto, el presente invento proporciona un agente o una composición farmacéutico/a para el tratamiento y/o para la prevención de un cáncer o de un tumor, y/o para la prevención de la recurrencia postoperatoria del mismo, que incluye uno o más de los péptidos de este invento, o de los polinucleótidos que codifican los péptidos, como un ingrediente activo. Alternativamente, los presentes péptidos pueden ser expresados sobre la superficie de cualquiera de los/las precedentes exosomas o células, tales como las APCs, para el uso como agentes o composiciones farmacéuticos/as. Además, las células T citotóxicas anteriormente mencionadas que están dirigidas hacia cualquiera de los péptidos del presente invento, también se pueden usar como el ingrediente activo de los/las presentes agentes o composiciones farmacéuticos/as. En el contexto del presente invento, la expresión "dirigidos a un péptido" se refiere a reconocer (es decir, fijarse a) un complejo formado entre un antígeno HLA y un péptido sobre la superficie de una célula diana con el receptor de células T, y luego atacar a la célula diana para inducir la muerte de esta célula diana.

En otra forma de realización, el presente invento proporciona también el uso de un ingrediente activo seleccionado entre:

- (a) un péptido del presente invento,
 - (b) un ácido nucleico que codifica dicho péptido, tal como se divulga en este documento, en una forma expresable,
 - (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido del presente invento sobre su superficie, y
 - (d) una célula T citotóxica del presente invento
- en la producción de una composición o un agente farmacéutico destinada/o a tratar un cáncer o tumor.

Alternativamente, el presente invento proporciona además un ingrediente activo seleccionado entre:

- (a) un péptido del presente invento,
 - (b) un ácido nucleico que codifica dicho péptido, tal como se divulga en este documento, en una forma expresable,
 - (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido del presente invento sobre su superficie, y
 - (d) una célula T citotóxica del presente invento
- para el uso en el tratamiento de un cáncer o tumor.

Alternativamente, el presente invento proporciona además un método o procedimiento para la producción de una composición o un agente farmacéutico/a para el tratamiento de un cáncer o tumor, en donde el método o procedimiento incluye la etapa de formular un vehículo farmacéutico o fisiológicamente aceptable con un ingrediente activo seleccionado entre:

- (a) un péptido del presente invento,
 - (b) un ácido nucleico que codifica dicho péptido, tal como se divulga en este documento, en una forma expresable,
 - (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido del presente invento sobre su superficie, y
 - (d) una célula T citotóxica del presente invento
- como ingredientes activos.

En otra forma de realización, el presente invento proporciona además un método o procedimiento para la producción de una composición o un agente farmacéutico/a para el tratamiento de un cáncer o tumor, en donde el método o procedimiento incluye la etapa de añadir y mezclar un ingrediente activo con un vehículo farmacéutico o fisiológicamente aceptable, en donde el ingrediente activo se selecciona entre:

- (a) un péptido del presente invento,
- (b) un ácido nucleico que codifica dicho péptido, tal como se divulga en este documento, en una forma expresable,
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido del presente invento sobre su superficie, y
- (d) una célula T citotóxica del presente invento

Alternativamente, la composición o el agente farmacéutico/a del presente invento se puede usar para cualquiera de para ambas finalidades de profilaxis de un cáncer o tumor y de prevención de una recurrencia postoperatoria del mismo.

Los/las presentes agentes o composiciones farmacéuticos/as encuentran uso como una vacuna. En el contexto del presente invento, la expresión "vacuna" (también designada como una "composición inmunógena") se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir una inmunidad antitumoral después de su inoculación en animales.

Los/las agentes o composiciones farmacéuticos/as del presente invento se pueden usar para el tratamiento y/o la prevención de cánceres o tumores, y/o para la prevención de una recurrencia postoperatoria de los mismos, en unos sujetos o pacientes que incluyen seres humanos y cualquier otro mamífero, que incluye, pero no está restringido a,

un ratón, una rata, un cobaya, un conejo, un gato, un perro, una oveja, una cabra, un cerdo, un animal bovino, un caballo, un mono, un babuino y un chimpancé, particularmente un animal de importancia comercial o un animal domesticado.

De acuerdo con el presente invento, se ha encontrado que unos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 36 son unos péptidos con epítomos restringidos por HLA-A02 o respectivamente unos candidatos a éstos, que pueden inducir una fuerte y específica respuesta inmunitaria. Por lo tanto, los/las presentes agentes o composiciones farmacéuticos/as, que contienen uno cualquiera de estos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36, son particularmente apropiados para su administración a unos sujetos cuyo antígeno HLA es el HLA-A02. Lo mismo es válido para los agentes farmacéuticos, que incluyen unos polinucleótidos que codifican uno cualquiera de estos polipéptidos.

Los cánceres o tumores que deben de ser tratados por los/las agentes o composiciones farmacéuticos/as del presente invento incluyen todas las clases de cánceres o tumores, en los que está involucrada la MELK, que incluyen, por ejemplo, un cáncer de vejiga, un cáncer de mama, un cáncer cervical, un carcinoma colangio-celular, una CML, un cáncer colorrectal, una endometriosis, un cáncer de esófago, un cáncer gástrico, un cáncer de hígado, un NSCLC, un linfoma, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un carcinoma de riñón y un SCC.

Los/las presentes agentes o composiciones farmacéuticos/as pueden contener, además de los ingredientes activos precedentemente mencionados, otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTLs contra células cancerosas, otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, u otros similares. En el presente contexto, los otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTLs contra células cancerosas son ejemplificados por unos antígenos específicos para un cáncer (por ejemplo, unos TAAs identificados)

En caso necesario, los/las agentes o composiciones farmacéuticos/as del presente invento pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como un ingrediente activo, siempre y cuando que la sustancia no inhiba el efecto antitumoral del ingrediente activo, p.ej., cualquiera de los presentes péptidos. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir agentes anti-inflamatorios, analgésicos, agentes quimioterapéuticos, u otros similares. Además de incluir otras sustancias terapéuticas en el propio medicamento, los medicamentos del presente invento también se pueden administrar secuencial o concurrentemente con el uno o los más otros agentes farmacológicos. Las cantidades del medicamento y del agente farmacológico dependen, por ejemplo, de qué tipo de agente(s) farmacológico(s) se use(n), de la enfermedad que se esté tratando, y de la programación y las vías de administración.

Se deberá de entender que además de los ingredientes que se han mencionado particularmente en el presente documento, los/las agentes o composiciones farmacéuticos/as de este invento pueden incluir otros agentes convencionales en la especialidad teniendo en cuenta el tipo de la formulación en cuestión.

En una forma de realización del presente invento, los/las presentes agentes o composiciones farmacéuticos/as se pueden incluir en unos artículos de fabricación y unos estuches, que contienen unos materiales que son útiles para el tratamiento de las condiciones patológicas de la enfermedad que debe de ser tratada, verbigracia, un cáncer. El artículo de fabricación puede incluir un envase con todos/as los/las agentes o composiciones farmacéuticos/as con una etiqueta. Unos envases apropiados incluyen botellas, ampollas y tubos de ensayo. Los envases pueden componerse de una gran variedad de materiales, tales como vidrio o un material plástico. Las etiquetas pegadas al envase deberían indicar el agente que se usa para el tratamiento o la prevención de una o más condiciones de la enfermedad. La etiqueta puede indicar también unas instrucciones para la administración, etc.

Además del envase más arriba descrito, un estuche que incluye un agente o una composición farmacéutico/a del presente invento puede incluir adicionalmente, de manera opcional, un segundo envase que aloja un diluyente farmacéuticamente aceptable. Él puede incluir adicionalmente otros materiales que son deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros/as tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones para el uso.

Los agentes o las composiciones farmacéuticos/as se pueden presentar, en caso deseado, en un paquete o en un dispositivo dispensador, que puede contener uno o más formas de dosificación unitaria, que contiene(n) el ingrediente activo. El paquete puede incluir, por ejemplo, una lámina de metal o material plástico, tal como un envase blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de unas instrucciones para la administración.

(1) Agentes o composiciones farmacéuticos/as que contienen los péptidos como el ingrediente activo
Los péptidos de este invento se pueden administrar directamente como un agente o una composición farmacéutico/a, o, en caso necesario, que se ha formulado por métodos de formulación convencionales. En este último caso, además de los péptidos de este invento, se pueden incluir ciertos vehículos, excipientes y otros similares que se usan ordinariamente para fármacos, cuando sea adecuado, sin restricciones particulares. Ejemplos

de tales vehículos son un agua esterilizada, una solución salina fisiológica, un tampón fosfato, un fluido de cultivo u otros similares. Además, los agentes o las composiciones farmacéuticos/as pueden contener, en caso necesario, agentes estabilizantes, suspensiones, conservantes, agentes tensioactivos u otros similares. Los agentes o las composiciones farmacéuticos/as de este invento se pueden usar con fines anticancerosos.

Los péptidos de este invento se pueden preparar como una combinación, que se compone de dos o más péptidos del presente invento, para inducir CTLs in vivo. La combinación de péptidos puede adoptar la forma de una mezcla o cóctel, o éstos se pueden conjugar entre sí usando técnicas clásicas. Por ejemplo, los péptidos pueden ser unidos químicamente o ser expresados como una única secuencia polipeptídica de fusión. Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes. Mediante la administración de los péptidos de este invento, los péptidos son presentados con una alta densidad por los antígenos HLA sobre las APCs, a continuación, son inducidos los CTLs, que reaccionan específicamente frente al complejo formado entre el péptido presentado y el antígeno HLA. Alternativamente, las APCs que presentan cualquiera de los péptidos de este invento sobre su superficie celular, los cuales se pueden obtener estimulando a las APCs (p.ej., con las DCs), que se han derivado a partir de un sujeto con los péptidos de este invento, pueden ser administradas a este sujeto y, como resultado de ello, unos CTLs son inducidos en el sujeto y se puede aumentar su agresividad frente a las células cancerosas, tales como de un cáncer de vejiga, un cáncer de mama, un cáncer cervical, un carcinoma colangio-celular, una CML, un cáncer colorrectal, una endometriosis, un cáncer de esófago, un cáncer gástrico, un cáncer de hígado, un NSCLC, un linfoma, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un carcinoma de riñón y células de SCC.

Los agentes o las composiciones farmacéuticos/as para el tratamiento y/o la prevención de un cáncer o tumor, que incluyen un péptido de este invento como el ingrediente activo, pueden incluir también un adyuvante conocido para establecer eficazmente una inmunidad celular. Alternativamente, los agentes o las composiciones farmacéuticos/as se pueden administrar con otros ingredientes activos o se pueden administrar mediante formulación para dar gránulos. Un adyuvante se refiere a un compuesto que aumenta la respuesta inmunitaria contra la proteína cuando se administra conjuntamente con (o sucesivamente a) la proteína que tiene una actividad inmunológica. Los adyuvantes contemplados en el presente documento incluyen los que se han descrito en la bibliografía (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Ejemplos de unos adyuvantes adecuados incluyen el fosfato de aluminio, el hidróxido de aluminio, un alumbre, la toxina del cólera, la toxina de salmonella y otros similares, pero no están restringidos a éstos.

Además de ello, unas formulaciones de liposomas, unas formulaciones granulares en las que el péptido está unido a unas perlas que tienen un diámetro de unos pocos micrómetros y unas formulaciones en las que un lípido está unido al péptido, se pueden usar de modo conveniente.

En algunas formas de realización, los agentes o las composiciones farmacéuticos/as del invento pueden incluir además un componente que estimula a los CTLs. Ciertos lípidos han sido identificados como unos agentes o unas composiciones capaces de estimular a CTLs in vivo contra antígenos víricos. Por ejemplo, unos residuos de ácido palmítico se pueden fijar a los grupos épsilon- y alfa-amino de un residuo de lisina, y luego pueden ser engarzados con un péptido del invento. El péptido lipidado se puede luego administrar, ya sea directamente en una micela o una partícula, incorporar en un liposoma, o bien emulsionar en un adyuvante. Como otro ejemplo de la estimulación con lípidos de las respuestas a CTLs, ciertas lipoproteínas de E. coli, tales como la tripalmitoil-S-gliceril-cisteína-liseril-serina (P3CSS) se pueden usar para estimular a CTLs cuando éstos se han unido por enlaces covalentes a un péptido apropiado (véase, p.ej. Deres y colaboradores, Nature 1989, 342: 561-4).

El método de administración puede ser por vía oral, intradérmica, subcutánea, mediante inyección intravenosa, o similares, y mediante una administración sistémica o una administración local en la vecindad de los sitios escogidos como dianas. La administración se puede realizar mediante una administración única o reforzada mediante múltiples administraciones. La dosis de los péptidos de este invento se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con la enfermedad que se haya de tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración y otros similares, y ella es ordinariamente de 0,001 mg a 1.000 mg, p.ej. de 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo de 0,1 mg a 10 mg, y se puede administrar una vez en unos pocos días hasta unos pocos meses. Un experto en la especialidad puede seleccionar adecuadamente una dosis apropiada.

(2) Agentes o composiciones farmacéuticos/as que contienen unos polinucleótidos como ingrediente activo

Los agentes o las composiciones farmacéuticos/as del presente invento pueden contener también unos ácidos nucleicos que codifican los péptidos divulgados en este documento en una forma expresable. En el presente documento, la frase "en una forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando haya sido introducido en una célula, será expresado in vivo como un polipéptido que induce una inmunidad antitumoral. En una forma de realización ejemplificativa, la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido de interés incluye unos elementos reguladores que son necesarios para la expresión del polinucleótido. El(los) polinucleótido(s) se puede(n) equipar de tal manera que se consiga una inserción estable dentro del genoma de la célula diana (véase, p.ej. Thomas KR y Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 para una descripción de vectores de casetes de recombinación homóloga). Véanse, p.ej. Wolff y colaboradores, Science 1990, 247: 1465-8; los documentos de patentes de los EE.UU. n° 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y el documento WO 98/04720. Ejemplos de unas

tecnologías de entrega basadas en el ADN incluyen "un ADN desnudo", una entrega facilitada (por bupivacaína, por unos polímeros, mediada por péptidos), unos complejos con lípidos catiónicos, y una entrega mediada por partículas ("pistola de genes") o mediada por presión (véase, p.ej. el documento de Patente de EE.UU. n° 5.922.687).

Los péptidos del presente invento pueden ser expresados también por unos vectores víricos o bacterianos. Ejemplos de unos vectores de expresión incluyen unos anfitriones víricos atenuados tales como el virus vaccinia o de la viruela aviar. Este enfoque implica el uso del virus vaccinia, p.ej., como un vector para expresar unas secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. Después de su introducción en un anfitrión, el virus vaccinia recombinante expresa los péptidos inmunógenos, y provoca de esta manera una respuesta inmunitaria. Los vectores de vaccinia y unos métodos útiles en los protocolos de inmunización se describen, p.ej., en el documento de patente de los EE.UU. n° 4.722.848. Ejemplos de otro vector incluyen el BCG (el bacilo Calmette-Guerin). Los vectores BCG se describen en Stover y colaboradores, *Nature* 1991, 351: 456-60. Será evidente una amplia variedad de otros vectores que son útiles para la administración terapéutica o la inmunización, p.ej., unos vectores de adenovirus y de virus adenoasociados, vectores retrovíricos, vectores de *Salmonella typhi*, vectores desintoxicados de la toxina del ántrax y otros similares. Véanse, p.ej. Shata y colaboradores, *Mol Med Today* 2000, 6: 66-71; Shedlock y colaboradores, *J Leukoc Biol* 200, 68: 793-86; Hipp y colaboradores, *In Vivo* 2000, 14: 571-85.

La entrega de un polinucleótido a un sujeto se puede efectuar o bien directamente, en cuyo caso el sujeto es expuesto directamente a la acción de un vector que lleva el polinucleótido, o indirectamente, en cuyo caso, las células son transformadas primeramente con el polinucleótido de interés *in vitro* y luego las células son trasplantadas al sujeto. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapias génicas *in vivo* y *ex vivo*.

Para unas recopilaciones generales acerca de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel y colaboradores, *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 & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62: 191-217; *Trends in Biotechnology* 1993, 11(5): 155-215). Unos métodos que son corrientemente conocidos en la especialidad de la tecnología de ADN recombinante, que pueden ser usados también para el presente invento, se describen en las obras de Ausubel y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology* [Protocolos actuales en la biología molecular], John Wiley & Sons, NY, 1993; y Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual* [Transferencia y expresión de genes, un manual de laboratorio] Stockton Press, NY, 1990.

El método de administración puede ser por vía oral, intradérmica, subcutánea, inyección intravenosa, o similares, y encuentra uso una administración sistémica o una administración local en la proximidad de los sitios establecidos como dianas. La administración se puede realizar mediante una administración de una sola vez o reforzada por múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el vehículo apropiado o en las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de este invento se puede ajustar apropiadamente conforme a la enfermedad que se haya de tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración, y otros similares, y ella es ordinariamente de 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo de 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo de 0,1 mg a 10 mg, y se puede administrar desde una vez cada unos pocos días hasta una vez cada unos pocos meses. Un experto en la especialidad puede seleccionar adecuadamente una dosis apropiada.

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

Los péptidos del presente invento y los polinucleótidos que codifican tales péptidos se pueden usar para la inducción de APCs y CTLs. Los exosomas y las APCs del presente invento también se pueden usar para la inducción de CTLs. Los péptidos, polinucleótidos, exosomas y las APCs se pueden usar en combinación con cualesquiera otros compuestos siempre y cuando que los compuestos no inhiban su capacidad de inducir CTLs. Por lo tanto, cualquiera de los agentes o las composiciones farmacéuticos/as del presente invento anteriormente mencionados, se puede usar para inducir CTLs, y además de esto, los que incluyen los péptidos y polinucleótidos se pueden usar también para inducir APCs tal y como se describe a continuación.

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

El presente invento proporciona unos métodos para inducir APCs usando los péptidos de este invento o unos polinucleótidos que codifican los péptidos. La inducción de APCs se puede realizar tal como se ha descrito anteriormente en la sección "VI. Células presentadoras de antígenos". Este invento también proporciona un método para inducir APCs que tienen un alto nivel de capacidad de inducir CTLs, cuya inducción ha sido también mencionada dentro del epígrafe "VI. Células presentadoras de antígenos", véase más arriba.

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

- a: poner en contacto las APCs con los péptidos del presente invento, y
- b: introducir los polipéptidos del presente invento en una forma expresable dentro de las APCs.

Tales métodos para inducir APCs se realizan preferiblemente *in vitro* o *ex vivo*. Cuando los métodos se realizan *in vitro* o *ex vivo*, las APCs que han de ser inducidas se pueden obtener a partir de un sujeto que debe de ser tratado o de otros cuyos antígenos HLA sean iguales que los del sujeto.

(2) Método para inducir CTLs

Además de ello, el presente invento proporciona unos métodos para inducir CTLs usando los péptidos de este invento, unos polinucleótidos que codifican los péptidos, o unos exosomas o unas APCs que presentan los péptidos.

El presente invento proporciona también unos métodos para inducir CTLs usando un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad del receptor de células T (TCR), que reconoce (es decir, que se fija a) un complejo de los péptidos del presente invento y de unos antígenos HLA sobre una superficie celular. De manera preferida, los métodos para inducir CTLs incluyen por lo menos una etapa seleccionada entre:

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

b: introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad del TCR, que reconoce a un complejo de un péptido del presente invento y de un antígeno HLA en una célula T positiva para CD8.

Cuando los péptidos del presente invento son administrados a un sujeto, los CTLs son inducidos en el cuerpo del sujeto, y es aumentada la fuerza de la respuesta inmunitaria dirigida contra los endotelios asociados a tumores. Alternativamente, los péptidos y polinucleótidos que codifican los péptidos se pueden usar para un método terapéutico ex vivo, en el que unas APCs derivadas de un sujeto y unas células positivas para CD8, o unos leucocitos mononucleares de sangre periférica son puestos en contacto (estimulados) in vitro con los péptidos de este invento, y, después de haber inducido a los CTLs, las células CTL activadas son devueltas al sujeto. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

a: recoger APCs procedentes del sujeto,

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

c: mezclar las APCs de la etapa b con células T CD⁸, y cultivar concomitantemente para inducir CTLs, y

d: recoger células T CD⁸+ a partir del cultivo concomitante de la etapa c.

Alternativamente, de acuerdo con el presente invento, se proporciona el uso de los péptidos de este invento para la producción de un agente o una composición farmacéutico/a que induce CTLs. Por añadidura, el presente invento proporciona un método o procedimiento para la producción de un agente o una composición farmacéutico/a que induce CTLs, en donde el método incluye la etapa de añadir y mezclar o formular el péptido del presente invento con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, el presente invento proporciona también el péptido del presente invento para inducir CTLs. Las células T CD⁸+ que tienen una actividad citotóxica y que se han obtenido mediante la etapa d se pueden administrar al sujeto como una vacuna. Las APCs que deben de ser mezcladas con las células T CD⁸+ en la etapa c arriba mencionada se pueden producir también transfiriendo unos genes que codifican los presentes péptidos a las APCs, tal como se ha detallado más arriba en la sección "VI. Células presentadoras de antígenos". Correspondientemente, para el presente método se pueden usar cualesquiera APCs o exosomas que presenta efectivamente los presentes péptidos a las células T.

Ejemplos**Materiales y métodos****Linajes de células**

El linaje de células linfoblastoides A24 (A24LCL) fue establecido mediante transformación con el virus de Epstein-bar dentro de un linfocito B humano positivo para el HLA-A24. El linaje de células linfoblastoides B (HLA-A2) T2 humano, y el COS7 se obtuvieron de la ATCC.

Selección de los candidatos para los péptidos derivados de la MELK

Se predijeron unos péptidos 9-nonaméricos y 10-decaméricos derivados de la MELK que se fijan a moléculas del HLA-A*2402 y del HLA-A*0201 usando el software de predicción "BIMAS" (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind), cuyos algoritmos han sido descritos por Parker KC y colaboradores (J Immunol 1994, 152(1): 163-75) y por Kuzushima K y colaboradores (Blood 2001, 98(6): 1872-81). Estos péptidos se sintetizaron por Sigma (Sapporo, Japón) o por Biosynthesis Inc. (Lewisville, TX) de acuerdo con un método clásico de síntesis en fase sólida y se purificaron mediante una cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (HPLC). La pureza (> 90 %) y la identidad de los péptidos se determinaron mediante una HPLC analítica y un análisis por espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en dimetil-sulfóxido (DMSO) a razón de 20 mg/ml y se almacenaron a -80 °C.

Inducción in vitro de CTL

Unas células dendríticas (DCs) derivadas de monocitos se usaron como células presentadoras de antígenos (APCs) para inducir unas respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTLs) contra unos péptidos presentados sobre el antígeno leucocitario humano (HLA). Las DCs se generaron in vitro tal como se ha descrito en otra parte (Nakahara S y colaboradores, Cancer Res 15 de Jul de 2003, 63(14): 4112-8). Específicamente, unas células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), que habían sido aisladas a partir de un voluntario normal (positivo para el HLA-A*2402 o el HLA-A*0201) mediante una solución de Ficoll-Plaque (Pharmacia), se separaron por adherencia a una placa de material plástico para cultivo de tejidos (Becton Dickinson) de tal manera que se enriqueciesen éstos como la fracción de monocitos. La población enriquecida en monocitos se cultivó en presencia de 1.000 U/ml del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (R&D System) y 1.000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D System)

en un medio AIM-V (Invitrogen) que contenía 2 % de un suero autólogo (AS) desactivado por calor. Después de cultivación durante 7 días, las DCs inducidas por citocinas fueron pulsadas con 20 microgramos/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en presencia de 3 microgramos/ml de beta-2-microglobulina durante 3 horas a 37 grados C en un medio AIM-V. Apareció que las células generadas expresaron unas moléculas asociadas a DCs, tales como CD80, CD83, CD86 y HLA de clase II sobre sus superficies celulares (datos no mostrados). Estas DCs pulsadas con péptidos fueron luego desactivadas con mitomicina C (MMC) (30 microgramos/ml durante 30 min) y mezcladas en una relación de 1:20 con células T citotóxicas T CD8+ autólogas, que se habían obtenido mediante una selección positiva con un estuche de aislamiento positivo para CD8 (Dyna). Estos cultivos se prepararon en placas de 48 pocillos (Corning); cada pocillo contenía $1,5 \times 10^4$ 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 un medio AIM-V/2% AS. Tres días más tarde, estos cultivos fueron suplementados con IL-2 (CHIRON) hasta una concentración final de 20 UI/ml. En los días 7 y 14, las células T fueron estimuladas adicionalmente con las DCs autólogas pulsadas con péptidos. Las DCs fueron producidas cada vez por el mismo modo que se ha descrito más arriba. Se ensayaron los CTLs contra unas células A24LCL o T2 pulsadas con péptidos, después de la 3ª ronda de estimulación con los péptidos en el día 21 (Tanaka H y colaboradores, Br J Cancer 5 de Ene de 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y colaboradores, Br J Cancer 20 de Abr de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y colaboradores, Clin Cancer Res 15 Dic de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y colaboradores, Cancer Sci May de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y colaboradores, Cancer Sci Ago de 2005, 96(8): 498-506).

Procedimiento de expansión de los CTLs

Los CTLs fueron expandidos en cultivo usando un método similar al que ha sido descrito por Riddell y colaboradores. (Walter EA y colaboradores, N Engl J Med 19 de Oct de 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR y colaboradores, Nat Med Feb de 1996, 2(2): 216-23). Un total de 5×10^4 CTLs fueron suspendidos en 25 ml de un medio AIM-V/5% AS con 2 clases de linajes de células linfoblastoides B humanas, desactivadas por MMC, en presencia de 40 ng/ml de anticuerpos anti-CD3 monoclonales (Pharmingen). Un día después del inicio de los cultivos, se añadieron 120 UI/ml de IL-2 a los cultivos. Los cultivos fueron alimentados con un medio AIM-V/5 % AS fresco, que contenía 30 UI/ml de IL-2 en los días 5, 8 y 11 (Tanaka H y colaboradores, Br J Cancer 5 de Ene de 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y colaboradores, Br J Cancer 20 de Abr de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y colaboradores, Clin Cancer Res 15 de Dic de 2004: 8577-86; Suda T y colaboradores, Cancer Sci May de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y colaboradores, Cancer Sci Ago de 2005, 96(8): 498-506).

Establecimiento de los clones de CTL

Se realizaron unas diluciones para obtener 0,3, 1 y 3 CTLs/pocillo en una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos (Nalge Nunc International). Los CTLs se cultivaron con 1×10^4 células/pocillo de 2 clases de linajes de células linfoblastoides B humanas, 30 ng/ml de un anticuerpo anti-CD3, y 125 U/ml de IL-2 en un total de 150 microlitros/pocillo de medio AIM-V, que contenía 5 % de AS. 50 microlitros/pocillo de IL-2 se añadieron al medio 10 días después de manera tal que se alcanzase una concentración final de 125 U/ml de IL-2. La actividad de CTL se ensayó en el día 14, y los clones de CTLs se expandieron usando el mismo método que se ha descrito más arriba (Uchida N y colaboradores, Clin Cancer Res 15 de Dic de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y colaboradores, Cancer Sci May de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y colaboradores, Cancer Sci Ago de 2005, 96(8): 498-506).

Actividad específica de los CTLs

Para examinar la actividad específica de los CTLs, se llevaron a cabo un ensayo por mancha inmunitaria enlazada a enzimas (ELISPOT) de interferón (IFN)-gamma y un ensayo por inmunoadsorción enlazada a enzimas (ELISA) de IFN-gamma. En particular, unas células A24LCL o T2 pulsadas con péptidos (1×10^4 /pocillo) se produjeron como células estimuladoras. Unas células cultivadas en 48 pocillos se usaron como células respondedoras. El ensayo ELISPOT de IFN-gamma y el ensayo ELISA de IFN-gamma se llevaron a cabo mediando un proceso de producción.

Resultados

Sobreexpresión en cánceres

Los datos del perfil global de expresión de los CTLs, obtenidos a partir de varios cánceres usando una micromatriz de ADNc pusieron de manifiesto que la expresión de la MELK (nº de acceso al GenBank NM_014791; SEQ ID No. 93) era elevada. La expresión de la MELK se elevó válidamente en 29 de 29 cánceres de vejiga, 31 de 34 cánceres de mama, 14 de 15 cánceres cervicales, 11 de 11 carcinomas colangio-celulares, 10 de 13 CMLs, 12 de 15 cánceres colorrectales, 2 de 2 endometriosis, 19 de 42 cánceres de esófago, 5 de 6 cánceres gástricos, 4 de 4 cánceres de hígado, 11 de 11 NSCLCs, 13 de 14 linfomas, 14 de 18 osteosarcomas, 3 de 6 cánceres de ovario, 2 de 2 cánceres de páncreas, 18 de 21 cánceres de próstata, 5 de 6 carcinomas renales y 15 de 15 cánceres de pulmón de células pequeñas, en comparación con el correspondiente tejido normal. (Tabla 1).

[Tabla 1]

Relación de los casos de regulación al alza observada de la MELK en un tejido canceroso en comparación con un correspondiente tejido normal

Cáncer	Relación
Cáncer de vejiga	29/29
Cáncer de mama	31/34
Cáncer cervical	14/15
Carcinoma colangio-celular	11/11
CML	10/13
Cáncer colorrectal	12/15
Endometriosis	2/2
Cáncer de esófago	19/42
Cáncer gástrico	5/6
Cáncer de hígado	4/4
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	11/11
Linfoma	13/14
Osteosarcoma	14/18
Cáncer de ovarios	3/6
Cáncer de páncreas	2/2
Cáncer de próstata	18/21
Carcinoma de riñón	5/6
Cáncer de pulmón de células pequeñas	15/15

5 **Predicción de los péptidos derivados de la MELK que se fijan al HLA-A24 y al HLA-A24**

La Tabla 2 muestra los péptidos de la MELK que se fijan al HLA-A24 y al HLA-A2 en el orden de las afinidades más altas. Un total de 34 péptidos con una capacidad potencial de fijación de HLA-A24 se seleccionaron y examinaron para determinar los péptidos con epítomos (Tabla 2a), y un total de 58 péptidos que tienen una capacidad potencial de fijación de HLA-A2 se seleccionaron y examinaron de manera similar para determinar los péptidos con epítomos (Tablas 2b y c).

[Tabla 2a]

Péptidos 9-nonaméricos y 10-decaméricos derivados de la MELK que se fijan al HLA-A24

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Calificación de fijación	SEQ ID NO:
199	LYVLMCGFL	300	1
96	DYIISQDRL	300	2
560	HYNVTTRL	300	3
373	DYDWCEDDL	200	4
9	KYYELHETI	144	5
87	EYCPGGELF	120	6
637	VYKRLVEDI	60	7
610	QFELEVCQL	30	8
588	DFVQKGYTL	30	9
526	VFGSLERGL	24	10
567	RLVNPDQLL	14,4	11
603	DFGKVTMQF	14	12
522	KGAKVFGSL	13,44	13
326	RGKPVRLRL	13,44	14
450	KNQHKREIL	12	15
230	KWLSPSSIL	12	16
395	KYWTESNGV	12	17
502	RCRSVELDL	11,2	18
145	KLKLIDFGL	11,2	19
574	LLNEIMSIL	10,08	20
78	TANKIFMVL	10,08	21
225	KYDVPKWLS	10	22
637	VYKRLVEDIL	280	23
309	QYDHLTATYL	200	24
142	EYHKLKLIDF	100	25
139	LFDEYHKLKL	26,4	26
532	RGLDKVITVL	20,16	27
230	KWLSPSSILL	12	28
55	KTEIEALKNL	12	29
295	RNNRQTMEDL	12	30

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Calificación de fijación	SEQ ID NO:
223	RGKYDVPKWL	11,2	31
632	KGDAWVYKRL	11,2	32
266	DYNYPVEWQS	10,5	33
463	RYTTPSKARN	10	34

[Tabla 2b]

Péptidos 9-nonaméricos derivados de la MELK que se fijan al HLA-A2

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Calificación de fijación	SEQ ID NO:
238	LLLQQMLQV	1.006,209	35
138	LLFDEYHKL	826,372	36
263	IMQDYNYPV	350,117	37
103	RLSEEETRV	285,163	38
147	KLIDFGLCA	270,905	39
206	FLPFDDDNV	156,77	40
574	LLNEIMSIL	140,409	41
220	KIMRGKYDV	123,846	42
115	QIVSAVAYV	120,977	43
308	WQYDHLTAT	104,878	44
231	WLSPSSILL	98,267	45
193	WSMGILLYV	97,752	46
573	QLLNEIMSI	88,783	47
317	YLLLLAKKA	84,555	48
306	SLWQYDHLT	61,852	49
558	KLHYNVTTT	59,989	50
256	NLLNHPWIM	56,523	51
81	KIFMVLEYC	54,833	52
31	ILTGEMVAI	40,792	53
46	TLGSDLPRI	23,995	54
607	VTMQFELEV	23,089	55
279	FIHLDDDCV	21,556	56
171	SLAYAAPEL	21,362	57
567	RLVNPQQLL	21,362	58
425	NVYTPKSAV	19,475	59
71	QLYHVLETA	17,917	60
407	SLTPALCRT	17,14	61
532	RGLDKVITV	15,841	62
145	KLKLIDFGL	15,178	63
194	SMGILLYVL	14,549	64
457	ILTTPNRYT	13,935	65
236	SILLQQML	10,868	66
299	QTMEDLISL	10,352	67

[Tabla 2c]

Péptidos 10-decaméricos derivados de la MELK que se fijan al HLA-A2

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Calificación de fijación	SEQ ID NO:
237	ILLQQMLQV	1.006,209	68
439	FMFPEPKTPV	854,949	69
581	ILPKKHVDFV	732,901	70
231	WLSPSSILL	226,014	71
262	W1MQDYNYPV	162,769	72
609	MQFELEVCQL	128,47	73
137	NLLFDEYHKL	118,561	74
114	RQIVSAVAYV	89,205	75
111	VVFRQIVSAV	88,043	76
578	IMSILPKKHV	85,394	77
198	LLYVLMCGFL	83,091	78
606	KVTMQFELEV	80,941	79
573	QLLNEIMSIL	74,536	80
640	RLVEDILSSC	46,848	81
306	SLWQYDHLTA	41,234	82
76	LETANKIFMV	30,67	83
617	QLQKPDVVG	23,995	84
103	RLSEETRVV	23,383	85
411	ALCRTPANKL	21,362	86
273	WQSKNPFHIL	18,93	87
16	TIGTGGFAKV	18,17	88
243	MLQVDPKKRI	17,736	89
271	VEWQSKNPFI	15,743	90
636	WVYKRLVEDI	15,144	91
457	ILTPNRYTT	12,668	92

La posición inicial indica el número del residuo de aminoácido desde el extremo terminal de N de la MELK. La calificación de fijación se deriva del "BIMAS".

Inducción de CTLs con los péptidos predichos procedentes de la MELK restringidos con el HLA-A*2402 o el HLA-A*0201 y establecimiento de unos linajes de CTLs estimulados con unos péptidos derivados de la MELK

Los CTLs para esos péptidos derivados de la MELK fueron generados de acuerdo con los protocolos que se han descrito en el apartado "Materiales y métodos". La actividad de CTL específica para los péptidos se determinó mediante un ensayo ELISPOT de IFN-gamma (Figura 1a-i). Ella muestra que el #5, estimulado con el MELK-A24-9-326 (SEQ ID NO: 14) (a), el #3, estimulado con el MELK-A24-9-78 (SEQ ID NO: 21) (b), el #4, estimulado con el MELK-A24-10-637 (SEQ ID NO: 23) (c), el #4, estimulado con el MELK-A24-10-532 (SEQ ID NO: 27) (d), el #5, estimulado con el MELK-A02-9-138 (SEQ ID NO: 36) (e), el #3, estimulado con el MELK-A02-9-193 (SEQ ID NO: 46) (f), el #1, estimulado con el MELK-A02-9-171 (SEQ ID NO: 57) (g), el #2, estimulado con el MELK-A02-9-71 (SEQ ID NO: 60) (h) y el #2, estimulado con el MELK-A02-9-532 (SEQ ID NO: 62) (i), demostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos testigos. Además, las células en el pocillo positivo número #5, estimuladas con la SEQ ID NO: 14, #3, estimuladas con la SEQ ID NO: 21, #4, estimuladas con la SEQ ID NO: 23, #4, estimuladas con la SEQ ID NO: 27, #5, estimuladas con la SEQ ID NO: 36, #3 estimuladas con la SEQ ID NO: 46, #1 estimuladas con la SEQ ID NO: 57, #2, estimuladas con la SEQ ID NO: 60, y #2, estimuladas con la SEQ ID NO: 62, fueron expandidas y se establecieron los linajes de CTL. La actividad de CTL de esos linajes de CTLs se determinó mediante el ensayo ELISA de IFN-gamma (Figura 2a-i). Todos los linajes de CTLs demostraron una potente producción de IFN-gamma contra las células diana pulsadas con el correspondiente péptido, en comparación con las células diana sin pulsación con péptidos. Por otra parte, no se podría establecer ningún linaje de CTL mediante estimulación con otros péptidos mostrados en la Tabla 2, a pesar de que esos péptidos tenían una posible actividad de fijación al HLA-A*2402 o al HLA-A*0201 (datos no mostrados). Consecuentemente, sólo nueve péptidos de 92 péptidos candidatos derivados de la MELK podrían inducir unos potentes linajes de CTLs.

Establecimiento de unos clones de CTLs contra los péptidos específicos de la MELK

Unos clones de CTLs se establecieron restringiendo la dilución desde unos linajes de CTLs tal como se describe en el apartado "Materiales y métodos", y se determinó la producción de IFN-gamma a partir de unos clones de CTL contra unas células dianas pulsadas con péptidos mediante un ensayo ELISA de IFN-gamma. Se determinaron en la Figura 3 unas potentes producciones de IFN-gamma a partir de los clones de CTL estimulados con la SEQ ID NO: 27.

Actividad específica de los CTL contra células diana que presentan los péptidos de la MELK procesados endógenamente con HLA-A*0201

Los linajes de CTLs establecidos, que habían sido generados contra estos péptidos, fueron examinados en cuanto a su capacidad para reconocer unas células dianas que presentan el péptido candidato procesado endógenamente a partir de la MELK con la molécula HLA-A*0201. La actividad específica de CTL contra unas células COS7, que habían sido transfectadas con la longitud plena de los genes de la MELK y de la molécula HLA-A*0201 (un modelo específico para las células diana que expresan los genes de la MELK y de la HLA-A*0201) se ensayó usando los linajes de CTLs generados por un péptido correspondiente como las células efectoras. Unas células COS7 transfectadas o bien con la longitud plena de los genes de la MELK o de la HLA-A*0201 fueron preparadas como testigo. En la Figura 4, los CTLs estimulados con la SEQ ID NO: 36 (a) y la SEQ ID NO: 57 (b) mostraron una potente actividad de CTL contra las células COS7, que expresan tanto la MELK como también el HLA-A02. Por otra parte, no se encontró ninguna significativa actividad específica de CTL contra los testigos. Por lo tanto, estos datos muestran claramente que los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 57 se presentan por naturaleza sobre las células dianas con la molécula HLA-A*0201 y son reconocidas por los CTLs. Estos resultados indican que esos dos péptidos derivados de la MELK pueden estar disponibles para aplicar las vacunas contra un cáncer a unos pacientes con unos tumores que expresan la MELK.

Análisis de homología de los péptidos antigénicos

Los CTLs estimulados con el MELK-A24-9-326 (SEQ ID NO: 14), el MELK-A24-9-78 (SEQ ID NO: 21), el MELK-A24-10-637 (SEQ ID NO: 23), el MELK-A24-10-532 (SEQ ID NO: 27), el MELK-A02-9-138 (SEQ ID NO: 36), el MELK-A02-9-193 (SEQ ID NO: 46), el MELK-A02-9-171 (SEQ ID NO: 57), el MELK-A02-9-71 (SEQ ID NO: 60) y el MELK-A02-9-532 (SEQ ID NO: 62) mostraron una actividad de CTL significativa y específica. Este resultado puede ser debido al hecho de que las secuencias del MELK-A24-9-326 (SEQ ID NO: 14), del MELK-A24-9-78 (SEQ ID NO: 21), del MELK-A24-10-637 (SEQ ID NO: 23), del MELK-A24-10-532 (SEQ ID NO: 27), del MELK-A02-9-138 (SEQ ID NO: 36), del MELK-A02-9-193 (SEQ ID NO: 46), del MELK-A02-9-171 (SEQ ID NO: 57), del MELK-A02-9-71 (SEQ ID NO: 60) y del MELK-A02-9-532 (SEQ ID NO: 62) son homólogas a las de los péptidos derivados de otras moléculas de las que se sabe que sensibilizan al sistema inmunitario humano. Para excluir esta posibilidad, se llevaron a cabo unos análisis de homología para estas secuencias peptídicas usando como método de consulta el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) que no reveló ninguna secuencia con una homología significativa. Los resultados de los análisis de homología indican que las secuencias del MELK-A24-9-326 (SEQ ID NO: 14), del MELK-A24-9-78 (SEQ ID NO: 21), del MELK-A24-10-637 (SEQ ID NO: 23), del MELK-A24-10-532 (SEQ ID NO: 27), del MELK-A02-9-138 (SEQ ID NO: 36), del MELK-A02-9-193 (SEQ ID NO: 46), del MELK-A02-9-171 (SEQ ID NO: 57), del MELK-A02-9-71 (SEQ ID NO: 60) and del MELK-A02-9-532 (SEQ ID NO: 62) son únicas y que, por lo tanto, hay pocas posibilidades, de acuerdo con el actual estado de los conocimientos, de que estas moléculas provoquen unas respuestas inmunitarias no deseadas a algunas moléculas no relacionadas.

En conclusión, se identificaron unos nuevos péptidos con epítomos HLA-A24 y HLA-A02 derivados de la MELK y ellos demostraron como aplicables para la inmunoterapia de cáncer.

Aplicabilidad industrial

El presente invento describe un nuevo TAA derivado de la MELK (SEQ ID NO: 36), que induce unas potentes y específicas respuestas inmunitarias antitumorales y que tiene aplicabilidad a un amplio conjunto de tipos de cáncer. Tal TAA garantiza el desarrollo ulterior como una vacuna peptídica contra unas enfermedades asociadas con la MELK, por ejemplo, ciertos cánceres tales como un cáncer de mama, un cáncer de vejiga, un cáncer cervical, un carcinoma colangio-celular, una CML, un cáncer colorrectal, una endometriosis, un cáncer de esófago, un cáncer gástrico, un cáncer de hígado, un NSCLC, un linfoma, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un carcinoma de riñón y un SCC.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDOS CON EPÍTOPOS Y VACUNAS QUE LOS CONTIENEN

5 <130> ONC-A0811P

<150> US 61/085,663

< 151> 2008-08-01

<160> 94

<170> PatentIn versión 3.4

10 <210> 1

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

15 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 1

Leu Tyr Val Leu Met Cys Gly Phe Leu
1 5

<210> 2

< 211> 9

20 < 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 2

25 **Asp Tyr Ile Ile Ser Gln Asp Arg Leu**
1 5

<210> 3

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> artificial

30 <220>

< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 3

His Tyr Asn Val Thr Thr Thr Arg Leu
1 5

<210> 4

35 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> un péptido sintetizado artificialmente

40 <400> 4

Asp Tyr Asp Trp Cys Glu Asp Asp Leu
1 5

<210> 5
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> artificial

5 <220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 5
Lys Tyr Tyr Glu Leu His Glu Thr Ile
1 5

	<210> 6
10	< 211> 9
	< 212> PRT
	< 213> artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 6
Glu Tyr Cys Pro Gly Gly Glu Leu Phe
1 5

20

<210>	7
<211>	9
<212>	PRT
<213>	artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

```
<400> 7
Val Tyr Lys Arg Leu Val Glu Asp Ile
1          5
```

25 <210> 8
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> artificial

30 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 8

Gln Phe Glu Leu Glu Val Cys Gln Leu
1 5

35 <210> 9
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 9
Asp Phe Val Gln Lys Gly Tyr Thr Leu
40 1 5

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

5 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 10
Val Phe Gly Ser Leu Glu Arg Gly Leu
 1 5

10 <210> 11
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 11
Arg Leu Val Asn Pro Asp Gln Leu Leu
 1 5

20 <210> 12
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 12
Asp Phe Gly Lys Val Thr Met Gln Phe
 1 5

25 <210> 13
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> artificial

30 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 13
Lys Gly Ala Lys Val Phe Gly Ser Leu
 1 5

35 <210> 14
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

40 <400> 14
Arg Gly Lys Pro Val Arg Leu Arg Leu
 1 5

<210> 15
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> artificial

5 <220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 15
Lys Asn Gln His Lys Arg Glu Ile Leu
1 5

10 <210> 16
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 16
Lys Trp Leu Ser Pro Ser Ser Ile Leu
1 5

20 <210> 17
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 17
Lys Tyr Trp Thr Glu Ser Asn Gly Val
1 5

25 <210> 18
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 18
Arg Cys Arg Ser Val Glu Leu Asp Leu
1 5

35 <210> 19
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 19
Lys Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Leu
40 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 20

Leu Leu Asn Glu Ile Met Ser Ile Leu
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 21

Thr Ala Asn Lys Ile Phe Met Val Leu
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 22

Lys Tyr Asp Val Pro Lys Trp Leu Ser
 1 5

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

25 <220>
 <223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 23

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

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 24.

Gln Tyr Asp His Leu Thr Ala Thr Tyr Leu
 1 5 10

<210> 25
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> artificial

5 <220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

```
<400> 25
Glu Tyr His Lys Leu Lys Leu Ile Asp Phe
 1             5             10
```

10 <210> 26
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 26
Leu Phe Asp Glu Tyr His Lys Leu Lys Leu
 1 5 10

20

<210>	27
<211>	10
<212>	PRT
<213>	artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 27
Arg Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Leu
1 5 10

25 <210> 28
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> artificial

30 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 28
Lys Trp Leu Ser Pro Ser Ser Ile Leu Leu
1 5 10

35 <210> 29
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 29
Lys Thr Glu Ile Glu Ala Leu Lys Asn Leu
40 1 5 10

<210> 30
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> artificial

5 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 30
Arg Asn Asn Arg Gln Thr Met Glu Asp Leu
 1 5 10

10 <210> 31
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 31
Arg Gly Lys Tyr Asp Val Pro Lys Trp Leu
 1 5 10

20 <210> 32
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 32
Lys Gly Asp Ala Trp Val Tyr Lys Arg Leu
 1 5 10

25 <210> 33
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> artificial

30 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 33
Asp Tyr Asn Tyr Pro Val Glu Trp Gln Ser
 1 5 10

35 <210> 34
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

40 <400> 34
Arg Tyr Thr Thr Pro Ser Lys Ala Arg Asn
 1 5 10

<210> 35
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

5 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 35
Leu Leu Leu Gln Gln Met Leu Gln Val
 1 5

10 <210> 36
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 36
Leu Leu Phe Asp Glu Tyr His Lys Leu
 1 5

20 <210> 37
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 37
Ile Met Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Val
 1 5

25 <210> 38
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

30 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 38
Arg Leu Ser Glu Glu Glu Thr Arg Val
 1 5

35 <210> 39
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

40 <400> 39
Lys Leu Ile Asp Phe Gly Leu Cys Ala
 1 5

<210> 40
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

5 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 40
Phe Leu Pro Phe Asp Asp Asp Asn Val
 1 5

10 <210> 41
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 41
Leu Leu Asn Glu Ile Met Ser Ile Leu
 1 5

20 <210> 42
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 42
Lys Ile Met Arg Gly Lys Tyr Asp Val
 1 5

25 <210> 43
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

30 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 43
Gln Ile Val Ser Ala Val Ala Tyr Val
 1 5

35 <210> 44
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

40 <400> 44
Trp Gln Tyr Asp His Leu Thr Ala Thr
 1 5

<210> 45
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

5 <220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 45
Trp Leu Ser Pro Ser Ser Ile Leu Leu
1 5

10 <210> 46
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

```

15  <400> 46
      Trp Ser Met Gly Ile Leu Leu Tyr Val
      1           5

```

20 <210> 47
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 47
Gln Leu Leu Asn Glu Ile Met Ser Ile
1 5

25 <210> 48
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

30 <220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 48
Tyr Leu Leu Leu Leu Ala Lys Lys Ala
1 5

35 <210> 49
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 49
Ser Leu Trp Gln Tyr Asp His Leu Thr
40 1 5

<210> 50
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

5 <220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

```
<400> 50
Lys Leu His Tyr Asn Val Thr Thr Thr
1          5
```

10 <210> 51
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

```

15  <400> 51
    Asn Leu Leu Asn His Pro Trp Ile Met
    1               5

```

20 <210> 52
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 52
Lys Ile Phe Met Val Leu Glu Tyr Cys
1 5

25 <210> 53
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 53
Ile Leu Thr Gly Glu Met Val Ala Ile
1 5

35 <210> 54
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 54
Thr Leu Gly Ser Asp Leu Pro Arg Ile
40 1 5

<210> 55
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

5 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 55
Val Thr Met Gln Phe Glu Leu Glu Val
 1 5

10 <210> 56
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 56
Phe Ile His Leu Asp Asp Asp Cys Val
 1 5

20 <210> 57
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 57
Ser Leu Ala Tyr Ala Ala Pro Glu Leu
 1 5

25 <210> 58
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

30 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 58
Arg Leu Val Asn Pro Asp Gln Leu Leu
 1 5

35 <210> 59
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

40 <400> 59
Asn Val Tyr Thr Pro Lys Ser Ala Val
 1 5

<210> 60
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

5 <220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 60
Gln Leu Tyr His Val Leu Glu Thr Ala
1 5

10 <210> 61
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 61
Ser Leu Thr Pro Ala Leu Cys Arg Thr
1 5

20 <210> 62
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

```
<400> 62
Arg Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val
1          5
```

25 <210> 63
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 63
Lys Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Leu
1 5

35 <210> 64
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 64
Ser Met Gly Ile Leu Leu Tyr Val Leu
40 1 5

<210> 65
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

5 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 65
Ile Leu Thr Thr Pro Asn Arg Tyr Thr
 1 5

10 <210> 66
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 66
Ser Ile Leu Leu Leu Gln Gln Met Leu
 1 5

20 <210> 67
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 67
Gln Thr Met Glu Asp Leu Ile Ser Leu
 1 5

25 <210> 68
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

30 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 68
Ile Leu Leu Leu Gln Gln Met Leu Gln Val
 1 5 10

35 <210> 69
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

40 <400> 69
Phe Met Phe Pro Glu Pro Lys Thr Pro Val
 1 5 10

<210> 70
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

5 <220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

```
<400> 70
Ile Leu Pro Lys Lys His Val Asp Phe Val
1          5          10
```

10 <210> 71
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 71
Trp Leu Ser Pro Ser Ser Ile Leu Leu Leu
1 5 10

20 <210> 72
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

```
<400> 72
Trp Ile Met Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Val
1             5             10
```

25 <210> 73
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

30 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 73
Met Gln Phe Glu Leu Glu Val Cys Gln Leu
1 5 10

35 <210> 74
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

```

<400> 74
Asn Leu Leu Phe Asp Glu Tyr His Lys Leu
40      1              5              10

```

<210> 75
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

5 <220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 75
Arg Gln Ile Val Ser Ala Val Ala Tyr Val
1 5 10

10 <210> 76
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 76
Val Val Phe Arg Gln Ile Val Ser Ala Val
 1 5 10

20 <210> 77
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 77
Ile Met Ser Ile Leu Pro Lys Lys His Val
1 5 10

25 <210> 78
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

30 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 78
Leu Leu Tyr Val Leu Met Cys Gly Phe Leu
1 5 10

35 <210> 79
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 79
Lys Val Thr Met Gln Phe Glu Leu Glu Val
40 1 5 10

<210> 80
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

5 <220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 80
 Gln Leu Leu Asn Glu Ile Met Ser Ile Leu
 1 5 10

10 <210> 81
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 81
 Arg Leu Val Glu Asp Ile Leu Ser Ser Cys
 1 5 10

<210> 82
 < 211> 10
 < 212> PRT
 20 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 82
 Ser Leu Trp Gln Tyr Asp His Leu Thr Ala
 1 5 10

25 <210> 83
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
 30 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 83
 Leu Glu Thr Ala Asn Lys Ile Phe Met Val
 1 5 10

<210> 84
 < 211> 10
 < 212> PRT
 35 < 213> secuencia artificial

<220>
 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 84
 Gln Leu Gln Lys Pro Asp Val Val Gly Ile
 40 1 5 10

<210> 85
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

5 <220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 85
Arg Leu Ser Glu Glu Glu Thr Arg Val Val
1 5 10

10 <210> 86
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 86
Ala Leu Cys Arg Thr Pro Ala Asn Lys Leu
1 5 10

20 <210> 87
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 87

Trp Gln Ser Lys Asn Pro Phe Ile His Leu
1 5 10

25 <210> 88
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

30 < 223> un péptido sintetizado artificialmente

```
<400> 88
Thr Ile Gly Thr Gly Gly Phe Ala Lys Val
1             5             10
```

35 <210> 89
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

```
<400> 89
Met Leu Gln Val Asp Pro Lys Lys Arg Ile
1          5          10
```

40

<210> 90
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

5 <220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 90
Val Glu Trp Gln Ser Lys Asn Pro Phe Ile
1 5 10

10 <210> 91
< 211> 10
< 212> PRT
< 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

15 <400> 91
Trp Val Tyr Lys Arg Leu Val Glu Asp Ile
1 5 10

20 <210> 92
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> secuencia artificial

<220>
< 223> un péptido sintetizado artificialmente

<400> 92
Ile Leu Thr Thr Pro Asn Arg Tyr Thr Thr
1 5 10

25 <210> 93
 < 211> 2501
 < 212> DNA
 < 213> Homo sapiens

30 <220>
 < 221> CDS
 < 222> (139)..(2099)

ES 2 572 367 T3

<400> 93

aac tat cct gtt gag tgg caa agc aag aat cct ttt att cac ctc gat Asn Tyr Pro Val Glu Trp Gln Ser Lys Asn Pro Phe Ile His Leu Asp 270 275 280	987
gat gat tgc gta aca gaa ctt tct gta cat cac aga aac aac agg caa Asp Asp Cys Val Thr Glu Leu Ser Val His His Arg Asn Asn Arg Gln 285 290 295	1035
aca atg gag gat tta att tca ctg tgg cag tat gat cac ctc acg gct Thr Met Glu Asp Leu Ile Ser Leu Trp Gln Tyr Asp His Leu Thr Ala 300 305 310 315	1083
acc tat ctt ctg ctt cta gcc aag aag gct cgg gga aaa cca gtt cgt Thr Tyr Leu Leu Leu Leu Ala Lys Lys Ala Arg Gly Lys Pro Val Arg 320 325 330	1131
tta agg ctt tct tct ttc tcc tgt gga caa gcc agt gct acc cca ttc Leu Arg Leu Ser Ser Phe Ser Cys Gly Gln Ala Ser Ala Thr Pro Phe 335 340 345	1179
aca gac atc aag tca aat aat tgg agt ctg gaa gat gtg acc gca agt Thr Asp Ile Lys Ser Asn Asn Trp Ser Leu Glu Asp Val Thr Ala Ser 350 355 360	1227
gat aaa aat tat gtg gcg gga tta ata gac tat gat tgg tgt gaa gat Asp Lys Asn Tyr Val Ala Gly Leu Ile Asp Tyr Asp Trp Cys Glu Asp 365 370 375	1275
gat tta tca aca ggt gct gct act ccc cga aca tca cag ttt acc aag Asp Leu Ser Thr Gly Ala Ala Thr Pro Arg Thr Ser Gln Phe Thr Lys 380 385 390 395	1323
tac tgg aca gaa tca aat ggg gtg gaa tct aaa tca tta act cca gcc Tyr Trp Thr Glu Ser Asn Gly Val Glu Ser Lys Ser Leu Thr Pro Ala 400 405 410	1371
tta tgc aga aca cct gca aat aaa tta aag aac aaa gaa aat gta tat Leu Cys Arg Thr Pro Ala Asn Lys Leu Lys Asn Lys Glu Asn Val Tyr 415 420 425	1419
act cct aag tct gct gta aag aat gaa gag tac ttt atg ttt cct gag Thr Pro Lys Ser Ala Val Lys Asn Glu Glu Tyr Phe Met Phe Pro Glu 430 435 440	1467
cca aag act cca gtt aat aag aac cag cat aag aga gaa ata ctc act Pro Lys Thr Pro Val Asn Lys Asn Gln His Lys Arg Glu Ile Leu Thr 445 450 455	1515
acg cca aat cgt tac act aca ccc tca aaa gct aga aac cag tgc ctg Thr Pro Asn Arg Tyr Thr Thr Pro Ser Lys Ala Arg Asn Gln Cys Leu 460 465 470 475	1563
aaa gaa act cca att aaa ata cca gta aat tca aca gga aca gac aag Lys Glu Thr Pro Ile Lys Ile Pro Val Asn Ser Thr Gly Thr Asp Lys 480 485 490	1611
tta atg aca ggt gtc att agc cct gag agg cgg tgc cgc tca gtg gaa Leu Met Thr Gly Val Ile Ser Pro Glu Arg Arg Cys Arg Ser Val Glu 495 500 505	1659
ttg gat ctc aac caa gca cat atg gag gag act cca aaa aga aag gga Leu Asp Leu Asn Gln Ala His Met Glu Glu Thr Pro Lys Arg Lys Gly 510 515 520	1707

gcc aaa gtg ttt ggg agc ctt gaa agg ggg ttg gat aag gtt atc act 1755
Ala Lys Val Phe Gly Ser Leu Glu Arg Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr
525 530 535

gtg ctc acc agg agc aaa agg aag ggt tct gcc aga gac ggg ccc aga 1803
Val Leu Thr Arg Ser Lys Arg Lys Gly Ser Ala Arg Asp Gly Pro Arg
540 545 550 555

aga cta aag ctt cac tat aat gtg act aca act aga tta gtg aat cca 1851
Arg Leu Lys Leu His Tyr Asn Val Thr Thr Thr Arg Leu Val Asn Pro
560 565 570

gat caa ctg ttg aat gaa ata atg tct att ctt cca aag aag cat gtt 1899
Asp Gln Leu Leu Asn Glu Ile Met Ser Ile Leu Pro Lys Lys His Val
575 580 585

gac ttt gta caa aag ggt tat aca ctg aag tgt caa aca cag tca gat 1947
Asp Phe Val Gln Lys Gly Tyr Thr Leu Lys Cys Gln Thr Gln Ser Asp
590 595 600

ttt ggg aaa gtg aca atg caa ttt gaa tta gaa gtg tgc cag ctt caa 1995
Phe Gly Lys Val Thr Met Gln Phe Glu Leu Glu Val Cys Gln Leu Gln
605 610 615

aaa ccc gat gtg gtg ggt atc agg agg cag cgg ctt aag ggc gat gcc 2043
Lys Pro Asp Val Val Gly Ile Arg Arg Gln Arg Leu Lys Gly Asp Ala
620 625 630 635

tgg gtt tac aaa aga tta gtg gaa gac atc cta tct agc tgc aag gta 2091
Trp Val Tyr Lys Arg Leu Val Glu Asp Ile Leu Ser Ser Cys Lys Val
640 645 650

taa ttgatggatt cttccatcct gccggatgag tgtgggtgtg atacagccta 2144

cataaagact gttatgatcg ctttgatttt aaagttcatt ggaactacca acttgtttct 2204

aaagagctat cttaagacca atatctcttt gtttttaaac aaaagatatt attttgtgta 2264

tgaatctaaa tcaagcccat ctgtcattat gttactgtct tttttaatca tgtgggtttg 2324

tatattaata attgttgact ttcttagatt cacttccata tgtgaatgta agctcttaac 2384

tatgtctctt tghtaatgtgt aatttctttc tgaaataaaa ccatttgtga atataaaaaa 2444

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2501

<210> 94
<211> 651
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94
Met Lys Asp Tyr Asp Glu Leu Leu Lys Tyr Tyr Glu Leu His Glu Thr
1 5 10 15

Ile Gly Thr Gly Gly Phe Ala Lys Val Lys Leu Ala Cys His Ile Leu
20 25 30

ES 2 572 367 T3

Thr Gly Glu Met Val Ala Ile Lys Ile Met Asp Lys Asn Thr Leu Gly
 35 40 45
 Ser Asp Leu Pro Arg Ile Lys Thr Glu Ile Glu Ala Leu Lys Asn Leu
 50 55 60
 Arg His Gln His Ile Cys Gln Leu Tyr His Val Leu Glu Thr Ala Asn
 65 70 75 80
 Lys Ile Phe Met Val Leu Glu Tyr Cys Pro Gly Gly Glu Leu Phe Asp
 85 90 95
 Tyr Ile Ile Ser Gln Asp Arg Leu Ser Glu Glu Glu Thr Arg Val Val
 100 105 110
 Phe Arg Gln Ile Val Ser Ala Val Ala Tyr Val His Ser Gln Gly Tyr
 115 120 125
 Ala His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Leu Leu Phe Asp Glu Tyr His
 130 135 140
 Lys Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Leu Cys Ala Lys Pro Lys Gly Asn
 145 150 155 160
 Lys Asp Tyr His Leu Gln Thr Cys Cys Gly Ser Leu Ala Tyr Ala Ala
 165 170 175
 Pro Glu Leu Ile Gln Gly Lys Ser Tyr Leu Gly Ser Glu Ala Asp Val
 180 185 190
 Trp Ser Met Gly Ile Leu Leu Tyr Val Leu Met Cys Gly Phe Leu Pro
 195 200 205
 Phe Asp Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Tyr Lys Lys Ile Met Arg Gly
 210 215 220
 Lys Tyr Asp Val Pro Lys Trp Leu Ser Pro Ser Ser Ile Leu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gln Gln Met Leu Gln Val Asp Pro Lys Lys Arg Ile Ser Met Lys Asn
 245 250 255
 Leu Leu Asn His Pro Trp Ile Met Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Val Glu
 260 265 270
 Trp Gln Ser Lys Asn Pro Phe Ile His Leu Asp Asp Asp Cys Val Thr
 275 280 285

ES 2 572 367 T3

Glu Leu Ser Val His His Arg Asn Asn Arg Gln Thr Met Glu Asp Leu
 290 295 300
 Ile Ser Leu Trp Gln Tyr Asp His Leu Thr Ala Thr Tyr Leu Leu Leu
 305 310 315 320
 Leu Ala Lys Lys Ala Arg Gly Lys Pro Val Arg Leu Arg Leu Ser Ser
 325 330 335
 Phe Ser Cys Gly Gln Ala Ser Ala Thr Pro Phe Thr Asp Ile Lys Ser
 340 345 350
 Asn Asn Trp Ser Leu Glu Asp Val Thr Ala Ser Asp Lys Asn Tyr Val
 355 360 365
 Ala Gly Leu Ile Asp Tyr Asp Trp Cys Glu Asp Asp Leu Ser Thr Gly
 370 375 380
 Ala Ala Thr Pro Arg Thr Ser Gln Phe Thr Lys Tyr Trp Thr Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Val Glu Ser Lys Ser Leu Thr Pro Ala Leu Cys Arg Thr Pro
 405 410 415
 Ala Asn Lys Leu Lys Asn Lys Glu Asn Val Tyr Thr Pro Lys Ser Ala
 420 425 430
 Val Lys Asn Glu Glu Tyr Phe Met Phe Pro Glu Pro Lys Thr Pro Val
 435 440 445
 Asn Lys Asn Gln His Lys Arg Glu Ile Leu Thr Thr Pro Asn Arg Tyr
 450 455 460
 Thr Thr Pro Ser Lys Ala Arg Asn Gln Cys Leu Lys Glu Thr Pro Ile
 465 470 475 480
 Lys Ile Pro Val Asn Ser Thr Gly Thr Asp Lys Leu Met Thr Gly Val
 485 490 495
 Ile Ser Pro Glu Arg Arg Cys Arg Ser Val Glu Leu Asp Leu Asn Gln
 500 505 510
 Ala His Met Glu Glu Thr Pro Lys Arg Lys Gly Ala Lys Val Phe Gly
 515 520 525
 Ser Leu Glu Arg Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Leu Thr Arg Ser
 530 535 540

ES 2 572 367 T3

Lys Arg Lys Gly Ser Ala Arg Asp Gly Pro Arg Arg Leu Lys Leu His
545 550 555 560

Tyr Asn Val Thr Thr Thr Arg Leu Val Asn Pro Asp Gln Leu Leu Asn
565 570 575

Glu Ile Met Ser Ile Leu Pro Lys Lys His Val Asp Phe Val Gln Lys
580 585 590

Gly Tyr Thr Leu Lys Cys Gln Thr Gln Ser Asp Phe Gly Lys Val Thr
595 600 605

Met Gln Phe Glu Leu Glu Val Cys Gln Leu Gln Lys Pro Asp Val Val
610 615 620

Gly Ile Arg Arg Gln Arg Leu Lys Gly Asp Ala Trp Val Tyr Lys Arg
625 630 635 640

Leu Val Glu Asp Ile Leu Ser Ser Cys Lys Val
645 650

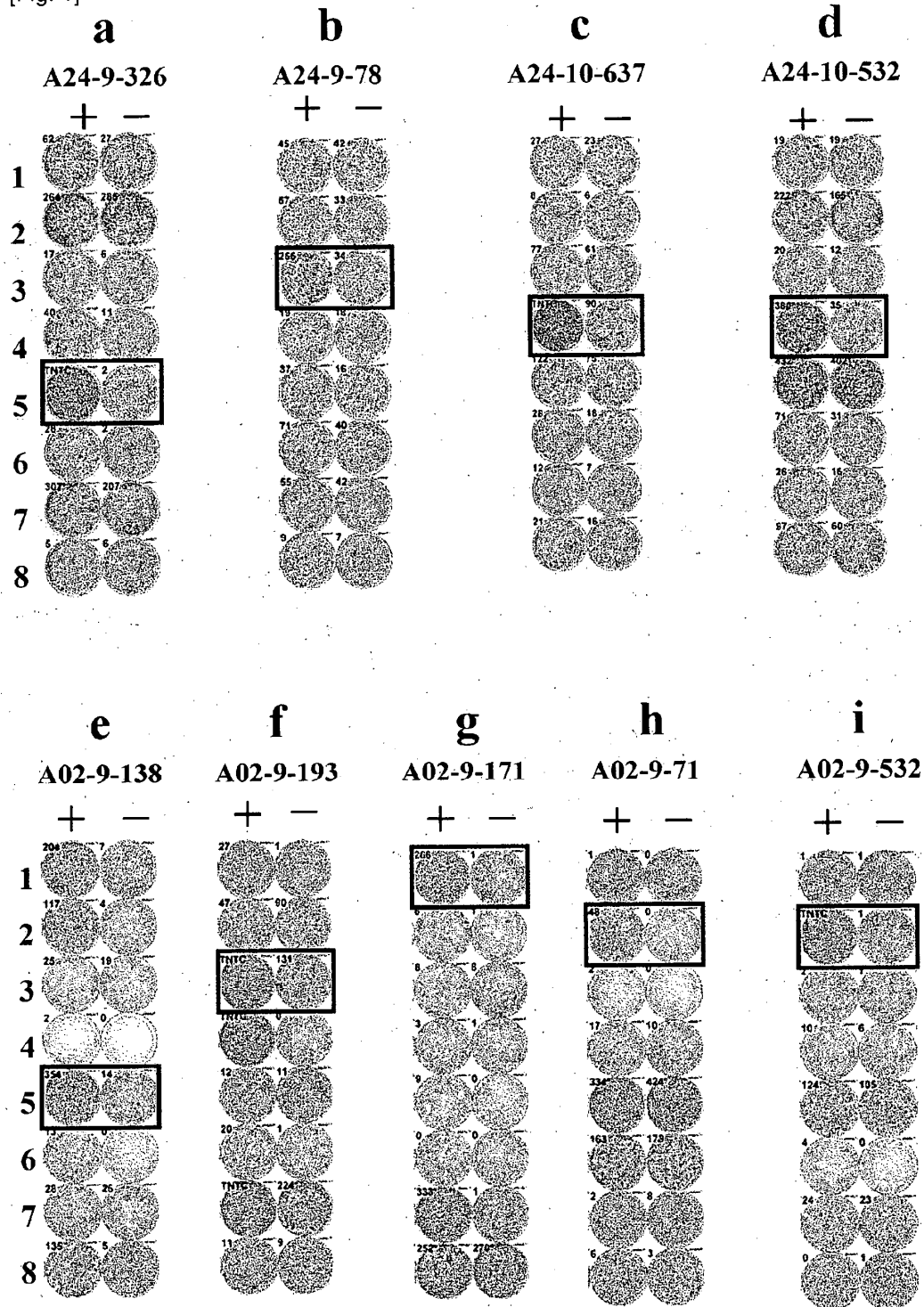
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido aislado de menos que 15 residuos de aminoácidos que es capaz de inducir linfocitos T citotóxicos (CTLs), en donde dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos escogida entre el conjunto que se compone de:
(a) la SEQ ID NO: 36; y
(b) la SEQ ID NO: 36 en la que 1 o 2 aminoácidos son sustituidos, insertados, suprimidos y/o añadidos.
- 10 2. El péptido que se expone en la reivindicación 1, en donde el péptido se compone de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el conjunto que se compone de:
(a) la SEQ ID NO: 36; y
(b) la SEQ ID NO: 36 en la que 1 o 2 aminoácidos son sustituidos, insertados, suprimidos y/o añadidos.
- 15 3. El péptido que se expone en la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido es un nonapéptido o un decapeptido.
4. El péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 3, en donde el péptido tiene una o ambas de las siguientes características:
(a) el segundo aminoácido desde el extremo terminal de N de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 36 está
20 sustituido por metionina, y
(b) el aminoácido del extremo terminal de C de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 está sustituido por valina.
- 25 5. Un polinucleótido aislado que codifica un péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4.
6. Un agente farmacéutico para el uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un cáncer y/o en la prevención de una
recurrencia postoperatoria del mismo, en donde el agente comprende un ingrediente activo escogido entre el
conjunto que se compone de:
30 (a) un péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4;
(b) un polinucleótido que codifica el péptido de (a) en una forma expresable;
(c) una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma, que presenta sobre su superficie un complejo formado
entre un antígeno HLA y un péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4;
(d) un CTL inducido contra un péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4; y
35 (e) una combinación de éstos.
7. El agente farmacéutico para el uso que se expone en la reivindicación 6, formulado para la administración a un
sujeto cuyo antígeno HLA es el HLA-A02.
- 40 8. El agente farmacéutico para el uso que se expone en la reivindicación 6, formulado para el tratamiento de un
cáncer seleccionado entre el conjunto formado por un cáncer de vejiga, un cáncer de mama, un cáncer cervical, un
carcinoma colangio-celular, una leucemia mieloide crónica (CML), un cáncer colorrectal, una endometriosis, un
cáncer de esófago, un cáncer gástrico, un cáncer de hígado, un cáncer de pulmón de células no pequeñas
(NSCLC), un linfoma, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un
45 carcinoma de riñón y un cáncer de pulmón de células pequeñas.
9. El agente farmacéutico para el uso que se expone en la reivindicación 6, en donde dicho agente se formula como
una vacuna.
- 50 10. Un método *in vitro* para inducir una célula presentadora de antígenos con una capacidad para inducir
fuertemente linfocitos T citotóxicos (CTLs), en donde el método comprende la etapa de poner en contacto una célula
presentadora de antígenos con un péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4, o la
etapa de introducir el polinucleótido que codifica el péptido en una forma expresable dentro de una célula
presentadora de antígenos.
- 55 11. Un método *in vitro* para inducir CTLs usando un péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones
1 hasta 4.
12. El método de la reivindicación 11, en donde dicho método comprende la etapa escogida entre el conjunto
60 formado por:
(a) poner en contacto de una célula T positiva para CD98 con una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma
que presenta sobre su superficie un complejo formado entre un antígeno HLA y un péptido que se expone en una
cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4; y

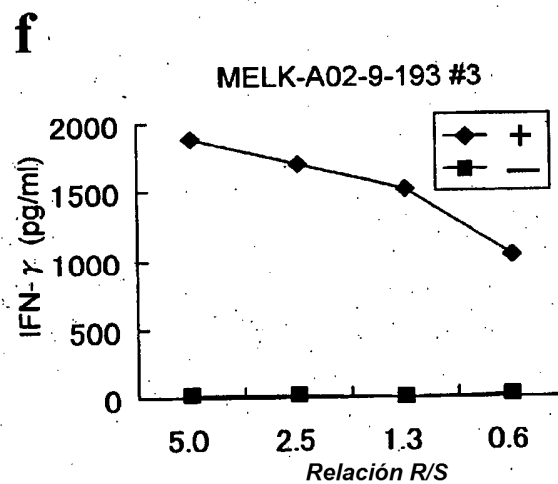
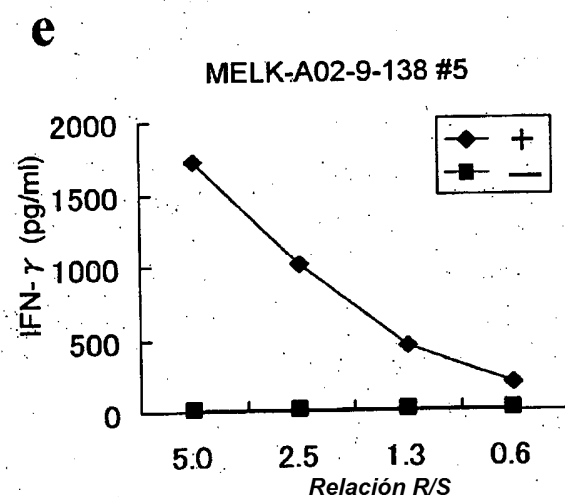
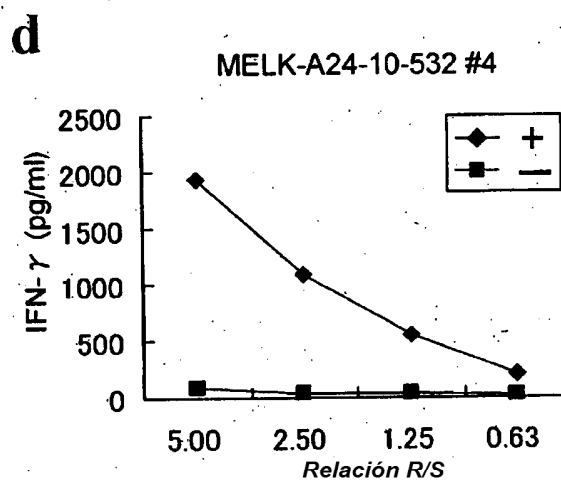
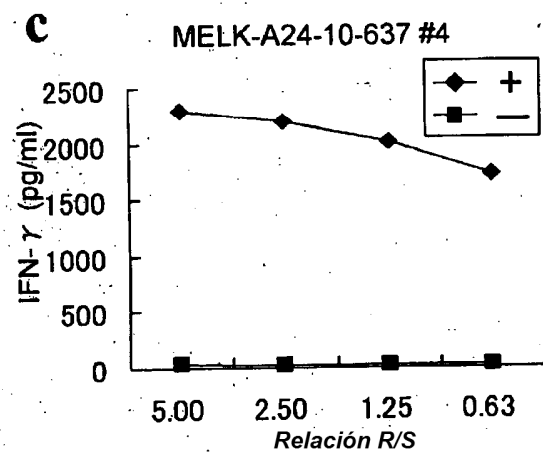
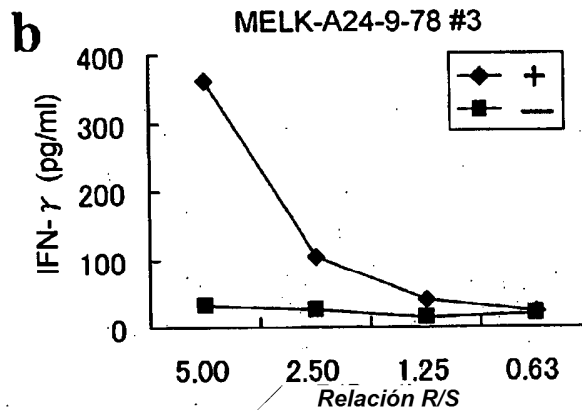
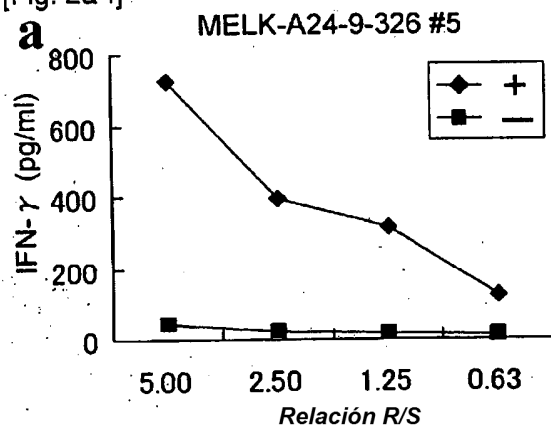
(b) introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad del TCR, que reconoce al complejo formado entre un antígeno HLA y un péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4 dentro de una célula T positiva para CD-8.

- 5 13. Un CTL aislado que es obtenible mediante el método de la reivindicación 11 o 12.
14. Una célula presentadora de antígenos aislada, que presenta sobre su superficie un complejo formado entre un antígeno HLA y un péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4.
- 10 15. Una célula presentadora de antígenos que se expone en la reivindicación 14, que es inducida mediante el método que se expone en la reivindicación 10.
16. Una célula presentadora de antígenos que se expone en la reivindicación 14 o 15, en la que el antígeno HLA es el HLA-A02.
- 15 17. Un agente para el uso en inducir una respuesta inmunitaria contra un cáncer en un sujeto, en donde dicho agente comprende un ingrediente activo escogido entre el conjunto formado por:
(a) un péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4;
(b) un polinucleótido que codifica el péptido de (a) en una forma expresable;
- 20 (c) una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma, que presenta sobre su superficie un complejo formado entre un antígeno HLA y un péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4;
(d) un CTL inducido contra un péptido que se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4; y
(e) una combinación de éstos.
- 25 18. El agente para el uso que se expone en la reivindicación 17, en el que dicho cáncer se escoge entre el conjunto formado por un cáncer de vejiga, un cáncer de mama, un cáncer cervical, un carcinoma colangio-celular, una CML, un cáncer colorrectal, una endometriosis, un cáncer de esófago, un cáncer gástrico, un cáncer de hígado, un NSCLC, un linfoma, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un carcinoma de riñón y un cáncer de pulmón de células pequeñas.
- 30 19. El agente para el uso que se expone en la reivindicación 17 o 18, en el que el sujeto tiene el HLA-A02.

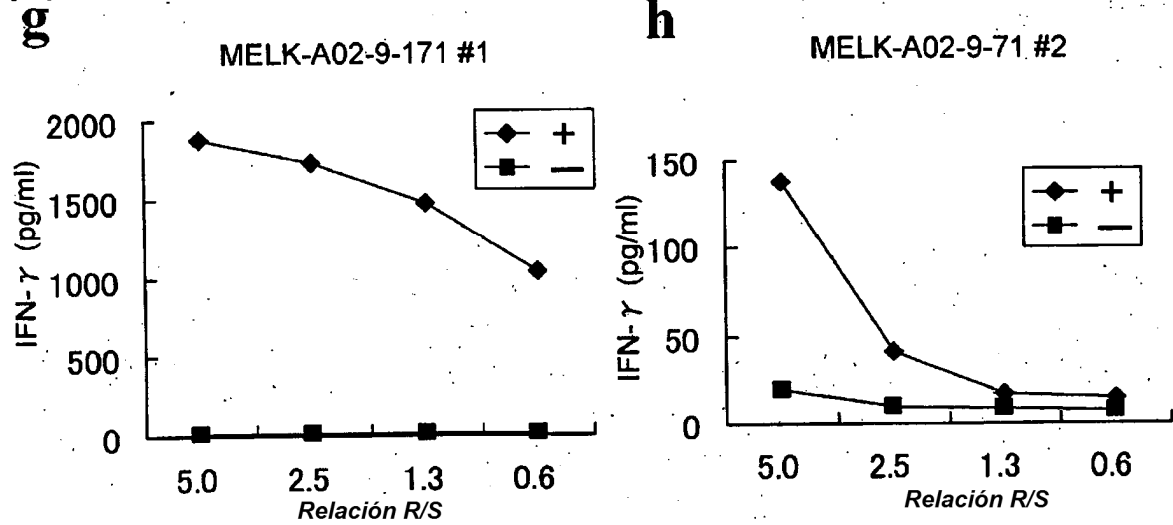
[Fig. 1]



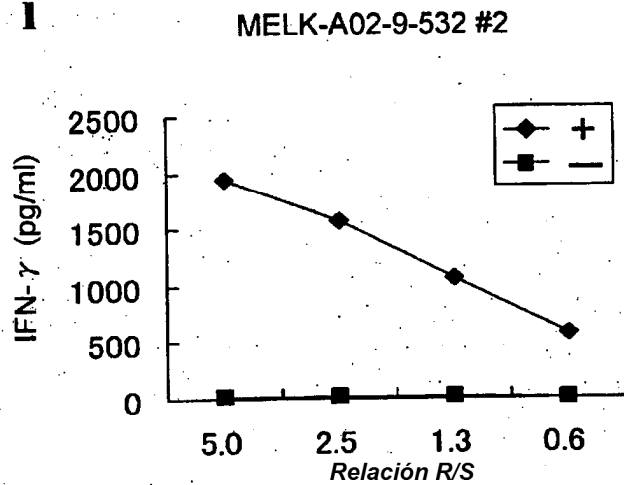
[Fig. 2a-f]



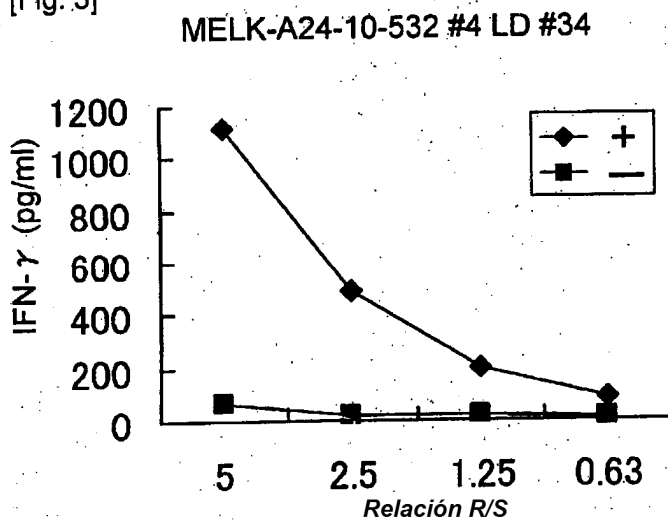
[Fig. 2g-i]



i

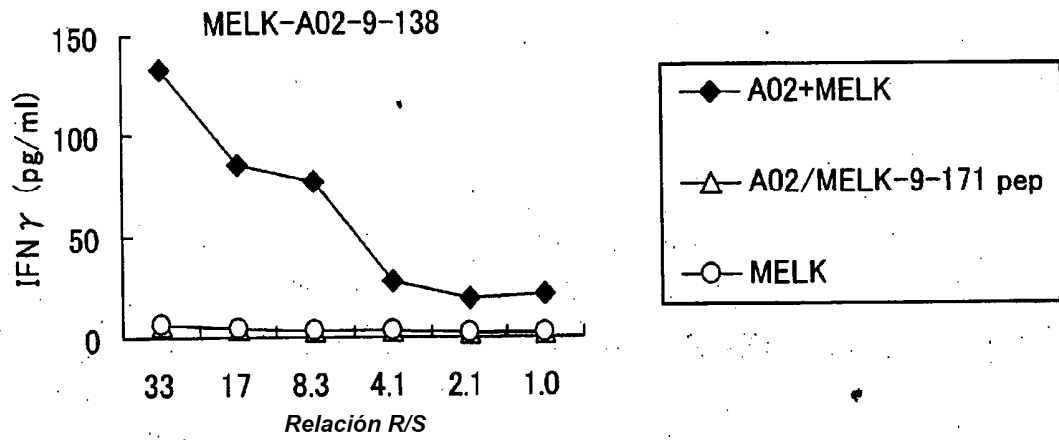


[Fig. 3]



[Fig. 4]

a



b

