

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 434**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2010 PCT/JP2010/001808**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2010 WO2010106770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2010 E 10753267 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2408913**

54 Título: **Péptidos NEIL3 y vacunas que incluyen los mismos**

30 Prioridad:

18.03.2009 US 210512

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

19.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TSUNODA, TAKUYA;
OHSAWA, RYUJI;
YOSHIMURA, SACHIKO;
WATANABE, TOMOHISA;
NAKAMURA, YUSUKE y
FURUKAWA, YOICHI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 617 434 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 NEIL3 y vacunas que incluyen los mismos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al campo de la ciencia biológica, más específicamente al campo de la terapia del cáncer. En particular, la presente invención se refiere a péptidos novedosos que son extremadamente efectivos como vacunas contra el cáncer, y a fármacos para tratar y prevenir tumores.

Antecedentes de la técnica

10 Se ha demostrado que los CTL CD8 positivos reconocen los péptidos epitópicos derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) sobre la molécula del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) clase I, y luego exterminan las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia de antígenos de melanoma (MAGE) como el primer ejemplo de los TAA, a través de enfoques inmunológicos se han descubierto muchos otros TAA (NPL 1/Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80; NPL 2/Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9), y algunos de los TAA actualmente están en proceso de desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas.

15 La identificación de nuevos TAA, que inducen respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas, garantiza el desarrollo adicional de la aplicación clínica de la estrategia de vacunación con péptidos en diversos tipos de cáncer (NPL 3/Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55; NPL 4/Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; NPL 5/Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; NPL 6/van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14; NPL 7/Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; NPL 8/Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; NPL 9/Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66; NPL 10/Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94). Hasta ahora, se han dado a conocer diversos ensayos clínicos utilizando estos péptidos derivados de antígenos asociados con tumores. Desafortunadamente, hasta la fecha sólo se podría observar una tasa de respuesta objetiva baja en estos ensayos de vacuna contra el cáncer (NPL 11/Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; NPL 12/Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42; NPL 13/Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15).

25 El TAA favorable es indispensable para la proliferación y supervivencia de células cancerosas, como una diana para inmunoterapia, debido a que el uso de estos TAA puede reducir al mínimo el riesgo bastante descrito de un escape inmunitario de las células cancerosas que se puede atribuir a la supresión, mutación, o disminución de los TAA como una consecuencia de la selección inmunitaria conducida terapéuticamente.

30 Los documentos WO2004/024766A1 y JP2006052216A describen diversos nonapéptidos capaces de inducir CTL, y fármacos que contienen tal péptido para el tratamiento o prevención de cánceres. Estos péptidos se describen como utilizables como vacunas. Además, los documentos WO2004/024766A1 y JP2006052216A describen el exosoma en el que el antígeno HLA es HLA-A02, HLA-A24, HLA-A201 o HLA-A2402. Sin embargo, los documentos WO2004/024766A1 y JP2006052216A, no describen los péptidos o variantes de NEIL3 inducibles por CTL reivindicados aquí que son adecuados como dianas para inmunoterapia.

35 Por otro lado, la Nei endonucleasa VIII-similar 3 (NEIL3) se ha aislado como un miembro que pertenece a una clase de ADN glucosilasas homólogas a la familia Fpg/Nei bacteriana (NPL 14/Bandaru et al., DNA Repair (Amst). 2002 Jul 17; 1(7):517-29). Estas glucosilasas inician la primera etapa en la reparación por corte de bases al escindir las bases dañadas por las especies de oxígeno reactivas y al introducir una interrupción de la cadena de ADN vía la reacción de liasa asociada. NEIL3 probablemente desempeña una función en el mecanismo de reparación del ADN; sin embargo, no se ha aclarado su relación con la carcinogénesis.

40 Lista de citas

Bibliografía no de patente

- [NPL 1] Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80
- [NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9
- 45 [NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55
- [NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42
- [NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9
- [NPL 6] van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14
- [NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8
- 50 [NPL 8] Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72

- [NPL 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66
- [NPL 10] Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94
- [NPL 11] Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80
- [NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42
- 5 [NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15
- [NPL 14] Bandaru et al., DNA Repair (Amst). 2002 Jul 17;1(7):517-29

Sumario de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de las dianas de inmunoterapia aplicables. Debido a que los TAA en general se perciben por el sistema inmunitario como "propios" y por lo tanto con frecuencia no tienen inmunogenicidad, el descubrimiento de las dianas adecuadas es de extrema importancia. Como se observó anteriormente, NEIL3 (SEC ID NO: 45 codificada por el gen del No. de acceso GenBank NM_018248 (por ejemplo, la SEC ID NO: 44)) se ha identificado como aumentado en cánceres, tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC), tumor de tejido blando, leucemia mieloide aguda (AML) y leucemia mieloide crónica (CML). De esta forma, NEIL3 es un candidato para la diana de la inmunoterapia de cáncer/tumores.

La presente invención se basa, al menos en parte, en la identificación de péptidos epitópicos específicos de los productos génicos de NEIL3 que poseen la capacidad de inducir los CTL específicos para NEIL3. Como se analizará con detalle más adelante, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de un donante sano se estimularon utilizando péptidos candidatos de unión a HLA-A*2402 o HLA-A*0201 derivados de NEIL3. Luego se establecieron las líneas CTL con citotoxicidad específica contra las células diana HLA-A24 o HLA-A2 positivas pulsadas con cada uno de los péptidos candidatos. Estos resultados demuestran que estos péptidos son péptidos epitópicos restringidos a HLA-A24 o HLA-A2 que pueden inducir respuestas inmunitarias potentes y específicas contra células que expresan NEIL3. Además, se indica que NEIL3 es bastante inmunogénica, y los epítomos de la misma son dianas efectivas para la inmunoterapia del cáncer/tumores.

Por consiguiente, la presente invención proporciona péptidos aislados que se unen al antígeno HLA que consiste en NEIL3 (SEC ID NO: 45) o los fragmentos inmunológicamente activos de la misma. Se espera que estos péptidos tengan inducibilidad de CTL y se puedan utilizar para inducir CTL ex vivo o para que se administren a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres tales como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, endometriosis, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, SCLC y AML. De preferencia, aquellos péptidos son nonapéptidos o decapeptidos, y de mayor preferencia, consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 1 a 43. En particular, los péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43 mostraron fuerte inducibilidad de CTL.

Los péptidos de la presente invención abarcan aquellos en los que se sustituyen, suprimen o añaden uno o dos aminoácidos, siempre y cuando los péptidos modificados conserven la inducibilidad de CTL original.

Además, la presente invención proporciona polinucleótidos aislados que codifican cualesquiera péptidos de la presente invención. Estos polinucleótidos se pueden utilizar para inducir o preparar las APC con inducibilidad de CTL o para ser administrados a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres, así como también los péptidos presentes.

Cuando se administran a un sujeto, los péptidos presentes se presentan sobre la superficie de las APC y luego inducen los CTL que se dirigen a los péptidos respectivos. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, también se proporcionan composiciones o sustancias entre las que se incluyen cualesquiera péptidos o polinucleótidos de la presente invención para inducir los CTL. Además, las composiciones o sustancias entre las que se incluyen cualesquiera péptidos o polinucleótidos se pueden utilizar para el tratamiento y/o profilaxis de cánceres, tales como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML, y/o la prevención de la recurrencia post-operatoria de los mismos. De esta forma, la presente invención también proporciona composiciones o sustancias farmacéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de cánceres, y/o la prevención de la recurrencia post-operatoria de los mismos, las cuales incluyen cualesquiera péptidos o polinucleótidos de la presente invención. Las presentes composiciones o sustancias farmacéuticas pueden incluir las APC o exosomas que presentan como ingredientes activos cualesquiera de los presentes péptidos en lugar o además de los presentes péptidos o polinucleótidos.

Los péptidos o polinucleótidos de la presente invención pueden inducir las APC que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el presente péptido, por ejemplo al poner en contacto las APC derivadas de un sujeto con el péptido o introducir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en las APC. Estas APC tienen alta inducibilidad de CTL contra péptidos diana y son de utilidad en la inmunoterapia contra el

5 cáncer. Por lo tanto, la presente invención abarca los métodos para inducir las APC con inducibilidad de CTL, y las APC obtenidas mediante los métodos.

La presente invención también proporciona un método para inducir CTL, que incluye la etapa de co-cultivar células CD8 positivas con las APC o exosomas que presentan el péptido de la presente invención sobre su superficie, o la etapa de introducir un gen que incluya un polinucleótido que codifica un polipéptido sub-unitario del receptor de

10 células T (TCR) que se une al presente péptido. Los CTL obtenidos mediante los métodos pueden ser de utilidad para el tratamiento y/o prevención de cánceres, tales como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML. Por lo tanto, la presente invención abarca los CTL obtenidos mediante los presentes métodos.

15 La presente invención también se puede aplicar a cualesquiera enfermedades que están relacionadas con la sobre-expresión de NEIL3, tal como cáncer; los cánceres ilustrativos incluyen cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML.

Breve descripción de los dibujos

20 Fig. 1

La Figura 1 representa fotografías que muestran los resultados del ensayo ELISPOT de IFN-gamma sobre los CTL que se indujeron con péptidos derivados de NEIL3. Los CTL en el pocillo número #8, estimulados con NEIL3-A2-9-585 (SEQ ID NO: 3) (a), #2 con NEIL3-A2-9-127 (SEQ ID NO: 4) (b), #4 y 5 con NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (c), #3 con NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO: 6) (d), #1 con NEIL3-A2-9-271 (SEQ ID NO: 11) (e), #3 con NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO: 15) (f), #1 con NEIL3-A2-10-340 (SEQ ID NO: 17) (g), #2 y 3 con NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO: 21) (h), #6 con NEIL3-A2-10-378 (SEQ ID NO: 22) (i) y #9, 10, 12 y 13 con NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (para HLA-A0206) (j) mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadro en el pocillo de estas fotografías indica que las células provenientes del pocillo correspondiente se expandieron para establecer líneas CTL. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido adecuado, y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ninguno de los péptidos.

25

Fig. 2-1

La Figura 2-1 representa gráficas lineales que muestran la producción de IFN-gamma de las líneas CTL estimuladas con NEIL3-A2-585 (SEQ ID NO: 3) (a), NEIL3-A2-9-127 (SEQ ID NO: 4) (b), NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (c)(d), y NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO: 6) (e), detectada por el ensayo ELISA de IFN-gamma. Se demuestra que las líneas CTL establecidas por estimulación con cada péptido mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido adecuado y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ninguno de los péptidos.

35

40 Fig. 2-2

La Figura 2-2 representa gráficas lineales que muestran la producción de IFN-gamma de las líneas CTL estimuladas con NEIL3-A2-9-271 (SEQ ID NO: 11) (f), NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO: 15) (g), NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO: 21) (h)(i) y NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (for HLA-A0206) (j)(k), detectada mediante el ensayo ELISA de IFN-gamma. Se demuestra que las líneas CTL establecidas por estimulación con cada péptido mostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido adecuado, y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ninguno de los péptidos.

45

Fig. 3

La Figura 3 muestra la producción de IFN-gamma de los clones CTL establecidos mediante dilución limitante a partir de las líneas CTL estimuladas con NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (a), NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO: 6) (b), NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO: 15) (c), NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO: 21) (d) y NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (e) (para HLA-A0206). Se demuestra que los clones CTL establecidos mediante la estimulación con NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (a), NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO: 6) (b), NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO: 15) (c), NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO: 21) (d) y NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (e) (para HLA-A0206) mostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" indica la producción de IFN-gamma contra las células diana pulsadas con NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (a), NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO: 6) (b), NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO: 15) (c), NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO: 21) (d) y

50

55

NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (para HLA-A0206) (e), y “-” indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ninguno de los péptidos.

Fig. 4-1

5 La Figura 4 representa las gráficas lineales que muestran la actividad CTL específica contra las células diana que expresan exógenamente NEIL3 y HLA-A*0201 o HLA-A*0206. Las células COS7 transfectadas con HLA-A*0201, con HLA-A*0206 o con el gen NEIL3 de longitud completa se prepararon como control. Los clones CTL establecidos con NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (a), NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO: 6) (b), y NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO: 15) (c) mostraron una actividad CTL específica contra las células COS7 transfectadas tanto con NEIL3 como con HLA-A*0201 (rombo negro). Por otro lado, no se detectó ninguna actividad CTL específica significativa contra células diana que expresan ya sea HLA (triángulo) o NEIL3 (círculo).

Fig. 4-2

15 La Figura 4 representa una gráfica lineal que muestra la actividad CTL específica contra las células diana que expresan exógenamente NEIL3 y HLA-A*0201 o HLA-A*0206. Las células COS7 transfectadas con HLA-A*0201, con HLA-A*0206 o con el gen NEIL3 de longitud completa se prepararon como control. Los clones CTL establecidos con NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO: 5) (d) (para HLA-A0206) mostraron actividad CTL específica contra células COS7 transfectadas tanto con NEIL3 como con HLA-A*0206 (rombo negro). Por otro lado, no se detectó ninguna actividad CTL específica significativa contra las células diana que expresan ya sea HLA (triángulo) o NEIL3 (círculo).

Fig. 5

20 La Figura 5 representa fotografías que muestran la expresión de NEIL3 en cáncer hepático. La parte A muestra la expresión de NEIL3 en tejidos de cáncer hepático clínico examinados mediante RT-PCR semi-cuantitativa. La parte B muestra la expresión de NEIL3 en líneas de células HCC examinadas mediante RT-PCR semi-cuantitativa.

Fig. 6

25 La Figura 6 representa fotografías que muestran los resultados del ensayo ELISPOT de IFN-gamma sobre los CTL que se indujeron con péptidos derivados de NEIL3. Los CTL en el pocillo número #7 estimulados con NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO: 24) (a), #6 con NEIL3-A24-9-362 (SEQ ID NO: 33) (b), #2 y #8 con NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO: 35) (c), #8 con NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO: 41) (d), #1 y #4 con NEIL3-A24-10-87 (SEQ ID NO: 43) (e) mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadro del pocillo de estas fotografías indica que las células provenientes del pocillo correspondiente se expandieron para establecer la línea CTL. Por el contrario, como un caso típico de datos negativos, no se mostró ninguna producción de IFN-gamma específica a partir del CTL estimulado con NEIL3-A24-9-364 (SEQ ID NO: 25) (f) contra células diana pulsadas con péptidos. En las figuras, “+” indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido adecuado, y “-” indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ninguno de los péptidos.

Fig. 7

30 La Figura 7 representa gráficas lineales que muestran la producción de IFN-gamma de las líneas CTL estimuladas con NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO: 24) (a), NEIL3-A24-9-362 (SEQ ID NO: 33) (b), NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO: 35) (c), NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO: 41) (d) y NEIL3-A24-10-87 (SEQ ID NO: 43) (e) detectada mediante ensayo ELISA de IFN-gamma. Se demostró que las líneas CTL establecidas por estimulación con cada péptido mostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, “+” indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido adecuado, y “-” indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ninguno de los péptidos.

Fig. 8

45 La Figura 8 representa gráficas lineales que muestran la producción de IFN-gamma de los clones CTL establecidos mediante dilución limitante a partir de las líneas CTL estimuladas con NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO: 24) (a), NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO: 35) (b) y NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO: 41) (c). Se demostró que los clones CTL establecidos por estimulación con cada péptido mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, “+” indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido adecuado, y “-” indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ninguno de los péptidos.

Fig. 9

La figura 9 representa una gráfica lineal que muestra la actividad CTL específica contra las células diana que expresan exógenamente NEIL3 y HLA-A*2402. Las células COS7 transfectadas con HLA-A*2402 o el gen NEIL3 de longitud completa se prepararon como controles. El clon CTL establecido con NEIL3-A24-9-545 (SEC ID NO: 24) mostró una actividad CTL específica contra células COS7 transfectadas tanto con NEIL3 como con HLA-A*2402 (rombo negro). Por otro lado, no se detectó ninguna actividad CTL específica significativa contra las células diana que expresan ya sea HLA-A*2402 (triángulo) o NEIL3 (círculo).

Descripción de las realizaciones

Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente se pueden utilizar en la práctica o prueba de las realizaciones de la presente invención, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Sin embargo, antes de que se describan los materiales y métodos de la presente, se debe entender que la presente invención no se limita a los tamaños, formas, dimensiones, materiales, metodologías, protocolos, etc., particulares descritos en la presente, ya que estos pueden variar de acuerdo con la experimentación y/u optimización de rutina.

I. Definiciones

Las palabras “uno”, “una”, y “el/la”, en el sentido en el que se utiliza en la presente, significan “al menos uno” a menos que se indique específicamente de otra manera.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan indistintamente en la presente para hacer referencia a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más restos de aminoácidos pueden ser restos modificados, o restos que no se presentan en la naturaleza, tales como miméticos químicos artificiales de los aminoácidos que se presentan en la naturaleza correspondientes, así como también los polímeros de aminoácidos que se presentan en la naturaleza.

El término “aminoácido”, en el sentido en el que se utiliza en la presente, se refiere a aminoácidos que se presentan en la naturaleza y sintéticos, así como también análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos que se presentan en la naturaleza. El aminoácido puede ser ya sea L-aminoácidos o D-aminoácidos. Los aminoácidos que se presentan en la naturaleza son aquellos codificados por el código genético, así como también aquellos modificados después de la traducción en células (por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, y O-fosfoserina). La frase “análogo de aminoácidos” se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica (un átomo de carbono alfa unido a un átomo de hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) como un aminoácido que se presenta en la naturaleza aunque tienen uno o más grupos R modificados o cadenas principales modificadas (por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metionina metilsulfonio). La frase “mimético de aminoácido” se refiere a compuestos químicos que tienen diferentes estructuras pero funciones similares con los aminoácidos generales.

En la presente se puede hacer referencia a los aminoácidos por sus símbolos comúnmente conocidos de tres letras o los símbolos de una sola letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

Los términos “gen”, “polinucleótidos”, “nucleótidos” y “ácidos nucleicos” se utilizan indistintamente en la presente y, a menos que se indique específicamente de otra manera, son similares a los aminoácidos a los que se hace referencia por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados. A menos que se defina de otra manera, el término “cáncer” se refiere a cánceres que sobre-expresan el gen NEIL3, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML. A menos que se defina de otra manera, los términos “linfocito T citotóxico”, “célula T citotóxica” y “CTL” se utilizan indistintamente en la presente y, a menos que se indique específicamente de otra manera, se refieren a un subgrupo de linfocitos T que son capaces de reconocer células no propias (por ejemplo, células tumorales/cancerosas, células infectadas por virus) e inducir la muerte de estas células.

A menos que se defina de otra manera, el término “HLA-A24” se refiere al tipo HLA-A24 que contiene los subtipos tales como HLA-A*2402.

A menos que se defina de otra manera, el término “HLA-A2”, en el sentido en el que se utiliza en la presente, se refiere representativamente a los subtipos tales como HLA-A*0201 y HLA-A*0206.

A menos que se defina de otra manera, el término “kit” en el sentido en el que se utiliza en la presente se utiliza en referencia a una combinación de reactivos y otros materiales. Se contempla en la presente que el kit puede incluir micro-matriz, chip, marcador, etc. No se pretende que el término “kit” se limite a una combinación particular de reactivos y/o materiales.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como se define comúnmente por alguien con experiencia normal en la técnica a la cual pertenece esta invención.

II. Péptidos

5 Para demostrar que los péptidos derivados de NEIL3 funcionan como un antígeno reconocido por los CTL, los péptidos derivados de NEIL3 (SEC ID NO: 45) se analizaron para determinar si fueron epítomos antigénicos restringidos por HLA-A24 o A2, que son los alelos HLA comúnmente encontrados (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994).

Los candidatos de los péptidos de unión a HLA-A2 derivados de NEIL3 se identificaron utilizando la información sobre sus afinidades de unión a HLA-A2. El péptido candidato es el péptido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 1 a 23.

10 Además, después de la estimulación in vitro de las células T mediante células dendríticas (DC) pulsadas (cargadas) con estos péptidos, los CTL se establecieron exitosamente utilizando cada uno de los siguientes péptidos;

NEIL3-A2-9-585 (SEC ID NO: 3),

NEIL3-A2-9-127 (SEC ID NO: 4),

NEIL3-A2-9-416 (SEC ID NO: 5),

NEIL3-A2-9-71 (SEC ID NO: 6),

15 NEIL3-A2-9-271 (SEC ID NO: 11),

NEIL3-A2-10-198 (SEC ID NO: 15),

NEIL3-A2-10-340 (SEC ID NO: 17),

NEIL3-A2-10-590 (SEC ID NO: 21), y

NEIL3-A2-10-378 (SEC ID NO: 22).

20 Los candidatos de péptidos de unión a HLA-A24 derivados de NEIL3 se identificaron en base a sus afinidades de unión a HLA-A24. El péptido candidato es el péptido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 24 a 43.

Además, después de la estimulación in vitro de las células T mediante células dendríticas (DC) pulsadas (cargadas) con estos péptidos, los CTL se establecieron exitosamente utilizando cada uno de los siguientes péptidos;

25 NEIL3-A24-9-545 (SEC ID NO: 24),

NEIL3-A24-9-362 (SEC ID NO: 33),

NEIL3-A24-10-320 (SEC ID NO: 35),

NEIL3-A24-10-544 (SEC ID NO: 41), y

NEIL3-A24-10-87 (SEC ID NO: 43).

30 Estos CTL establecidos mostraron una potente actividad CTL específica contra células diana pulsadas con los péptidos respectivos. Estos resultados demuestran que la NEIL3 es un antígeno reconocido por las CTL, y que los péptidos ensayados son péptidos epítomícos de la NEIL3 restringidos por HLA-A24 o HLA-A2.

35 Ya que el gen NEIL3 se sobre-expresa en células cancerosas, tales como de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML, y no se expresa en órganos casi normales, es una buena diana para la inmunoterapia del cáncer. De esta forma, la presente invención proporciona nonapéptidos (péptidos que consisten en nueve restos de aminoácidos) y decapeptidos (péptidos que consisten en diez restos de aminoácidos) de los epítomos reconocidos por CTL a partir de NEIL3. Alternativamente, la presente invención proporciona péptidos aislados que se unen a antígenos HLA e inducen linfocitos T citotóxicos (CTL). Más específicamente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43.

45 En general, programas de software actualmente disponibles, por ejemplo, en Internet, tales como aquellos descritos en Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75 y Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, se pueden utilizar para calcular las afinidades de unión entre diversos péptidos y los antígenos HLA in silico. La afinidad de unión a los antígenos HLA se puede medir según se describe, por ejemplo, en Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007 Oct 31; 8: 424, Buus S et al. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003, Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, y

Nielsen M et al. PLoS ONE 2007; 2: e796, que se resumen en, por ejemplo, Lafuente EM et al., Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220. Los métodos para determinar la afinidad de unión se describen, por ejemplo, en; Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190; Protein Science, 2000, 9: 1838-1846. Por lo tanto, se pueden seleccionar fragmentos derivados de NEIL3, que tengan alta afinidad de unión a los antígenos HLA utilizando estos programas de software. De esta forma, la presente descripción abarca los péptidos que consisten en cualesquiera fragmentos derivados de NEIL3, los cuales se podría determinar que se unen con los antígenos HLA mediante estos programas conocidos. Además, estos péptidos pueden incluir el péptido que consiste en la longitud completa de NEIL3.

Los péptidos de la presente invención se pueden flanquear con restos de aminoácidos adicionales, siempre y cuando los péptidos conserven su inducibilidad de CTL. Los restos de aminoácidos adicionales pueden estar compuestos de cualquier tipo de aminoácidos, siempre y cuando no dañen la inducibilidad de CTL del péptido original. De esta forma, la presente invención abarca los péptidos con afinidad de unión a antígenos HLA, incluyendo los péptidos derivados de NEIL3. Estos péptidos tienen menos de alrededor de 15 aminoácidos.

En general, se sabe que las modificaciones de uno o más aminoácidos en un péptido no influyen en la función del péptido, o en algunos casos incluso mejoran la función deseada de la proteína original. De hecho, se sabe que los péptidos modificados (es decir, los péptidos compuestos de una secuencia de aminoácidos modificada al sustituir, suprimir o añadir uno, dos o varios restos de aminoácidos a una secuencia de referencia original) conservan la actividad biológica del péptido original (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13). De esta forma, de acuerdo con una realización de la presente invención, el péptido que tiene inducibilidad de CTL de la presente invención puede estar compuesto del péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43, en la que se añaden, suprimen y/o sustituyen uno, o dos aminoácidos.

Alguien con experiencia en la técnica reconocerá que las adiciones, supresiones o sustituciones individuales a una secuencia de aminoácidos, que alteran un aminoácido individual o un porcentaje pequeño de aminoácidos, dan como resultado la conservación de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original; de esta forma se denomina como "sustitución conservativa" o "modificación conservativa", en la que la alteración de una proteína da como resultado en una proteína con funciones similares. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los ejemplos de las propiedades de las cadenas laterales de aminoácidos son aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene un grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene un átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene un grupo aromático (H, F, Y, W). Además, los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

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

También se considera que estos péptidos modificados conservativamente son péptidos de la presente invención. Sin embargo, el péptido de la presente invención no se restringe a ellos, y puede incluir modificaciones no conservativas, siempre y cuando el péptido conserve la inducibilidad de CTL. Además, los péptidos modificados no excluyen los péptidos inducibles por CTL de las variantes polimórficas, los homólogos dentro de las especies, y los alelos de NEIL3.

Para conservar la inducibilidad de CTL requerida, se puede modificar (añadir o sustituir) un pequeño número (por ejemplo, 1 o 2).

Además, los péptidos se pueden sustituir o añadir mediante estos restos de aminoácidos hasta alcanzar una mayor afinidad de unión. Cuando se utiliza en inmunoterapia de cáncer, los péptidos de la presente se presentan en la superficie de una célula o exosoma como un complejo con un antígeno HLA. Además de los péptidos que se

presentan naturalmente, puesto que la regularidad de las secuencias de los péptidos presentados por la unión a antígenos HLA ya es conocida (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), se pueden introducir en los péptidos inmunogénicos de la presente invención modificaciones con base en esta regularidad.

5 Por ejemplo, los péptidos que muestran alta afinidad de unión a HLA-A2 tienen su segundo aminoácido proveniente del extremo N-terminal sustituido por leucina o metionina, y también se pueden utilizar favorablemente péptidos cuyo aminoácido que en el extremo C-terminal está sustituido por valina o leucina. De esta forma, los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21 y 22, en los que el segundo aminoácido proviene del extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO está sustituido por leucina o metionina y los péptidos y/o en los que el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO está sustituido por valina o leucina, están englobados por la presente invención.

10 Por otro lado, los péptidos que poseen alta afinidad de unión a HLA-A24 tienen su segundo aminoácido proveniente del extremo N-terminal sustituido por fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y el aminoácido en el extremo C-terminal está sustituido por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina. De esta forma, los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NOs: 24, 33, 35, 41 y 43, en los que el segundo aminoácido proveniente del extremo N-terminal está sustituido por fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o en los que el extremo C-terminal está sustituido por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, están englobados por la presente invención.

15 Las sustituciones se pueden introducir no sólo en los aminoácidos terminales, sino también en la posición del reconocimiento de péptidos por el receptor de células T potenciales (TCR). Diversos estudios han demostrado que un péptido con sustituciones de aminoácidos puede tener igual o mejor función que la del original, por ejemplo, CAP1, p53 (264-272), Her-2/neu (369-377) o gp100 (209-217) (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb 1; 168(3):1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 y S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

20 Además, también se pueden añadir uno o dos aminoácidos al extremo N-terminal y/o C de los péptidos de la presente. Estos péptidos modificados con alta afinidad de unión a antígenos HLA y que conservan la inducibilidad de CTL también se incluyen en la presente invención.

25 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, se pueden inducir efectos secundarios tales como trastornos autoinmunes o síntomas alérgicos contra sustancias específicas. Por lo tanto, se pueden realizar búsquedas de homología utilizando las bases de datos disponibles para evitar situaciones en las cuales la secuencia del péptido coincide con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando se aclara a partir de las búsquedas de homología que no existe un péptido con 1 o 2 aminoácidos diferentes al péptido objetivo, el péptido objetivo se puede modificar para aumentar su afinidad de unión a los antígenos HLA, y/o aumentar su inducibilidad de CTL sin ningún daño de estos efectos secundarios.

30 Aunque se espera que los péptidos que tengan alta afinidad de unión a los antígenos HLA como se describe anteriormente sean bastante efectivos, los péptidos candidatos, que se seleccionan de acuerdo con la presencia de alta afinidad de unión como un indicador, se examinan adicionalmente en busca de la presencia de inducibilidad de CTL. En la presente, la frase "inducibilidad de CTL" indica la capacidad del péptido para inducir los CTL cuando se presentan en células que presentan antígenos (APC). Además, la "inducibilidad de CTL" incluye la capacidad del péptido para inducir activación de CTL, proliferación de CTL, promover la lisis de CTL de células diana, y para aumentar la producción de IFN-gamma por CTL.

35 La confirmación de la inducibilidad de CTL se lleva a cabo al induciendo las APC que portan los antígenos MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DC)), o más específicamente las DC derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana, y después de la estimulación con los péptidos, mezclando con células CD8 positivas, y después midiendo el IFN-gamma producido y liberado mediante el CTL contra las células diana. Como el sistema de reacción, se pueden utilizar animales transgénicos que se hayan producido para expresar un antígeno HLA humano (por ejemplo, aquellos descritos en BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on MHC (HLA) class II restricted T(H) response). Por ejemplo, las células diana se pueden radiomarcarse con ⁵¹Cr y demás, y la actividad citotóxica se puede calcular a partir de la radioactividad liberada a partir de las células diana. Alternativamente, se puede examinar midiendo el IFN-gamma producido y liberado mediante el CTL en presencia de las APC que portan péptidos inmovilizados, y visualizando la zona de inhibición en los medios utilizando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

40 Como resultado del examen de la inducibilidad de CTL de los péptidos como se describió anteriormente, los nonapéptidos o decapéptidos seleccionados de los péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos indicadas por las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43 mostraron particularmente alta

inducibilidad de CTL, así como también alta afinidad de unión a un antígeno HLA. De esta forma, estos péptidos son realizaciones ilustrativas de la presente invención.

Además, el resultado del análisis de homología mostró que estos péptidos no tienen una homología significativa con los péptidos derivados de cualesquiera otros productos génicos humanos conocidos. Esto disminuye la posibilidad de respuestas inmunitarias desconocidas o no deseadas cuando se utilizan para inmunoterapia. Por lo tanto, también a partir de este aspecto, estos péptidos son de utilidad para producir inmunidad en pacientes con cáncer contra NEIL3. De esta forma, los péptidos de la presente invención, de preferencia los péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43.

Además de la modificación de los péptidos de la presente, analizados anteriormente, los péptidos de la presente descripción se pueden enlazar a otros péptidos, siempre y cuando conserven la inducibilidad de CTL. Los otros péptidos ilustrados incluyen: los péptidos de la presente invención o los péptidos inducibles por CTL derivados de otros TAA. Son bien conocidos en la técnica los enlazadores entre los péptidos, por ejemplo AAY (P. M. Daftarian et al., *J Trans Med* 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Suttmuller et al., *J Immunol.* 2000, 165: 7308-7315) o K (S. Ota et al., *Can Res.* 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., *J Immunol.* 2002, 168: 5709-5715).

Por ejemplo, también se pueden utilizar sustancialmente de manera simultánea los péptidos antigénicos asociados a tumor no NEIL3 para aumentar la respuesta inmunitaria vía la clase I y/o clase II de HLA. Queda bien establecido que las células cancerosas pueden expresar más de un gen asociado a tumores. Queda dentro del alcance de la experimentación rutinaria por alguien con experiencia normal en la técnica determinar si un sujeto particular expresa o no genes asociados a tumores adicionales, y luego incluir los péptidos de unión a HLA clase I y/o a HLA clase II derivados de los productos de expresión de estos genes en las composiciones o vacunas de NEIL3 de acuerdo con la presente invención.

Los ejemplos de péptidos de unión a HLA clase I y HLA clase II son bien conocidos por alguien con experiencia normal en la técnica (por ejemplo, véase Coulie, *Stem Cells* 13:393-403, 1995). Alguien con experiencia normal en la técnica puede preparar polipéptidos que incluyan uno o más péptidos NEIL3 y uno o más de los péptidos que no sean NEIL3, o los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos, de acuerdo con procedimientos estándar de biología molecular.

De esta forma, tales "politopos" son grupos de dos o más péptidos que estimulan la respuesta potencialmente inmunogénica o inmunitaria que se puedan unir conjuntamente en diversas disposiciones (por ejemplo, concatenados, solapantes). El politopo (o ácido nucleico que codifica el politopo) se puede administrar en un protocolo de inmunización estándar, por ejemplo a animales, para ensayar la eficacia del politopo en la estimulación, intensificación y/o provocación de una respuesta inmunitaria.

Los péptidos se pueden unir conjuntamente de manera directa o vía el uso de secuencias de flanqueo para formar politopos, y el uso de politopos como vacunas es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Thomson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., *Nature Biotechnol.* 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., *J Immunol.* 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., *J Exp. Med.* 171(1):299-306, 1990).

Los politopos que contienen diversos números y combinaciones de epítomos se pueden preparar y ensayar en busca del reconocimiento mediante los CTL y en busca de la eficacia en aumentar una respuesta inmunitaria.

Además, los péptidos de la presente descripción se pueden enlazar adicionalmente a otras sustancias, siempre y cuando conserven la inducibilidad de CTL. Estas sustancias pueden incluir: péptidos, lípidos, azúcar y cadenas de azúcar, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glicosilación, oxidación de la cadena lateral, o fosforilación, siempre y cuando las modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos como se describe en la presente. Los tipos de modificaciones se pueden realizar para conferir funciones adicionales (por ejemplo, función de asignación, y función de suministro) o para estabilizar al polipéptido.

Por ejemplo, para aumentar la estabilidad in vivo de un polipéptido, se sabe en la técnica cómo introducir D-aminoácidos, miméticos de aminoácidos o aminoácidos no naturales; este concepto también se puede adoptar por los polipéptidos de la presente. La estabilidad de un polipéptido se puede valorar de varias formas. Por ejemplo, se pueden utilizar para probar la estabilidad peptidasas y diversos medios biológicos, tales como plasma y suero humano (véase, por ejemplo, Verhoef et al., *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 1986, 11: 291-302).

Además, como se observó anteriormente, entre los péptidos modificados que se sustituyen, suprimen o añaden por uno o dos restos de aminoácidos, se pueden identificar o seleccionar aquellos que tengan la misma o mayor actividad en comparación con los péptidos originales.

En la presente, la actividad puede incluir la actividad de unión a MHC, la inducibilidad APC o CTL, y la actividad citotóxica.

En la presente, los péptidos de la presente invención también se pueden describir como “péptidos NEIL3” o “polipéptidos NEIL3”.

III. Preparación de los péptidos NEIL3

5 Los péptidos de la presente invención se pueden preparar utilizando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar sintéticamente, mediante tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar individualmente o como polipéptidos más largos, incluyendo dos o más péptidos. Los péptidos se pueden aislar, es decir, purificar o aislar prácticamente libres de otras proteínas de células hospedantes que se presentan en la naturaleza y fragmentos de las mismas, o cualesquiera otras sustancias químicas.

10 Los péptidos de la presente invención pueden contener modificaciones, tales como glicosilación, oxidación de la cadena lateral, o fosforilación, siempre y cuando las modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos como se describe en la presente. Otras modificaciones incluyen la incorporación de D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácidos que se puedan utilizar, por ejemplo, para aumentar la vida media sérica de los péptidos.

15 Un péptido de la presente invención se puede obtener a través de síntesis química con base en la secuencia seleccionada de aminoácidos. Por ejemplo, los métodos convencionales para síntesis de péptidos que se pueden adoptar para la síntesis incluyen:

(i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

(ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

(iii) Peptide Synthesis (en japonés), Maruzen Co., 1975;

20 (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (en japonés), Maruzen Co., 1985;

(v) Development of Pharmaceuticals (segundo volumen) (en japonés), Vol. 14 (síntesis de péptidos), Hirokawa, 1991;

(vi) documento WO99/67288; y

25 (vii) Barany G. y Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, “Solid Phase Peptide Synthesis”, Academic Press, New York, 1980, 100-118.

30 Alternativamente, los péptidos de la presente se pueden obtener al adoptar cualesquiera métodos conocidos de ingeniería genética para la producción de péptidos (por ejemplo, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, en primer lugar, un vector adecuado que alberga un polinucleótido que codifica el péptido objetivo en una forma que se puede expresar (por ejemplo, en dirección 3' de una secuencia reguladora correspondiente a una secuencia promotora) se prepara y transforma en una célula hospedante adecuada. Estos vectores y células hospedantes también se proporcionan por la presente invención. La célula hospedante se cultiva luego para producir el péptido de interés. El péptido también se puede producir in vitro adoptando un sistema de traducción in vitro.

IV. Polinucleótidos

35 La presente invención proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los péptidos mencionados anteriormente de la presente invención. Éstos incluyen los polinucleótidos derivados del gen NEIL3 que se presenta en la naturaleza (No. de acceso GenBank NM_018248 (por ejemplo, SEC ID NO: 44)) y aquellos que tienen una de las secuencias nucleotídicas modificada conservativamente del mismo. En la presente, la frase “secuencia nucleotídica modificada conservativamente” se refiere a secuencias que codifican las secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, muchos de los ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína determinada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. De esta forma, en cada posición en la que se especifica una alanina por un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácidos nucleicos son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente, que codifica un péptido, también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para triptófano) se puede modificar para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un péptido se describe implícitamente en cada secuencia descrita.

El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto de ADN, ARN, o derivados de los mismos. Como se conoce bien en la técnica, una molécula de ADN está compuesta de bases tales como las bases A, T, C y G, que se presentan en la naturaleza, y T se reemplaza por U en un ARN. Un experto reconocerá que las bases que no se presentan en la naturaleza también se pueden incluir en los polinucleótidos.

- El polinucleótido de la presente invención puede codificar múltiples péptidos de la presente invención, con o sin secuencias de aminoácidos intermedias. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos intermedia puede proporcionar un sitio de escisión (por ejemplo, la secuencia para reconocimiento de enzimas) del polinucleótido o de los péptidos traducidos. Además, el polinucleótido puede incluir cualesquiera secuencias adicionales para la secuencia codificante que codifica el péptido de la presente invención. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido recombinante que incluye secuencias reguladoras requeridas para la expresión del péptido, o puede ser un vector de expresión (plásmido) con genes marcadores, etc. En general, estos polinucleótidos recombinantes se pueden preparar mediante la manipulación de polinucleótidos a través de técnicas recombinantes convencionales utilizando, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.
- Se pueden utilizar técnicas tanto recombinantes como de síntesis química para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, un polinucleótido se puede producir mediante la inserción en un vector adecuado, que se puede expresar cuando se transfecta en una célula competente. Alternativamente, un polinucleótido se puede amplificar utilizando técnicas de PCR o la expresión en hospedantes adecuados (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989).
- Alternativamente, un polinucleótido se puede sintetizar utilizando las técnicas de fase sólida, como se describe en Beaucage SL y Iyer RP, *Tetrahedron* 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., *EMBO J* 1984, 3: 801-5.

V. Exosomas

- La presente invención proporciona además vesículas intracelulares denominadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de la presente invención y los antígenos HLA sobre su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, al utilizar los métodos detallados en las publicaciones de Kohyo de la solicitud de patente japonesa No. Hei 11-510507 y en el documento WO99/03499, y se pueden preparar utilizando las APC obtenidas de pacientes que sean sujetos para tratamiento y/o prevención. Los exosomas de la presente invención se pueden inocular como vacunas, similarmente a los péptidos de la presente invención.

- El tipo de antígenos HLA incluido en los complejos debe coincidir con el del sujeto que requiere tratamiento y/o prevención. Por ejemplo, para los japoneses, HLA-A24 y HLA-A2, en particular HLA-A*2402 y HLA-A*0201 y HLA-A*0206, a menudo son adecuados. El uso del tipo A24 o el tipo A2 que se expresa altamente entre japoneses y caucásicos es favorable para obtener resultados efectivos, y son de utilidad los subtipos, tales como A*2402, A*0201 y A*0206. Típicamente, en la clínica, el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento se investiga por adelantado, lo cual permite la selección adecuada de péptidos que tengan altos niveles de afinidad de unión a este antígeno, o que tengan inducibilidad de CTL mediante la presentación de antígenos. Además, para obtener péptidos que muestren alta afinidad de unión e inducibilidad de CTL, se puede realizar la sustitución, supresión o adición de 1 o 2 aminoácidos con base a la secuencia de aminoácidos del péptido parcial NEIL3 que se presenta en la naturaleza.

- En caso de utilizar el antígeno HLA tipo A2 para el exosoma de la presente invención, son de utilidad los péptidos que incluyen la secuencia de las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21 y 22.

Alternativamente, en caso de utilizar el antígeno HLA tipo A24 para el exosoma de la presente invención, son de utilidad los péptidos que tienen una secuencia según cualquiera de las SEC ID NOs: 24, 33, 35, 41 y 43.

VI. Células que presentan antígenos (APC)

- La presente invención también proporciona las APC aisladas que presentan complejos formados con antígenos HLA y los péptidos de la presente invención sobre sus superficies. Las APC se pueden derivar de pacientes que sean sujetos a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar como vacunas por sí mismas o en combinación con otros fármacos, entre los que se incluyen los péptidos de la presente invención, exosomas, o los CTL.

- Las APC no se limitan a un tipo particular de células, e incluyen las DC, células de Langerhans, macrófagos, células B y células T activadas, que se sabe que presentan antígenos proteínicos sobre su superficie celular para que sean reconocidos por los linfocitos. Debido a que la DC es una APC representativa que tiene la mayor actividad inductora de CTL entre las APC, las DC son de utilidad como las APC de la presente invención.

- Por ejemplo, las APC de la presente invención se pueden obtener al inducir las DC de monocitos de sangre periférica y luego al ponerlas en contacto (estimularlas) con los péptidos de la presente invención in vitro, ex vivo o in vivo. Cuando los péptidos de la presente invención se administran a los sujetos, las APC que presentan los péptidos de la presente invención se inducen en el cuerpo del sujeto. Por lo tanto, las APC de la presente invención se pueden obtener al recolectar las APC del sujeto después de administrar los péptidos de la presente invención al sujeto. Alternativamente, las APC de la presente invención se pueden obtener al poner en contacto las APC recolectadas de un sujeto con el péptido de la presente invención.

- Las APC de la presente invención se pueden administrar a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer en el sujeto por sí mismas o en combinación con otros fármacos, entre los que se incluyen los péptidos, exosomas o los CTL de la presente invención. Por ejemplo, la administración ex vivo puede incluir las etapas de:

- a: recolectar las APC de un primer sujeto,
- b: poner en contacto las APC de la etapa a con el péptido, y
- c: administrar las APC de la etapa b a un segundo sujeto.

El primer sujeto y el segundo sujeto pueden ser los mismos individuos, o pueden ser individuos diferentes. Las APC obtenidas por la etapa b pueden ser una vacuna para el tratamiento y/o prevención del cáncer, tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, las APC tienen un alto nivel de inducibilidad de CTL. En la expresión de "alto nivel de inducibilidad de CTL", el alto nivel se define con respecto al nivel de aquél al poner en contacto la APC con ningún péptido o con péptidos que no pueden inducir el CTL. Estas APC que tienen un alto nivel de inducibilidad de CTL se pueden preparar mediante un método que incluye la etapa de transferir un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención a las APC in vitro, así como también el método mencionado anteriormente.

Los genes introducidos pueden estar en la forma de los ADN o ARN. Los ejemplos de los métodos para introducción incluyen, sin limitaciones particulares, diversos métodos realizados convencionalmente en este campo, tales como lipofección, electroporación, o el método de fosfato cálcico. Más específicamente, se puede realizar como se describe en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; traducción de la publicación japonesa de la publicación internacional No. 2000-509281. Al transferir el gen a las APC, el gen experimenta transcripción, traducción, y demás en la célula, y luego la proteína obtenida se procesa mediante MHC clase I o clase II, y continúa a través de una ruta de presentación para presentar péptidos parciales.

VII. Linfocitos T citotóxicos (CTL)

Un CTL inducido contra cualquiera de los péptidos de la presente invención refuerza la respuesta inmunitaria hacia células cancerosas in vivo, y de esta forma se puede utilizar como vacunas similares a los péptidos. De esta forma, la presente invención proporciona los CTL aislados que se inducen o activan específicamente mediante cualquiera de los péptidos de la presente.

Estos CTL se pueden obtener (1) administrando el péptido o péptidos de la presente invención a un sujeto, o (2) poniendo en contacto (estimulando) las APC derivadas del sujeto, y las células CD8 positivas, o los leucocitos mononucleares de sangre periférica in vitro con el péptido o péptidos de la presente invención, o (3) poniendo en contacto las células CD8 positivas o los leucocitos mononucleares de sangre periférica in vitro con las APC o exosomas que presentan un complejo de un antígeno HLA y el péptido sobre su superficie, o (4) introduciendo un gen que incluya un polinucleótido que codifica una subunidad del receptor de células T (TCR) que se une al péptido de la presente invención. Estas APC o exosomas se pueden preparar mediante los métodos descritos anteriormente, y los detalles del método de (4) se describen más adelante en la sección "VIII. Receptor de células T (TCR)".

Los CTL de la presente invención se pueden derivar de pacientes que sean sujetos a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar por sí mismos en combinación con otros fármacos, incluyendo los péptidos de la presente invención o los exosomas con el fin de regular los efectos. Los CTL obtenidos actúan específicamente contra células diana que presentan los péptidos de la presente invención, por ejemplo los mismos péptidos utilizados para inducción. Las células diana pueden ser células que expresen endógenamente NEIL3, tales como células cancerosas, o células que se transfecten con el gen NEIL3; y las células que presentan un péptido de la presente invención sobre la superficie celular debido a la estimulación por el péptido también pueden servir como dianas de un ataque CTL activado.

VIII. Receptor de células T (TCR)

La presente invención también proporciona una composición que incluye ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de células T (TCR), y los métodos para utilizar la misma. Las subunidades del TCR tienen la capacidad de formar los TCR que confieren especificidad a células T contra células tumorales que presentan NEIL3. Al utilizar los métodos conocidos en la técnica, se pueden identificar los ácidos nucleicos de las cadenas alfa y beta como las subunidades del TCR del CTL inducido con uno o más péptidos de la presente invención (documento WO2007/032255 and Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Por ejemplo, se prefiere el método de la PCR para analizar el TCR. Los cebadores de la PCR para el análisis pueden ser, por ejemplo, los cebadores 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') como los cebadores del lado 5' (SEC ID NO: 48), y los cebadores 3-TRA-C (5'-tcagctggaccagccgcagcgt-3') específicos para la región C de la cadena alfa del TCR (SEC ID NO: 49), cebadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatccttctcttgac-3') específicos para la región C1 de la cadena beta del TCR (SEC ID NO: 50), o los cebadores 33-TRbeta-C2 (5'-ctagcctctggaatccttctctt-3') específicos para la región C2 de la cadena beta del TCR (SEC ID NO: 51) como los cebadores del lado 3', aunque no se limitan a los mismos. Los TCR derivados se pueden unir con gran avidéz a células diana que presenten el

péptido NEIL3, y opcionalmente median el exterminio eficiente de las células diana que presentan el péptido NEIL3 in vivo e in vitro.

5 Los ácidos nucleicos que codifican las subunidades del TCR se pueden incorporar en vectores adecuados, por ejemplo vectores retrovirales. Estos vectores son bien conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos o los vectores de los que los incluyen útilmente se pueden transfectar en una célula T, por ejemplo una célula T proveniente de un paciente.

10 El TCR específico es un receptor capaz de reconocer específicamente un complejo de un péptido de la presente invención y una molécula de HLA, proporcionando una actividad específica de células T contra la célula diana cuando el TCR se presenta sobre la superficie de la célula T. Un reconocimiento específico del complejo anterior se puede confirmar mediante cualesquiera métodos conocidos, y los métodos preferidos incluyen, por ejemplo, análisis de tinción con multímeros de HLA utilizando moléculas de HLA y péptidos de la presente invención, y ensayo ELISPOT. Al realizar el ensayo ELISPOT, se puede confirmar que una célula T que expresa el TCR sobre la superficie celular reconoce una célula mediante el TCR, y que la señal se transmite intracelularmente. La confirmación de que el complejo mencionado anteriormente puede proporcionar una actividad citotóxica de células T cuando el complejo existe sobre la superficie de las células T también se puede llevar a cabo mediante un método conocido. Un método preferido incluye, por ejemplo, la determinación de la actividad citotóxica contra una célula diana HLA positiva, tal como un ensayo de liberación de cromo.

15 Además, la presente invención proporciona los CTL que se preparan mediante transducción con ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de las subunidades del TCR que se unen al péptido NEIL3 de, por ejemplo, SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21 y 22 en el contexto de HLA-A2, y también los péptidos de las SEC ID NOs: 24, 33, 35, 41 y 43 en el contexto de HLA-A24.

20 Los CTL transducidos son capaces de dirigirse a células cancerosas in vivo, y se pueden expandir mediante métodos de cultivo in vitro bien conocidos (por ejemplo, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Los CTL de la presente invención se pueden utilizar para formar una composición inmunogénica útil para el tratamiento o prevención del cáncer en un paciente que necesita de terapia o protección (documento WO2006/031221).

IX. Sustancias o composiciones farmacéuticas

25 La prevención y profilaxis incluyen cualquier actividad que reduzca la carga de mortalidad o morbilidad de una enfermedad. La prevención y profilaxis se pueden presentar "a niveles de prevención primarios, secundarios y terciarios". Mientras que la prevención y profilaxis primarias evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles de prevención secundarios y terciarios y la profilaxis abarcan las actividades dirigidas a la prevención y profilaxis del progreso de una enfermedad y la emergencia de síntomas, así como también la reducción del impacto negativo de una enfermedad ya establecida al restaurar la función y reducir las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y profilaxis incluyen una amplia gama de terapias profilácticas dirigidas a aliviar la gravedad del trastorno particular, por ejemplo al reducir la proliferación y metástasis de tumores, reduciendo la angiogénesis.

35 El tratamiento para la profilaxis del cáncer y/o la prevención de la recurrencia post-operatoria del mismo incluye cualquiera de las siguientes etapas, tales como la eliminación quirúrgica de células cancerosas, la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la involución o regresión de un tumor, la inducción de una remisión y supresión de la aparición de cáncer, la regresión de tumores, y la reducción o inhibición de metástasis. Tratar efectivamente y/o la profilaxis del cáncer disminuye la mortalidad y mejora el pronóstico de los individuos que tengan cáncer, disminuye los niveles de marcadores tumorales en la sangre, y alivia los síntomas detectables que acompañan al cáncer. Por ejemplo, la reducción o mejora de los síntomas constituye tratar efectivamente y/o la profilaxis incluye 10%, 20%, 30% o más de la reducción o una enfermedad estable.

40 Debido a que la expresión de NEIL3 se eleva específicamente en cáncer tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML en comparación con tejido normal, los péptidos o polinucleótidos de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento y/o profilaxis del cáncer, y/o prevención de la recurrencia post-operatoria del mismo. De esta forma, la presente invención proporciona una sustancia o composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/o la prevención de la recurrencia post-operatoria del mismo, que incluye uno o más de los péptidos o polinucleótidos de la presente invención como un ingrediente activo. Alternativamente, los péptidos de la presente se pueden expresar sobre la superficie de cualquiera de los exosomas o células anteriores, tales como las APC para utilizarse como sustancias o composiciones farmacéuticas. Además, los CTL mencionados anteriormente que se dirigen a cualquiera de los péptidos de la presente invención también se pueden utilizar como el ingrediente activo de las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente.

55 Las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente son de utilidad como una vacuna. En la presente invención, la frase "vacuna" (también denominada como una composición inmunogénica) se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad anti-tumoral con la inoculación en animales.

Los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden utilizar para tratar y/o prevenir cánceres, y/o la prevención de la recurrencia post-operatoria del mismo en sujetos o pacientes, entre los que se incluyen seres humanos y cualquier otro mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, ratones, ratas, cobayas, conejos, gatos, perros, ovejas, cabras, cerdos, ganado vacuno, caballos, monos, babuinos, y chimpancés, en particular un animal comercialmente importante o un animal domesticado.

5

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

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica ese péptido según se expone en la presente en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y
- (d) una célula T citotóxica de la presente invención

10

en la fabricación de una composición o sustancia farmacéutica para el tratamiento o prevención del cáncer o tumor.

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

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica ese péptido según se expone en la presente en una forma expresable;

15

para utilizarse en el tratamiento o prevención del cáncer o tumor.

La presente descripción proporciona además un método o procedimiento para fabricar una composición o sustancia farmacéutica para el tratamiento o prevención del cáncer o tumor, en el que el método o procedimiento incluye la etapa de formular un portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable con un ingrediente activo seleccionado de entre:

20

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica ese péptido según se expone en la presente en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y
- (d) una célula T citotóxica de la presente invención

como ingredientes activos.

25

La presente descripción también proporciona un método o procedimiento para fabricar una composición o sustancia farmacéutica para el tratamiento o prevención del cáncer o tumor, en el que el método o procedimiento incluye las etapas de mezclar un ingrediente activo con un portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable, en el que el ingrediente activo se selecciona de entre:

30

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica ese péptido según se expone en la presente en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y
- (d) una célula T citotóxica de la presente invención.

35

De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que los péptidos entre los que se incluyen la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43 son los péptidos epitópicos restringidos a HLA-A24 o HLA-A2, o los candidatos que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica. Por lo tanto, las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente que incluyen cualquiera de estos péptidos con las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43 son particularmente adecuadas para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A2. Lo mismo se aplica a las sustancias o composiciones farmacéuticas que incluyen los polinucleótidos que codifican cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de la presente invención).

40

Los cánceres que serán tratados por las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención no están limitados, e incluyen cualquier cáncer en el cual esté implicado NEIL3 (por ejemplo, se sobre-exprese), por ejemplo cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML.

45

Las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente pueden contener, además de los ingredientes activos mencionados anteriormente, otros péptidos que tengan la capacidad de inducir los CTL contra células cancerosas, otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, etc. En la presente, los otros péptidos que tienen la capacidad de inducir los CTL contra células cancerosas se ejemplifican por antígenos específicos del cáncer (por ejemplo, los TAA identificados), aunque no se limitan a los mismos.

Si es necesario, las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como un ingrediente activo, siempre y cuando la sustancia no inhiba el efecto antitumoral del ingrediente activo, por ejemplo cualquiera de los péptidos de la presente. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir sustancias o composiciones antiinflamatorias, analgésicos, sustancias quimioterapéuticas, y similares. Además de otras sustancias terapéuticas en el medicamento mismo, los medicamentos de la presente invención también se pueden administrar secuencial o concurrentemente con una o más de otras sustancias o composiciones farmacológicas. Las cantidades de medicamento y la sustancia o composición farmacológica dependen, por ejemplo, del tipo de sustancias o composiciones farmacológicas que se utilizan, la enfermedad que será tratada, y el calendario y vías de administración.

Se debe entender que, además de los ingredientes particularmente mencionados en la presente, las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir otras sustancias o composiciones convencionales en la técnica habiendo considerado el tipo de formulación en cuestión.

En una realización de la presente invención, las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente se pueden incluir en artículos de fabricación y kits que contengan los materiales útiles para el tratamiento de las condiciones patológicas de la enfermedad que será tratada, por ejemplo el cáncer. El artículo de fabricación puede incluir un recipiente de cualquiera de las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta en el recipiente deberá indicar la sustancia o composición utilizada para el tratamiento o prevención de una o más condiciones de la enfermedad. La etiqueta también puede indicar las direcciones de administración, etc.

Además del recipiente descrito anteriormente, un kit que incluye una sustancia o composición farmacéutica de la presente invención puede incluir opcionalmente además un segundo recipiente que aloje un diluyente farmacéuticamente aceptable. Además puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, e insertos de envase con las instrucciones para utilizarse.

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

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

Los péptidos de la presente invención se pueden administrar directamente como una sustancia o composición farmacéutica, o si es necesario, que se haya formulado mediante métodos de formulación convencionales. En el último caso, además de los péptidos de la presente invención, se pueden incluir portadores, excipientes, y demás que se utilicen por lo general para fármacos, según sea adecuado sin limitaciones particulares. Los ejemplos de estos portadores son agua esterilizada, disolución salina fisiológica, amortiguador de fosfato, fluido para cultivos, y demás. Además, las sustancias o composiciones farmacéuticas pueden contener según sea necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos, y demás. Las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden utilizar para fines anticancerosos.

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar en combinación, lo cual incluye dos o más de los péptidos de la presente invención, para inducir el CTL in vivo. Los péptidos pueden estar en un cóctel o se pueden conjugar entre sí utilizando técnicas estándar. Por ejemplo, los péptidos se pueden enlazar o expresar químicamente como una secuencia polipeptídica de fusión individual que puede tener uno o varios aminoácidos como un enlazador (por ejemplo, enlazador de lisina: K. S. Kawamura et al. J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715). Los péptidos en la combinación pueden iguales o diferentes. Al administrar los péptidos de la presente invención, los péptidos se presentan en alta densidad por los antígenos HLA sobre las APC, luego se inducen los CTL que reaccionan específicamente frente al complejo formado entre el péptido presentado y el antígeno HLA. Alternativamente, las APC (por ejemplo, las DC) se retiran de los sujetos y luego se estimulan por los péptidos de la presente invención para obtener las APC que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención sobre su superficie celular. Estas APC se vuelven a administrar a los sujetos para inducir los CTL en los sujetos, y como resultado, se puede aumentar la agresividad hacia el endotelio asociado al tumor.

Las sustancias o composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o prevención del cáncer, que incluye cualquiera de los péptidos de la presente invención como el ingrediente activo, pueden incluir un adyuvante, de tal forma que se establecerá efectivamente una inmunidad celular, o se pueden administrar con otros ingredientes activos, y se

pueden administrar mediante formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a cualquier compuesto, sustancia o composición que mejore la respuesta inmunitaria contra la proteína cuando se administran conjuntamente (o sucesivamente) con la proteína que tenga actividad inmunológica. Un adyuvante que se puede aplicar incluye aquellos descritos en la bibliografía (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Los adyuvantes ilustrativos incluyen fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina del cólera, toxina de Salmonella, adyuvante incompleto de Freund (IFA), adyuvante completo de Freund (CFA), ISCOMatrix, GM-CSF, CpG, emulsión de OW, y demás, aunque no se limitan a los mismos.

Además, se pueden utilizar convenientemente formulaciones en liposomas, formulaciones granulares en las cuales el péptido se une a perlas de unos pocos micrómetros de diámetro, y las formulaciones en las cuales un lípido se une al péptido.

Los péptidos de la presente invención también se pueden administrar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos preferidos de estas sales incluyen sales con un metal alcalino, sales con un metal, sales con una base orgánica, sales con un ácido orgánico y sales con un ácido inorgánico.

Las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente descripción incluyen un componente el cual ceba el CTL. Los lípidos se han identificado como sustancias o composiciones capaces de cebar el CTL in vivo contra antígenos virales. Por ejemplo, los restos de ácido palmítico se pueden unir a los grupos amino en épsilon y en alfa de un resto de lisina y luego se pueden enlazar a un péptido de la presente invención. El péptido lipidado se puede administrar luego ya sea directamente en una micela o partículas, se puede incorporar en un liposoma, o se puede emulsionar en un adyuvante. Como otro ejemplo para el cebado lipídico de respuestas de CTL, para cebar un CTL se pueden utilizar lipoproteínas de *E. coli*, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS), cuando se une covalentemente a un péptido adecuado (véase, por ejemplo, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).

El método de administración puede ser oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, o demás, y mediante administración sistémica o administración local a la vecindad de los sitios diana. La administración se puede realizar mediante administración individual, o se puede reforzar por múltiples administraciones. La dosificación de los péptidos de la presente invención se puede ajustar adecuadamente de acuerdo con la enfermedad que será tratada, la edad del paciente, el peso, el método de administración, y demás, y es por lo general de 0,001 mg hasta 1.000 mg, por ejemplo 0,001 mg hasta 1.000 mg, por ejemplo 0,1 mg hasta 10 mg, y se puede administrar una vez en unos cuantos días hasta unos cuantos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente una dosificación adecuada.

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

Las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir ácidos nucleicos que codifican el péptido o péptidos descritos en la presente en una forma expresable. En la presente, la frase "en una forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando se introduce en una célula, se expresará in vivo como un polipéptido que induce una inmunidad anti-tumoral. En una realización ilustrativa, la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido de interés incluye los elementos reguladores necesarios para la expresión del polinucleótido. El polinucleótido o polinucleótidos se pueden equipar para alcanzar una inserción estable en el genoma de la célula diana (véase, por ejemplo Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 para una descripción de los vectores con casete de recombinación homóloga. Véase también, por ejemplo, Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; las patentes U.S. n^{os} 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y el documento WO 98/04720). Los ejemplos de tecnologías para suministro a base de ADN incluyen "ADN desnudo", suministro facilitado (bupivacaína, polímeros, mediado por péptidos), complejos de lípidos catiónicos, y suministro mediado por partículas ("pistola génica") o provocado por presión (véase, por ejemplo, la patente U.S. n^o 5.922.687).

Los péptidos de la presente invención también se pueden expresar mediante vectores virales o bacterianos. Los ejemplos de vectores de expresión incluyen hospedantes virales atenuados, tales como virus de la vacuna o la viruela. Este enfoque implica el uso del virus de la vacuna, por ejemplo, como un vector para expresar las secuencias nucleotídicas que codifican el péptido. Con la introducción en un hospedante, el virus de la vacuna recombinante expresa el péptido inmunogénico, y con esto produce una respuesta inmunitaria. Los vectores de la vacuna y los métodos útiles en los protocolos de inmunización se describen en, por ejemplo, la patente U.S. No. 4.722.848. Otro vector es BCG (Bacilo Calmette Guerin). Los vectores de BCG se describen en Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60. Una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración o inmunización terapéutica, por ejemplo los vectores de adenovirus y adenoasociados, vectores retrovirales, vectores de Salmonella typhi, vectores de la toxina de ántrax destoxificados, etc., serán evidentes. Véanse, por ejemplo, Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85.

El suministro de un polinucleótido a un paciente puede ser directo, en cuyo caso el paciente se expone directamente a un vector que porta el polinucleótido, o indirecto, en cuyo caso las células se transforman primero con el polinucleótido de interés in vitro, luego las células se trasplantan en el paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapias génicas in vivo y ex vivo.

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

El método de administración puede ser oral, por inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, o etc., y es de utilidad la administración sistémica o administración local a la vecindad de los sitios diana. La administración se puede realizar mediante una administración individual o se puede reforzar por múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el portador adecuado, o de las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de la presente invención, se puede ajustar adecuadamente de acuerdo con la enfermedad que será tratada, la edad del paciente, el peso, el método de administración, etc., y por lo general es de 0,001 mg hasta 1000 mg, por ejemplo 0,001 mg hasta 1000 mg, por ejemplo 0,1 mg hasta 10 mg, y se puede administrar una vez cada unos cuantos días hasta una vez cada unos cuantos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente la dosificación adecuada.

X. Métodos para utilizar los péptidos, exosomas, las APC y los CTL

Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención se pueden utilizar para preparar o inducir las APC y los CTL. Los exosomas y las APC de la presente invención también se pueden utilizar para inducir los CTL. Los péptidos, los polinucleótidos, los exosomas y las APC se pueden utilizar en combinación con cualesquiera otros compuestos, siempre y cuando los compuestos no inhiban su inducibilidad de CTL. De esta forma, cualesquiera de las sustancias o composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente de la presente invención se pueden utilizar para inducir los CTL, y además de los mismos, también se pueden utilizar aquellas que incluyen los péptidos y polinucleótidos para inducir las APC como se explicará más adelante.

(1) Método para inducir células que presentan antígenos (APC)

La presente invención proporciona métodos para inducir las APC con alta inducibilidad de CTL utilizando los péptidos o los polinucleótidos de la presente invención.

Los métodos de la presente invención incluyen la etapa de poner en contacto las APC con los péptidos de la presente invención in vitro, ex vivo o in vivo. Por ejemplo, el método de poner en contacto las APC con los péptidos ex vivo puede incluir las etapas de:

a: recolectar las APC provenientes de un sujeto; y

b: poner en contacto las APC de la etapa a con el péptido.

Las APC no se limitan a un tipo particular de células, e incluyen las DC, células de Langerhans, macrófagos, células B y células T activadas, que se sabe que presentan antígenos proteínicos sobre su superficie celular para que sean reconocidos por los linfocitos. De preferencia, se pueden utilizar las DC, ya que tienen la inducibilidad de CTL más fuerte entre las APC. Cualquiera de los péptidos de la presente invención se puede utilizar por sí mismos o con otros péptidos de la presente invención.

Por otro lado, cuando los péptidos de la presente invención se administran a un sujeto, las APC se ponen en contacto con los péptidos in vivo; por consiguiente, las APC con alta inducibilidad de CTL son inducidas en el cuerpo del sujeto.

De esta forma, la presente invención incluye administrar los péptidos de la presente invención a un sujeto. De manera similar, cuando los polinucleótidos de la presente invención se administran a un sujeto en una forma expresable, los péptidos de la presente invención se expresan y se ponen en contacto con las APC in vivo; por consiguiente, las APC con alta inducibilidad de CTL son inducidas en el cuerpo del sujeto. De esta forma, la presente invención también puede incluir administrar los polinucleótidos de la presente invención a un sujeto. La "forma expresable" se describió anteriormente en la sección "IX. Sustancias o composiciones farmacéuticas, (2) "Sustancias o composiciones farmacéuticas que contienen polinucleótidos como el ingrediente activo".

Además, la presente invención también incluye introducir el polinucleótido de la presente invención en una de las APC para inducir las APC con inducibilidad de CTL. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

a: recolectar las APC de un sujeto; y

b: introducir un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención.

La etapa b se puede realizar como se describió anteriormente en la sección "VI. Células que presentan antígenos".

Alternativamente, la presente invención proporciona un método para preparar una célula que presenta antígenos (APC), que induce específicamente una actividad CTL contra NEIL3, en el que el método puede incluir una de las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto una APC con un péptido de la presente invención in vitro, y
- 5 (b) introducir en una APC un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención.

(2) Método para inducir los CTL

Además, la presente invención proporciona métodos para inducir los CTL utilizando los péptidos, polinucleótidos, exosomas o las APC de la presente invención.

La presente invención también proporciona los métodos para inducir los CTL utilizando un polinucleótido que codifica un polipéptido que sea capaz de formar una subunidad del receptor de células T (TCR) que reconoce un complejo de los péptidos de la presente invención y los antígenos HLA. De preferencia, los métodos para inducir los CTL pueden incluir al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

- a) poner en contacto una célula T CD8 positiva con una célula que presenta antígenos y/o un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención; y
- 15 b) introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad del TCR que reconoce un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA en una célula CD8 positiva.

Cuando los péptidos, los polinucleótidos, las APC, o los exosomas de la presente invención se administran a un sujeto, los CTL son inducidos en el cuerpo del sujeto y se intensifica la resistencia de la respuesta inmunitaria dirigida a las células cancerosas. De esta forma, los métodos de la presente descripción incluyen la etapa de administrar los péptidos, los polinucleótidos, las APC o los exosomas de la presente invención a un sujeto.

Alternativamente, los CTL también se pueden inducir al utilizarlos ex vivo, y después de inducir los CTL, los CTL activados se pueden devolver al sujeto. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

- a: recolectar las APC de un sujeto;
- b: poner en contacto las APC de la etapa a con el péptido; y
- 25 c: co-cultivar las APC de la etapa b con las células CD8 positivas.

Las APC que se subcultivan con las células CD8 positivas en la etapa c anterior también se pueden preparar al transferir un gen que incluye un polinucleótido de la presente invención en las APC, como se describió anteriormente en la sección "VI. Células que presentan antígenos", aunque no se limitan a las mismas, y para el presente método se pueden utilizar cualesquiera de las APC que presentan efectivamente sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención.

En lugar de estas APC, también se pueden utilizar los exosomas, que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención. A saber, la presente invención puede incluir la etapa de cocultivar exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención. Estos exosomas se pueden preparar mediante los métodos descritos anteriormente en la sección "V. exosomas".

Además, el CTL se puede inducir al introducir un gen que incluye un polinucleótido que codifica la subunidad del TCR que se une al péptido de la presente invención en las células CD8 positivas. Esta transducción se puede realizar como se describió anteriormente en la sección "VIII. Receptor de células T (TCR)".

Además, la presente descripción proporciona un método o procedimiento para fabricar una sustancia o composición farmacéutica que induce los CTL, en el que el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

(3) Método para inducir una respuesta inmunitaria

Además, la presente invención proporciona métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra una enfermedad relacionada con NEIL3. Las enfermedades adecuadas pueden incluir cáncer, por ejemplo, de manera enunciativa, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML.

Los métodos pueden incluir la etapa de administrar la sustancia o sustancias o composición o composiciones que contengan cualquiera de los péptidos de la presente invención o los polinucleótidos que los codifican. El presente método inventivo también puede contemplar la administración de exosomas o las APC que presentan cualquiera de

los péptidos de la presente invención. Para detalles, véase el apartado de “IX. Sustancias o composiciones farmacéuticas”, en particular la parte que describe el uso de las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención como vacunas. Además, los exosomas y las APC que se pueden emplear para los métodos de la presente para inducir una respuesta inmunitaria se describen en detalle bajo los apartados de “V. exosomas”, “VI. Células que presentan antígenos (APC)”, y (1) y (2) de “X. Métodos para utilizar los péptidos, exosomas, las APC y los CTL”, más arriba.

5

La presente descripción también proporciona un método o procedimiento para la fabricación de una sustancia o composición farmacéutica que induzca una respuesta inmunitaria, en el que el método puede incluir la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

10 Alternativamente, el método de la presente descripción puede incluir la etapa de administrar una vacuna o una composición farmacéutica, que contiene:

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico que codifica un péptido como se expone en la presente en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; o
- 15 (d) una célula T citotóxica de la presente invención.

En la presente invención, un cáncer que sobre-expresa NEIL3 se puede tratar con estos ingredientes activos. El cáncer incluye, de manera enunciativa, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML. Por

20 consiguiente, antes de la administración de las vacunas o composiciones farmacéuticas que incluyen los ingredientes activos, se prefiere confirmar si el nivel de expresión de NEIL3 en las células o tejidos que serán tratados se mejora o no en comparación con las células normales del mismo órgano.

La presente descripción proporciona un método para tratar un cáncer que (sobre)expresa NEIL3, método el cual puede incluir las etapas de:

- 25 i) determinar el nivel de expresión de NEIL3 en las células o tejidos obtenidos de un sujeto con el cáncer que será tratado;
- ii) comparar el nivel de expresión de NEIL3 con un control normal; y
- iii) administrar al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en (a) hasta (d) descritos anteriormente a un sujeto con cáncer que sobre-expresa NEIL3 en comparación con un control normal.

30 Alternativamente, la presente descripción también proporciona una vacuna o composición farmacéutica que incluye al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en (a) hasta (d) descritos anteriormente, para utilizarse en la administración a un sujeto que tiene cáncer que sobre-expresa NEIL3.

La presente descripción proporciona además un método para identificar a un sujeto que será tratado con el polipéptido NEIL3 de la presente invención, método el cual puede incluir la etapa de determinar un nivel de expresión de NEIL3 en las células o tejidos derivados del sujeto, en el que un aumento del nivel en comparación con un nivel de control normal del gen indica que el sujeto puede tener cáncer que se puede tratar con el polipéptido NEIL3 de la presente invención. El método para tratar un cáncer de la presente descripción se describirá con mayor detalle más adelante.

35

En el contexto de la presente invención, un nivel de control determinado a partir de una muestra biológica que se sabe no será cancerosa se denomina como un “nivel de control normal”. Por otro lado, si el nivel de control se determina a partir de una muestra biológica cancerosa, se denomina como un “nivel de control canceroso”.

40

Un sujeto que será tratado por el método de la presente de preferencia es un mamífero. Los mamíferos ilustrativos incluyen, de manera enunciativa, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo, y una vaca.

45 De acuerdo con la presente invención, se puede determinar el nivel de expresión de NEIL3 en células o tejidos obtenidos de un sujeto. El nivel de expresión se puede determinar al nivel del producto de transcripción (ácido nucleico), utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARNm de NEIL3 se puede cuantificar utilizando sondas mediante métodos de hibridación (por ejemplo, hibridación Northern). La detección se puede llevar a cabo en una chip, una matriz o etc. El uso de una matriz puede ser preferible para detectar el nivel de expresión de NEIL3. Aquellos expertos en la técnica pueden preparar estas sondas utilizando la información de secuencias de NEIL3. Por ejemplo, el ADNc de NEIL3 se puede utilizar como las sondas. Si es necesario, las sondas se pueden marcar con un marcador adecuado, tal como tintes, sustancias fluorescentes e isótopos, y el nivel de expresión del gen se puede detectar como la intensidad de los marcadores hibridados.

50

Además, el producto de transcripción de NEIL3 (por ejemplo, SEC ID NO: 45) se puede cuantificar utilizando cebadores mediante métodos de detección a base de amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Estos cebadores se pueden preparar con base en la información de secuencias disponible del gen.

5 Específicamente, una sonda o cebador utilizados para el método de la presente se hibrida bajo condiciones rigurosas, moderadamente rigurosas, o poco rigurosas al ARNm de NEIL3. En el sentido en el que se utiliza en la presente, la frase "condiciones rigurosas (de hibridación)" se refiere a las condiciones bajo las cuales una sonda o cebador se hibridarán a su secuencia diana, aunque no a otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia, y serán diferentes bajo diferentes circunstancias. La hibridación específica de secuencias más largas se observa a mayores temperaturas que las secuencias más cortas. En general, la temperatura de una condición rigurosa se selecciona para que sea de aproximadamente 5°C menor que el punto de fusión térmico (T_m) para una secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, un pH y una concentración de ácido nucleico definidos) a la cual el 50% de las sondas complementarias a su secuencia diana se hibridan a la secuencia diana en equilibrio. Debido a que las secuencias diana están en general presentes en exceso, a una T_m, el 50% de las sondas se ocupan en equilibrio. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las cuales la concentración salina es menor que aproximadamente 1,0 M de ion sodio, típicamente aproximadamente 0,01 hasta 1,0 M de ion sodio (u otras sales) a pH de 7,0 hasta 8,3, y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para las sondas o cebadores cortos (por ejemplo, 10 hasta 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas o cebadores más largos. Las condiciones rigurosas también se pueden alcanzar con la adición de sustancias desestabilizantes, tales como formamida.

20 Alternativamente, para el diagnóstico de la presente descripción se puede detectar el producto de traducción. Por ejemplo, se puede determinar la cantidad de la proteína NEIL3 (SEC ID NO: 45) o el fragmento inmunológico de la misma. Los métodos para determinar la cantidad de proteína como el producto de traducción incluyen métodos de inmunoensayos que utilizan un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Además, para la detección se puede utilizar cualquier fragmento o modificación (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo, siempre y cuando el fragmento o anticuerpo modificado conserve la capacidad de unión a la proteína NEIL3. Por la presente invención también se proporcionan estos anticuerpos contra los péptidos de la presente invención y los fragmentos de los mismos. Son bien conocidos los métodos para preparar estos tipos de anticuerpos para la detección de proteínas, y se puede emplear cualquier método en la presente invención para preparar estos anticuerpos y los equivalentes de los mismos.

Como otro método para detectar el nivel de expresión del gen NEIL3 con base en su producto de traducción, la intensidad de tinción se puede medir vía análisis inmunohistoquímico utilizando un anticuerpo contra la proteína NEIL3. A saber, en esta medida, una tinción fuerte indica una presencia/nivel aumentado de la proteína y, al mismo tiempo, un alto nivel de expresión del gen NEIL3.

35 Se puede determinar que el nivel de expresión de un gen diana, por ejemplo el gen NEIL3, en células cancerosas está incrementado si el nivel aumenta a partir del nivel de control (por ejemplo, el nivel en células normales) del gen diana en, por ejemplo, el 10%, 25% o 50%, o aumenta hasta más de 1,1 veces, más de 1,5 veces, más de 2,0 veces, más de 5,0 veces, más de 10,0 veces, o más.

40 El nivel de control se puede determinar al mismo tiempo con las células cancerosas al utilizar una muestra o muestras recolectadas anteriormente y almacenadas de un sujeto o sujetos cuyo estado o estados mórbidos (cancerosos o no cancerosos) son conocidos. Además, las células normales obtenidas de regiones no cancerosas de un órgano que tiene el cáncer que será tratado se pueden utilizar como un control normal. Alternativamente, el nivel de control se puede determinar mediante un método estadístico en base a los resultados obtenidos analizando el nivel o niveles de expresión determinados anteriormente del gen NEIL3 en muestras provenientes de sujetos cuyos estados mórbidos son conocidos.

45 Además, el nivel control se puede derivar de una base de datos de patrones de expresión a partir de células ensayadas anteriormente. Además, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, el nivel de expresión del gen NEIL3 en una muestra biológica se puede comparar con múltiples niveles de control, que se determinan a partir de múltiples muestras de referencia. Se prefiere utilizar un nivel de control determinado a partir de una muestra de referencia derivada de un tipo de tejido similar al de la muestra biológica derivada de un sujeto. Además, se prefiere utilizar el valor estándar de los niveles de expresión del gen NEIL3 en una población con un estado mórbido conocido. El valor estándar se puede obtener mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, como valor estándar, se puede utilizar un intervalo de media +/- 2 S.D. o media +/- 3 S.D.

55 Cuando el nivel de expresión del gen NEIL3 se aumenta en comparación con el nivel de control normal, o es similar/equivalente al nivel control canceroso, al sujeto se le puede diagnosticar con el cáncer que será tratado.

Más específicamente, la presente descripción proporciona un método para (i) diagnosticar si un sujeto es sospechoso o no de tener un cáncer que será tratado y/o (ii) seleccionar a un sujeto para el tratamiento del cáncer, método el cual puede incluir las etapas de:

- a) determinar el nivel de expresión de NEIL3 en células o tejidos obtenidos a partir de un sujeto de quien se sospecha tiene el cáncer que será tratado;
- b) comparar el nivel de expresión de NEIL3 con un nivel de control normal;
- 5 c) diagnosticarle al sujeto que tiene el cáncer que será tratado, si el nivel de expresión de NEIL3 aumenta en comparación con el nivel de control normal; y
- d) seleccionar al sujeto para el tratamiento del cáncer, si al sujeto se le diagnostica que tiene el cáncer que será tratado, en la etapa c).

Alternativamente, este método puede incluir las etapas de:

- 10 a) determinar el nivel de expresión de NEIL3 en células o tejidos obtenidos a partir de un sujeto de quien se sospecha tiene el cáncer que será tratado;
- b) comparar el nivel de expresión de NEIL3 con un nivel de control canceroso;
- c) diagnosticarle al sujeto que tiene el cáncer que será tratado, si el nivel de expresión de NEIL3 es similar o equivalente al nivel de control canceroso; y
- 15 d) seleccionar al sujeto para el tratamiento del cáncer, si al sujeto se le diagnostica que tiene el cáncer que será tratado, en la etapa c).

La presente invención también proporciona un kit de diagnóstico para diagnosticar o determinar a un sujeto que tenga o sea sospechoso de padecer el cáncer que será tratado con el polipéptido NEIL3 de la presente invención, que también puede ser de utilidad en la evaluación y/o monitorización de la eficacia o aplicabilidad de una inmunoterapia del cáncer. De preferencia, el cáncer incluye, de manera enunciativa, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML. Más particularmente, el kit de preferencia puede incluir al menos un reactivo para detectar la expresión del gen NEIL3 en una célula derivada de un sujeto, reactivo el cual se puede seleccionar del grupo de:

- (a) un reactivo para detectar un ARNm del gen NEIL3;
- 25 (b) un reactivo para detectar la proteína NEIL3 o el fragmento inmunológico de la misma; y
- (c) un reactivo para detectar la actividad biológica de la proteína NEIL3.

Los reactivos adecuados para detectar un ARNm del gen NEIL3 pueden incluir ácidos nucleicos que se unen específicamente a o identifican el ARNm de NEIL3, tales como oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a una porción del ARNm de NEIL3. Estos tipos de oligonucleótidos se ejemplifican por cebadores y sondas que son específicos para el ARNm de NEIL3. Estos tipos de oligonucleótidos se pueden preparar con base en métodos bien conocidos en la técnica. Si es necesario, el reactivo para detectar el ARNm de NEIL3 puede estar inmovilizado en una matriz sólida. Además, en el kit se puede incluir más de un reactivo para detectar el ARNm de NEIL3.

Por otro lado, los reactivos adecuados para detectar la proteína NEIL3 o el fragmento inmunológico de la misma pueden incluir los anticuerpos para la proteína NEIL3 o el fragmento inmunológico de la misma. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Además, como reactivo, se puede utilizar cualquier fragmento o modificación (por ejemplo, anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo, siempre y cuando el fragmento o anticuerpo modificado conserve la capacidad de unión a la proteína NEIL3 o al fragmento inmunológico de la misma. Son bien conocidos en la técnica los métodos para preparar estos tipos de anticuerpos para la detección de proteínas, y se puede emplear cualquier método en la presente invención para preparar estos anticuerpos y equivalentes de los mismos. Además, el anticuerpo se puede marcar con moléculas generadoras de señal vía enlazamiento directo o una técnica de marcaje indirecto. Son bien conocidas en la técnica los marcadores y métodos para marcar anticuerpos y detectar la unión de los anticuerpos a sus dianas, y para la presente invención se pueden emplear cualesquiera marcadores y métodos. Además, en el kit se puede incluir más de un reactivo para detectar la proteína NEIL3.

El kit puede contener más de uno de los reactivos mencionados anteriormente. Por ejemplo, las muestras de tejido obtenidas de sujetos sin cáncer o que padecen cáncer, pueden servir como reactivos de control útiles. Un kit de la presente invención puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de envase (por ejemplo, escritos, tira, CD-ROM, etc.) con las instrucciones para utilizarse. Estos reactivos y etc. se pueden conservar en un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados pueden incluir botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

Según la presente descripción, cuando el reactivo es una sonda contra el ARNm de NEIL3, el reactivo puede estar inmovilizado en una matriz sólida, tal como una tira porosa, para formar al menos un sitio de detección. La región de medida o de detección de la tira porosa puede incluir una pluralidad de sitios, conteniendo cada uno un ácido nucleico (sonda). Una tira de ensayo también puede contener los sitios para controles negativos y/o positivos. Alternativamente, los sitios de control se pueden ubicar en una tira separada de la tira de ensayo.

Opcionalmente, los diferentes sitios de detección pueden contener diferentes cantidades de ácidos nucleicos inmovilizados, es decir, una mayor cantidad en el primer sitio de detección y cantidades menores en los sitios posteriores. Con la adición de una muestra de ensayo, el número de sitios que presentan una señal detectable proporciona una indicación cuantitativa de la cantidad del ARNm de NEIL3 presente en la muestra. Los sitios de detección se pueden configurar en cualquier forma detectable adecuada y típicamente están en la forma de una barra o punto que gira a lo ancho de la tira de ensayo.

El kit de la presente invención puede incluir además una muestra de control positivo o una muestra estándar de NEIL3. La muestra de control positivo de la presente invención se puede preparar recogiendo muestras positivas de NEIL3 y evaluando entonces sus niveles de NEIL3. Alternativamente, se puede añadir una proteína o polinucleótido NEIL3 purificado a células que no expresan NEIL3 para formar la muestra positiva o la muestra estándar de NEIL3. En la presente invención, NEIL3 purificada puede ser una proteína recombinante. El nivel de NEIL3 de la muestra de control positivo es, por ejemplo, mayor que el valor de corte.

En una realización, la presente invención proporciona además un kit de diagnóstico que incluye una proteína o una proteína parcial de la misma, capaces de reconocer específicamente al anticuerpo de la presente invención o el fragmento del mismo.

Los ejemplos del péptido parcial de la proteína de la presente invención incluyen polipéptidos que consisten en al menos 8, de preferencia 15, y de mayor preferencia 20 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la presente invención. El cáncer se puede diagnosticar al detectar un anticuerpo en una muestra (por ejemplo, sangre, tejido) utilizando una proteína o un péptido (polipéptido) de la presente invención. El método para preparar la proteína de la presente invención y péptidos es como se describe anteriormente.

El método de diagnóstico para cáncer se puede realizar al determinar la diferencia entre la cantidad del anticuerpo anti-NEIL3 y aquella en la muestra de control correspondiente como se describe anteriormente. Se sospecha que el sujeto estará padeciendo de cáncer si las células o tejidos del sujeto contienen los anticuerpos contra los productos de expresión (NEIL3) del gen, y se determina que la cantidad del anticuerpo anti-NEIL3 es mayor que el valor de corte, en nivel, en comparación con aquél en el control normal.

En otra realización, un kit de diagnóstico de la presente invención puede incluir el péptido de la presente invención y una molécula HLA que se une al mismo. Ya se ha establecido el método para detectar los CTL específicos del antígeno utilizando péptidos antigénicos y moléculas HLA (por ejemplo, Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6). De esta forma, el complejo del péptido de la presente invención y la molécula de HLA se pueden aplicar al método de detección para detectar los CTL específicos del antígeno tumoral, permitiendo con esto una detección más temprana, recurrencia y/o metástasis del cáncer. Además, se puede emplear para la selección de sujetos aplicables con las sustancias farmacéuticas que incluyen el péptido de la presente invención como ingrediente activo, o la evaluación del efecto de tratamiento de las sustancias farmacéuticas.

En particular, de acuerdo con el método conocido (véase, por ejemplo, Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6), se puede preparar el complejo oligomérico, tal como tetrámero, de la molécula de HLA radiomarcada y el péptido de la presente invención. Con la utilización del complejo, el diagnóstico se puede realizar, por ejemplo, cuantificando los CTL específicos del péptido antigénico en los linfocitos de sangre periférica derivados del sujeto que se sospecha está padeciendo de cáncer.

La presente descripción proporciona además un método o agentes de diagnóstico para evaluar la respuesta inmunológica de un sujeto al utilizar epítopos peptídicos como se describe en la presente. Según la descripción, los péptidos restringidos por HLA se pueden utilizar como reactivos como se describe en la presente para evaluar o predecir una respuesta inmunitaria de un sujeto. La respuesta inmunitaria que será evaluada se puede inducir al poner en contacto un inmunógeno con células inmunocompetentes in vitro o in vivo. Como reactivo, se pueden emplear cualesquiera sustancias o composiciones que pueden dar por resultado la producción de los CTL específicos del antígeno que reconocen y se unen al epítipo o epítopos peptídicos. Como inmunógeno, puede no ser necesario utilizar los reactivos peptídicos. Los sistemas de análisis que se utilizan para estos análisis incluyen desarrollos técnicos relativamente recientes, tales como tetrámeros, tinción para linfocinas intracelulares y ensayos de liberación de interferón, o ensayos ELISPOT. En una realización preferida, las células inmuno-competentes que estarán en contacto con el reactivo peptídico pueden ser células que presentan antígenos entre las que se incluyen células dendríticas.

Por ejemplo, los péptidos de la presente invención se pueden utilizar en ensayos de tinción de tetrámeros para evaluar células mononucleares de sangre periférica en busca de la presencia de los CTL específicos del antígeno después de la exposición a un antígeno de células tumorales o un inmunógeno. El complejo tetramérico de HLA se

puede utilizar para visualizar directamente los CTL específicos del antígeno (véanse, por ejemplo, Ogg et al., Science 279: 2103-2106, 1998; y Altman et al, Science 174: 94-96, 1996) y determinar la frecuencia de la población de los CTL específicos del antígeno en una muestra de células mononucleares de sangre periférica. Como se describirá más adelante, se puede generar un reactivo tetramérico utilizando un péptido de la invención.

- 5 Un péptido que se une a una molécula de HLA se repliega en presencia de la cadena pesada de HLA correspondiente y la beta 2-microglobulina para generar un complejo trimolecular. En el complejo, el carboxilo terminal de la cadena pesada se biotinila en un sitio que se diseñó por ingeniería anteriormente en la proteína. Luego, se añade estreptavidina al complejo para formar un tetrámero que consiste en el complejo trimolecular y estreptavidina. Por medio de estreptavidina marcada fluorescentemente, el tetrámero se puede utilizar para teñir las
10 células específicas del antígeno. Las células se pueden identificar entonces, por ejemplo, mediante citometría de flujo. Este análisis se puede utilizar para fines de diagnóstico o pronóstico. Para fines terapéuticos, también se pueden utilizar las células identificadas por el procedimiento.

- La presente invención también proporciona reactivos para evaluar las respuestas de memoria inmunitaria (véase, por ejemplo, Bertoni et al, J. Clin. Invest. 100: 503-513, 1997 y Penna et al., J Exp. Med. 174: 1565-1570, 1991), que incluyen péptidos de la presente invención. Por ejemplo, muestras PBMC de un paciente proveniente de individuos con un cáncer que será tratado se pueden analizar en busca de la presencia de los CTL específicos del antígeno utilizando péptidos específicos. Una muestra de sangre que contiene células mononucleares se puede evaluar al cultivar los PBMC y estimular las células con un péptido de la invención. Después de un periodo adecuado de cultivo, la población expandida de células se puede analizar, por ejemplo, en busca de la actividad de CTL.

- 20 Los péptidos también se pueden utilizar como reactivos para evaluar la eficacia de una vacuna. Las PBMC obtenidas de un paciente vacunado con un inmunógeno se pueden analizar utilizando, por ejemplo, cualquiera de los métodos descritos anteriormente. El paciente es tipado para HLA, y se seleccionan para el análisis los reactivos de epítomos peptídicos que reconocen las moléculas específicas del alelo presentes en el paciente. La inmunogenicidad de la vacuna se puede indicar por la presencia de los CTL específicos del epítipo en la muestra de PBMC. Los péptidos de la invención también se pueden utilizar para producir anticuerpos utilizando técnicas bien conocidas la técnica (véase, por ejemplo, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; y Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), que pueden ser de utilidad como reactivos para diagnosticar, detectar o monitorizar cáncer. Estos anticuerpos pueden incluir aquellos que reconocen un péptido en el contexto de una molécula de HLA, es decir, los anticuerpos que se unen a un complejo de péptido-MHC.

- Alternativamente, la descripción también proporciona varios usos, algunos de los cuales se describen en la presente. Por ejemplo, la presente descripción proporciona un método para diagnosticar o detectar un trastorno caracterizado por la expresión de un polipéptido inmunogénico NEIL3. Estos métodos implican determinar la expresión de un péptido de unión a HLA de NEIL3, o un complejo de unión a HLA de NEIL3 y una molécula de HLA clase I en una muestra biológica. La expresión de un péptido o complejo de péptido y molécula de HLA clase I se puede determinar o detectar mediante el ensayo con una pareja de unión para el péptido o complejo. Una pareja de unión para el péptido o complejo puede ser un anticuerpo que reconozca y se una específicamente al péptido. La expresión de NEIL3 en una muestra biológica, tal como una biopsia tumoral, también se puede probar mediante protocolos de amplificación por PCR estándar utilizando cebadores de NEIL3. Un ejemplo de la expresión tumoral se presenta en la presente, y la exposición adicional de las condiciones ilustrativas y cebadores para la amplificación de NEIL3 se puede encontrar en el documento WO2003/27322.

- De preferencia, los métodos de diagnóstico implican poner en contacto una muestra biológica aislada de un sujeto con un agente específico para el péptido de unión a HLA de NEIL3 para detectar la presencia del péptido de unión a HLA de NEIL3 en la muestra biológica. En el sentido en el que se utiliza en la presente, "poner en contacto" significa colocar la muestra biológica a suficiente proximidad con el agente y bajo las condiciones adecuadas de, por ejemplo, concentración, temperatura, tiempo, fuerza iónica, para permitir la interacción específica entre el agente y el péptido de unión a HLA de NEIL3 que están presentes en la muestra biológica. En general, las condiciones para poner en contacto el agente con la muestra biológica son condiciones conocidas por aquellos con experiencia normal en la técnica para facilitar una interacción específica entre una molécula y su cognado (por ejemplo, una proteína y su cognado receptor, un anticuerpo y su cognado de antígeno proteico, un ácido nucleico y su cognado de secuencia complementaria) en una muestra biológica. Las condiciones ilustrativas para facilitar una interacción específica entre una molécula y su cognado se describen en la patente U.S. No. 5.108.921, otorgada a Low et al.

- El método de diagnóstico de la presente descripción se puede realizar tanto in vivo como in vitro. Por consiguiente, la muestra biológica se puede localizar in vivo o in vitro en la presente descripción. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser un tejido in vivo, y el agente específico para el polipéptido inmunogénico NEIL3 se puede utilizar para detectar la presencia de estas moléculas en el tejido. Alternativamente, la muestra biológica se puede recolectar o aislar in vitro (por ejemplo, una muestra de sangre, biopsia de tumores, extracto de tejidos). La muestra biológica puede ser una muestra que contenga células, de mayor preferencia una muestra que contenga células tumorales recolectadas de un sujeto que será diagnosticado o tratado.

Alternativamente, el diagnóstico se puede realizar mediante un método que permita la cuantificación directa de las células T específicas del antígeno mediante tinción con complejos multiméricos de HLA marcados con fluoresceína (por ejemplo, Altman, J. D. et al., 1996, Science 274: 94; Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10330). También se ha proporcionado la tinción para linfocinas intracelulares, y los ensayos de liberación de interferón-gamma o ensayos ELISPOT. La tinción multimérica, la tinción para linfocinas intracelulares y los ensayos ELISPOT todos parecen ser al menos 10 veces más sensibles que los ensayos más convencionales (Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8: 413). También se pueden utilizar pentámeros (por ejemplo, documento US 2004-209295A), dextrámeros (por ejemplo, documento WO 02/072631), y estreptámeros (por ejemplo, Nature medicine 6. 631-637 (2002)).

10 XI. Anticuerpos

La presente invención proporciona además anticuerpos que se unen al péptido de la presente invención. Los anticuerpos preferidos específicamente se unen al péptido de la presente invención y no se unirán (o se unirán débilmente) a los que no son péptidos de la presente invención. Alternativamente, los anticuerpos se unen al péptido de la invención, así como también a los homólogos de los mismos. Los anticuerpos contra el péptido de la invención pueden ser de utilidad en análisis de diagnóstico y pronóstico de cáncer, y metodologías para formación de imágenes. De manera similar, estos anticuerpos pueden ser de utilidad en el tratamiento, diagnóstico y/o pronóstico de otros cánceres, hasta el grado en que NEIL3 también se expresa o sobre-expresa en el paciente con cáncer. Además, los anticuerpos expresados intracelularmente (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios) pueden ser de utilidad terapéuticamente en el tratamiento de cánceres en los que está implicada la expresión de NEIL3, tales como, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML.

La presente descripción también proporciona diversos ensayos inmunológicos para la detección y/o cuantificación de proteína NEIL3 (SEC ID NO: 45) o los fragmentos de la misma, incluyendo el polipéptido que consiste en las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43. Estos análisis pueden incluir uno o más anticuerpos anti-NEIL3 capaces de reconocer y unirse a una proteína NEIL3 o los fragmentos de la misma, según sea adecuado. En la presente invención, los anticuerpos anti-NEIL3 que se unen al polipéptido NEIL3 de preferencia reconocen el polipéptido que consiste en las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43. Una especificidad de unión del anticuerpo se puede confirmar con un ensayo de inhibición. Es decir, cuando la unión entre un anticuerpo que se analizará y la longitud completa del polipéptido NEIL3 se inhibe en la presencia de cualesquiera fragmentos polipeptídicos que consisten en la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43, se muestra que este anticuerpo se une específicamente al fragmento. En la presente invención, estos ensayos inmunológicos se realizan dentro de diversos formatos de ensayos inmunológicos bien conocidos en la técnica, incluyendo de manera enunciativa: diversos tipos de radioinmunoensayos, técnica de inmunocromatografía, ensayos inmunosorbentes enlazados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes enlazados a enzimas (ELIFA), y similares.

Los ensayos inmunológicos pero no de anticuerpos relacionados de la descripción también pueden incluir ensayos de inmunogenicidad de células T (inhibidores o estimuladores), así como también ensayos de unión a MHC. Además, también se proporcionan por la invención los métodos para formación de imágenes inmunológicas capaces de detectar cánceres que expresan NEIL3, incluyendo, de manera enunciativa, métodos para formación de imágenes radioescintigráficas utilizando los anticuerpos marcados de la presente invención. Estos ensayos pueden ser de utilidad clínica en la detección, monitorización y pronóstico de cánceres que expresan NEIL3 tales como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML.

La presente invención también proporciona un anticuerpo que se une al péptido de la invención. El anticuerpo de la invención se puede utilizar de cualquier forma, tales como los anticuerpos monoclonales o policlonales, e incluyen antisuero obtenido al inmunizar un animal, tal como un conejo, con el péptido de la invención, todas las clases de anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados producidos mediante recombinación genética.

Un péptido de la invención utilizado como un antígeno para obtener un anticuerpo se puede derivar de cualquier especie animal, aunque de preferencia se deriva de un mamífero tal como un ser humano, ratón o rata, de mayor preferencia de un ser humano. Un péptido derivado de un ser humano se puede obtener de las secuencias nucleotídicas o aminoácidos expuestas en la presente.

De acuerdo con la presente invención, el péptido que se utilizará como un antígeno de inmunización puede ser una proteína completa o un péptido parcial de la proteína. Un péptido parcial puede incluir, por ejemplo, el fragmento amino (N)-terminal o carboxi (C)-terminal de un péptido de la presente invención.

En la presente, un anticuerpo se define como una proteína que reacciona con la longitud completa o un fragmento de un péptido NEIL3. En una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención puede reconocer los fragmentos peptídicos de NEIL3 que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43. Los métodos para sintetizar oligopéptidos son bien conocidos en las técnicas. Después de la síntesis, los péptidos se pueden purificar opcionalmente antes de utilizarse como inmunógeno. En la presente invención, el oligopéptido (por ejemplo, 9- o 10 mero) se puede conjugar o enlazar con portadores para intensificar la inmunogenicidad. Es bien conocida como el portador la hemocianina de lapa californiana (KLH). También es bien conocido en la técnica el método para conjugar la KLH y el péptido.

Alternativamente, un gen que codifica un péptido de la invención o un fragmento del mismo se puede insertar en un vector de expresión conocido, que luego se utiliza para transformar una célula hospedante como se describe en la presente. El péptido deseado o fragmento del mismo se puede recuperar desde el exterior o interior de las células hospedantes mediante cualquier método estándar, y posteriormente se puede utilizar como un antígeno. Alternativamente, como el antígeno, se pueden utilizar células completas que expresan el péptido o sus lisados o un péptido sintetizado químicamente.

Cualquier animal mamífero se puede inmunizar con el antígeno, aunque de preferencia se toma en cuenta la compatibilidad con las células parentales utilizadas para la fusión celular. En general, se pueden utilizar animales de Rodentia, Lagomorpha o primates. Los animales de Rodentia incluyen, por ejemplo, ratones, ratas y hámsters. Los animales de Lagomorpha incluyen, por ejemplo, conejos. Los animales de primates incluyen, por ejemplo, un mono de Catarrhini (mono del viejo continente), tal como *Macaca fascicularis*, mono rhesus, babuino sagrado y chimpancés.

Los métodos para inmunizar animales con antígenos son conocidos en la técnica. La inyección intraperitoneal o la inyección subcutánea de antígenos es un método estándar para la inmunización de los mamíferos. Más específicamente, los antígenos se pueden diluir y suspender en una cantidad adecuada de disolución salina amortiguada con fosfato (PBS), disolución salina fisiológica, etc. Si se desea, la suspensión del antígeno se puede mezclar con una cantidad adecuada de un adyuvante estándar, tal como adyuvante completo de Freund, se puede convertir en una emulsión y después se puede administrar a animales mamíferos. De preferencia, es seguido de diversas administraciones del antígeno mezclado con una cantidad adecuada del adyuvante incompleto de Freund cada 4 hasta 21 días. Para la inmunización también se puede utilizar un portador adecuado. Después de la inmunización como antes, el suero se puede examinar mediante un método estándar en busca de un aumento en la cantidad de anticuerpos deseados.

Los anticuerpos policlonales contra los péptidos de la presente invención se pueden preparar recolectando sangre del mamífero inmunizado examinado en busca del incremento de los anticuerpos deseados en el suero, y separando suero de la sangre mediante cualquier método convencional. Los anticuerpos policlonales incluyen suero que contiene los anticuerpos policlonales, así como también se puede aislar del suero la fracción que contiene los anticuerpos policlonales. La inmunoglobulina G o M se puede preparar a partir de una fracción que reconoce sólo el péptido de la presente invención, utilizando, por ejemplo, una columna de afinidad acoplada con el péptido de la presente invención, y purificando adicionalmente esta fracción utilizando una columna de proteína A o de proteína G.

Para preparar los anticuerpos monoclonales, se recolectan células inmunitarias provenientes del mamífero inmunizado con el antígeno, y se verifican en busca del nivel aumentado de los anticuerpos deseados en el suero como se describió anteriormente, y se someten a fusión celular. Las células inmunitarias utilizadas para la fusión celular de preferencia se pueden obtener del bazo. Otras células parentales preferidas que se fusionarán con el inmunocito anterior incluyen, por ejemplo, células de mieloma de los mamíferos, y de mayor preferencia células de mieloma que tengan una propiedad adquirida para la selección de células fusionadas mediante fármacos.

El inmunocito anterior y las células de mieloma se pueden fusionar de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo el método de Milstein et al. (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).

Los hibridomas resultantes obtenidos por la fusión celular se pueden seleccionar al cultivarlos en un medio de selección estándar, tal como medio HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo celular típicamente se continúa en el medio HAT durante varios días hasta varias semanas, siendo el tiempo suficiente para permitir que mueran las otras células, con excepción del hibridoma deseado (las células no fusionadas). Luego, se puede realizar la dilución limitante estándar para seleccionar y clonar una célula de hibridoma que produzca el anticuerpo deseado.

Además del método anterior, en el cual se inmuniza un animal no humano con un antígeno para preparar el hibridoma, los linfocitos humanos, tales como aquellos infectados por el virus de EB, se pueden inmunizar con un péptido, células que expresen el péptido, o sus lisados, in vitro. Luego, los linfocitos inmunizados se fusionan con las células de mieloma derivadas de ser humano que son capaces de dividirse indefinidamente, tales como U266, para proporcionar un hibridoma que produce un anticuerpo humano deseado que es capaz de unirse al péptido (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar No. Sho 63-17688).

Los hibridomas obtenidos posteriormente se trasplantan en la cavidad abdominal de un ratón, y se extraen los fluidos ascíticos. Los anticuerpos monoclonales obtenidos se pueden purificar, mediante, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, una columna de proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico con DEAE, o una columna de afinidad a la cual se acopla el péptido de la presente invención. El anticuerpo de la presente invención se puede utilizar no sólo para la purificación y detección del péptido de la presente invención, sino también como un candidato para los agonistas y antagonistas del péptido de la presente invención.

Alternativamente, una célula inmunitaria, tal como un linfocito inmunizado, que produce anticuerpos se puede immortalizar mediante un oncogén y se puede utilizar para preparar los anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos de esta forma también se pueden preparar recombinantemente utilizando técnicas de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck y Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1990)). Por ejemplo, un ADN que codifica un anticuerpo se puede clonar a partir de una célula inmunitaria, tal como un hibridoma o un linfocito inmunizado que produce el anticuerpo, se puede insertar en un vector adecuado, y se puede introducir en células hospedantes para preparar un anticuerpo recombinante. La presente descripción también proporciona anticuerpos recombinantes preparados como se describió anteriormente.

Además, un anticuerpo de la presente invención puede ser un fragmento de un anticuerpo o anticuerpo modificado, siempre y cuando se una a uno o más de los péptidos de la invención. Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo puede ser Fab, F(ab')₂, Fv o Fv monocatenario (scFv), en el cual los fragmentos Fv de las cadenas H y L se ligan mediante un enlazador adecuado apropiado (Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-83 (1988)). Más específicamente, un fragmento de anticuerpo se puede generar al tratar un anticuerpo con una enzima, tal como papaína o pepsina. Alternativamente, un gen que codifica el fragmento de anticuerpo se puede construir, insertar en un vector de expresión y expresar en una célula hospedante adecuada (véanse, por ejemplo Co et al., *J Immunol* 152: 2968-76 (1994); Better y Horwitz, *Methods Enzymol* 178: 476-96 (1989); Pluckthun y Skerra, *Methods Enzymol* 178: 497-515 (1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., *Methods Enzymol* 121: 663-9 (1986); Bird y Walker, *Trends Biotechnol* 9: 132-7 (1991)).

Un anticuerpo se puede modificar mediante la conjugación con una variedad de moléculas, tal como polietilenglicol (PEG). La presente descripción proporciona estos anticuerpos modificados. El anticuerpo modificado se puede obtener al modificar químicamente un anticuerpo. Estos métodos de modificación son convencionales en el campo.

Alternativamente, un anticuerpo de la presente invención se puede obtener como un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de un anticuerpo no humano y la región constante derivada del anticuerpo humano, o como un anticuerpo humanizado, que incluye la región de determinante de la complementariedad (CDR) derivada del anticuerpo no humano, la región de estructura (FR) y la región constante derivada del anticuerpo humano. Estos anticuerpos se pueden preparar de acuerdo con una tecnología conocida. La humanización se puede realizar al sustituir las CDR de roedor o las secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo Verhoeven et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)). Por consiguiente, estos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

También se pueden utilizar anticuerpos totalmente humanos, que incluyen regiones variables humanas además de las región de estructura y región constante humanas. Estos anticuerpos se pueden producir utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los métodos *in vitro* implican el uso de bibliotecas recombinantes de fragmentos de anticuerpos humanos presentados en bacteriófagos (por ejemplo, Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991)). De manera similar, los anticuerpos humanos se pueden obtener al introducir un locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo ratones en los cuales se hayan inactivado parcial o completamente los genes de inmunoglobulina endógenos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. Nos. 6.150.584, 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016.

Los anticuerpos obtenidos como en lo anterior se pueden purificar hasta homogeneidad. Por ejemplo, la separación y purificación del anticuerpo se puede realizar de acuerdo con los métodos de separación y purificación utilizados para proteínas generales. Por ejemplo, el anticuerpo se puede separar y aislar mediante el uso seleccionado y combinado adecuadamente de cromatografías en columna, tales como cromatografía de afinidad, filtro, ultrafiltración, desalación, diálisis, electroforesis en gel de poliácridamida con SDS, y enfoque isoeléctrico (*Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), aunque no se limitan a los mismos. Como columna de afinidad, se pueden utilizar una columna de proteína A y una columna de proteína G. Las columnas de proteína A ilustrativas que se utilizarán incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharosa F.F. (Farmacia).

Una cromatografía ilustrativa, con la excepción de la afinidad, incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción, y similar (*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Los procedimientos cromatográficos se pueden llevar a cabo mediante cromatografía en fase líquida, tal como HPLC y FPLC.

Por ejemplo, se puede utilizar la medida de la absorbancia, el ensayo inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA), el inmunoensayo enzimático (EIA), el radioinmunoensayo (RIA) y/o la inmunofluorescencia para medir la actividad de unión a antígenos del anticuerpo de la invención. En ELISA, el anticuerpo de la presente invención se inmoviliza sobre una placa, un péptido de la invención se aplica a la placa, y luego se aplica una muestra que contenga un anticuerpo deseado, tal como un sobrenadante de cultivo de las células productoras de anticuerpos o de anticuerpos purificados. Luego, se aplica un anticuerpo secundario que reconozca el anticuerpo primario y se marca con la enzima, tal como, con fosfato alcalino, y la placa se incuba. A continuación, después de lavar, se añade a la placa un sustrato enzimático, tal como fosfato de p-nitrofenilo, y se mide la absorbancia para evaluar la actividad de unión a antígenos de la muestra. Un fragmento del péptido, tal como un fragmento C-terminal o N-terminal, se puede utilizar como el antígeno para evaluar la actividad de unión del anticuerpo. BIAcore (Pharmacia) se puede utilizar para evaluar la actividad del anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

Los métodos anteriores permiten la detección o medida del péptido de la invención al exponer el anticuerpo de la invención a una muestra que se supone que contiene el péptido de la invención, y detectar o medir el complejo inmunitario formado por el anticuerpo y el péptido.

Debido a que el método de detección o de medida del péptido de acuerdo con la invención puede detectar o medir específicamente un péptido, el método puede ser de utilidad en una variedad de experimentos en los cuales se utiliza el péptido.

XII. Vectores y células hospedantes

La presente invención también proporciona un vector y una célula hospedante en la cual se introduce un nucleótido que codifica el péptido de la presente invención. Un vector de la presente invención puede ser de utilidad para mantener un nucleótido, en especial un ADN, de la presente invención en una célula hospedante, para expresar péptido de la presente invención, o para administrar el nucleótido de la presente invención para terapia génica.

Cuando E. coli es una célula hospedante y el vector se amplifica y se produce en una gran cantidad en E. coli (por ejemplo, JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1Blue), el vector debe tener "ori" para ser amplificado en E. coli y un gen marcador para seleccionar E. coli transformada (por ejemplo, un gen con resistencia a fármacos seleccionado por un fármaco tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloramfenicol o similar). Por ejemplo, se pueden utilizar vectores de la serie M13, vectores de la serie pUC, pBR322, pBluescript, PCR-Script, etc. Además, para subclonar y extraer ADNc también se pueden utilizar pGEM-T, pDIRECT y pT7, así como también los vectores descritos anteriormente. Cuando se utiliza un vector para producir la proteína de la presente invención, puede ser de utilidad un vector de expresión. Por ejemplo, un vector de expresión que se expresará en E. coli debe tener las características anteriores para que se amplifique en E. coli. Cuando E. coli, tal como JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1Blue, se utiliza como una célula hospedante, el vector debe tener un promotor, por ejemplo el promotor lacZ (Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), promotor araB (Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)), el promotor T7 o similar, que pueden expresar eficientemente el gen deseado en E. coli. Con respecto a esto, se pueden utilizar, por ejemplo, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen), pEGFP y PET (en este caso, el hospedante de preferencia es BL21 que expresa la T7 ARN polimerasa), en lugar de los vectores anteriores. Adicionalmente, el vector también puede contener una secuencia señal para la secreción de péptidos. Una secuencia señal ilustrativa que dirige el péptido a segregarse al periplasma de la E. coli es la secuencia de señal pelB (Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987)). Los medios para introducir los vectores en las células hospedantes diana incluyen, por ejemplo, el método de cloruro de calcio, y el método de electroporación.

Además de E. coli, por ejemplo, para producir el polipéptido de la presente invención se pueden utilizar vectores de expresión derivados de mamíferos (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen) y pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8), los vectores de expresión derivados de células de insectos (por ejemplo, "el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-BAC" (GIBCO BRL), pBacPAK8), los vectores de expresión derivados de plantas (por ejemplo, pMH1, pMH2), los vectores de expresión derivados de virus de animales (por ejemplo, pHSV, pMV, pAdexLcw), los vectores de expresión derivados de retrovirus (por ejemplo, pZlpneo), el vector de expresión derivado de levadura (por ejemplo, "el kit de expresión de Pichia" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01) y los vectores de expresión derivados de Bacillus subtilis (por ejemplo, pPL608, pKTH50).

Para expresar el vector en células animales, tales como células CHO, COS o células NIH3T3, el vector debe tener un promotor necesario para la expresión en estas células, por ejemplo el promotor SV40 (Mulligan et al., Nature 277: 108 (1979)), el promotor MMLV-LTR, el promotor EF1 alfa (Mizushima et al., Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990)), el promotor CMV y similar, y de preferencia un gen marcador para seleccionar transformantes (por ejemplo, un gen con resistencia a fármacos seleccionado por un fármaco (por ejemplo, neomicina, G418)). Los ejemplos de vectores conocidos con estas características incluyen, por ejemplo pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

XIII. Un método para diagnosticar cáncer:

La presente descripción también proporciona un método para diagnosticar cáncer. Se encontró que la expresión de NEIL3 está específicamente elevada en diversos tipos de células cancerosas (Tabla 1 y Fig. 5). Por lo tanto, los genes identificados en la presente así como también sus productos de transcripción y traducción son de utilidad para

diagnóstico como marcadores para cáncer, y al medir la expresión de NEIL3 en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra celular), se puede diagnosticar el cáncer. Específicamente, la presente descripción proporciona un método para diagnosticar cáncer al determinar el nivel de expresión de NEIL3 en el sujeto. Los cánceres que se pueden diagnosticar por el método de la presente incluyen, de manera enunciativa, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML. Además, NSCLC, incluido el adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de célula escamosa pulmonar (SCC), también se puede diagnosticar o detectar mediante la presente invención.

Se puede proporcionar un resultado intermedio para examinar la condición del sujeto. Este resultado intermedio se puede combinar con información adicional para ayudar a un doctor, enfermera u otro personal sanitario a diagnosticar que un sujeto padece la enfermedad. Alternativamente, la presente descripción se puede utilizar para detectar células cancerosas en un tejido derivado de un sujeto, y proporcionar a un doctor la información útil para diagnosticar que el sujeto padece la enfermedad.

Específicamente, la presente descripción proporciona los siguientes métodos [1] hasta [10]:

- 15 [1] Un método para diagnosticar cáncer, incluyendo dicho método las etapas de:
- (a) detectar el nivel de expresión del gen que codifica la secuencia de aminoácidos de NEIL3 en una muestra biológica; y
 - (b) correlacionar un aumento en el nivel de expresión detectado en comparación con un nivel de control normal del gen con la presencia de la enfermedad.
- 20 [2] El método de [1], en el que el nivel de expresión es al menos 10% mayor que el nivel de control normal.
- [3] El método de [1], en el que el nivel de expresión se detecta mediante un método seleccionado de entre:
- (a) detectar un ARNm que incluye la secuencia de NEIL3,
 - (b) detectar una proteína que incluye la secuencia de aminoácidos de NEIL3, y
 - (c) detectar una actividad biológica de una proteína que incluye la secuencia de aminoácidos de NEIL3.
- 25 [4] El método de [1], en el que el cáncer se selecciona del grupo de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML.
- 30 [5] El método de [3], en el que el nivel de expresión se determina al detectar la hibridación de una sonda a un transcrito génico del gen.
- [6] El método de [3], en el que el nivel de expresión se determina detectando la unión de un anticuerpo contra la proteína codificada por un gen como el nivel de expresión del gen.
- [7] El método de [1], en el que la muestra biológica incluye biopsia, esputo, sangre, efusión pleural u orina.
- 35 [8] El método de [1], en el que la muestra biológica derivada de un sujeto incluye una célula epitelial.
- [9] El método de [1], en el que la muestra biológica derivada de un sujeto incluye una célula cancerosa.
- [10] El método de [1], en el que la muestra biológica derivada de un sujeto incluye una célula epitelial cancerosa.

Alternativamente, la presente descripción proporciona un método para detectar o identificar células cancerosas en una muestra de tejido derivada de un sujeto, incluyendo dicho método la etapa de determinar el nivel de expresión del gen NEIL3 en una muestra biológica derivada de un sujeto, en el que un aumento en el nivel de expresión en comparación con un nivel de control normal de dicho gen indica la presencia o sospecha de células cancerosas en el tejido.

Este resultado se puede combinar con información adicional para ayudar a un doctor, enfermera u otro personal sanitario a diagnosticar a un sujeto que sufre la enfermedad. En otras palabras, la presente descripción puede proporcionar a un doctor información útil para diagnosticar a un sujeto que sufre la enfermedad. Por ejemplo, de acuerdo con la presente descripción, cuando existe duda con respecto a la presencia de células cancerosas en el tejido obtenido de un sujeto, las decisiones clínicas se pueden alcanzar al considerar el nivel de expresión del gen NEIL3, más un aspecto diferente de la enfermedad que incluye la patología de tejidos, los niveles de marcadores tumorales conocidos en sangre, y el curso clínico del sujeto, etc.

Por ejemplo, algunos marcadores de diagnóstico bien conocidos de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML en sangre son como sigue:

- 5 cáncer de vejiga; SCC, TPA, o IAP
- cáncer de mama; BCA225, TPA, CEA, IAP, o CA15-3
- cáncer cervical; SCC, TPA, o CA125
- carcinoma colangiocelular; CA19-9, o CEA
- cáncer colorrectal; CEA
- 10 endometriosis; CA125
- cáncer esofágico; CEA, DUPAN-2, IAP, NSE, SCC, SLX, o Span-1
- cáncer hepático; AFP, o ICDH
- NSCLC; CEA
- osteosarcoma; ALP
- 15 cáncer pancreático; BFP, CA19-9, CA125, o CEA
- cáncer de próstata; PSA, o PAP
- carcinoma de células renales; IAP
- SCLC; ProGRP o NSE
- AML; actividad de TK
- 20 CML; actividad de TK

El resultado del análisis de expresión génica sirve como un resultado intermedio para un diagnóstico adicional de un estado de enfermedad del sujeto.

- 25 También se proporciona un método para detectar un marcador de diagnóstico del cáncer, incluyendo dicho método la etapa de detectar la expresión del gen NEIL3 en una muestra biológica derivada de un sujeto como un marcador de diagnóstico de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer esofágico, cáncer hepático, NSCLC, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer prostático, carcinoma renal, SCLC, tumor de tejido blando, AML y CML, aunque no se limita a los mismos.

El método para diagnosticar cáncer se describirá con mayor detalle más adelante.

Un sujeto que será diagnosticado por el método de la presente de preferencia es un mamífero.

- 30 Los mamíferos ilustrativos incluyen, de manera enunciativa, por ejemplo un ser humano, un primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo y vaca.

- 35 Para realizar el diagnóstico se prefiere recolectar una muestra biológica del sujeto que será diagnosticado. Cualquier material biológico se puede utilizar como la muestra biológica para la determinación, siempre y cuando incluya el producto de transcripción o traducción objetivo de NEIL3. Las muestras biológicas incluyen, de manera enunciativa, tejidos y fluidos corporales, tales como sangre, esputo y orina. En algunas realizaciones, la muestra biológica contiene una población de células que comprende una célula epitelial, de mayor preferencia una célula epitelial cancerosa o una célula epitelial derivada de un tejido con sospecha de ser canceroso. Además, si es necesario, la célula se puede purificar a partir de los tejidos y fluidos corporales obtenidos, y luego se puede utilizar como la muestra biológica.

- 40 Se puede determinar el nivel de expresión de NEIL3 en la muestra biológica derivada del sujeto. El nivel de expresión se puede determinar al nivel del producto de transcripción (ácido nucleico), utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARNm de NEIL3 se puede cuantificar utilizando sondas mediante métodos de hibridación (por ejemplo, hibridación Northern). La detección se puede llevar a cabo en un chip o en una matriz. Se prefiere el uso de una matriz para detectar el nivel de expresión de una pluralidad de genes (por ejemplo, diversos genes específicos de cáncer), incluyendo NEIL3. Aquellos expertos en la técnica pueden preparar estas sondas utilizando la información de secuencias de la NEIL3 (SEC ID NO: 44; número de acceso GenBank: NM_018248).
- 45 Por ejemplo, el ADNc de la NEIL3 se puede utilizar como las sondas. Si es necesario, la sonda se puede marcar con

un marcador adecuado, tal como tintes, fluorescencia e isótopos, y el nivel de expresión del gen se puede detectar como la intensidad de los marcadores hibridados.

5 Además, el producto de transcripción de NEIL3 se puede cuantificar utilizando cebadores mediante métodos de detección basados en amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Estos cebadores también se pueden preparar con base en la información de secuencia disponible del gen. Por ejemplo, los cebadores (SEC ID NOs: 46 y 47) utilizados en el Ejemplo se pueden emplear para la detección mediante RT-PCR o transferencia Northern, aunque la presente invención no se restringe a los mismos.

Específicamente, una sonda o cebador utilizado para el método de la presente se hibrida bajo condiciones rigurosas, moderadamente rigurosas, o poco rigurosas al ARNm de NEIL3.

10 Alternativamente, el producto de traducción se puede detectar para el diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, se puede determinar la cantidad de la proteína NEIL3. Un método para determinar la cantidad de la proteína como el producto de traducción incluye métodos de inmunoensayo que utilizan un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Además, para la detección se puede utilizar cualquier fragmento o modificación (por ejemplo, anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo, siempre y cuando el fragmento conserve la capacidad de unión a la proteína NEIL3. Son bien conocidos en la técnica los métodos para preparar estos tipos de anticuerpos para la detección de proteínas, y se puede emplear cualquier método en la presente invención para preparar estos anticuerpos y los equivalentes de los mismos.

20 Como otro método para detectar el nivel de expresión del gen NEIL3 con base en su producto de traducción, se puede observar la intensidad de tinción vía análisis inmunohistoquímico utilizando un anticuerpo contra la proteína NEIL3. A saber, la observación de una tinción fuerte indica la presencia aumentada de la proteína y al mismo tiempo un alto nivel de expresión del gen NEIL3.

25 Además, aparte del nivel de expresión del gen NEIL3, para mejorar la precisión del diagnóstico, también se puede determinar el nivel de expresión de otros genes asociados con cáncer, por ejemplo los genes que se sabe que se expresan diferencialmente en el cáncer.

El nivel de expresión del gen marcador del cáncer incluyendo el gen NEIL3 en una muestra biológica se puede considerar que se aumentará si aumenta a partir del nivel de control del gen marcador de cáncer correspondiente en, por ejemplo, 10%, 25% o 50%, o aumenta hasta más de 1,1 veces, más de 1,5 veces, más de 2,0 veces, más de 5,0 veces, más de 10,0 veces, o más.

30 El nivel de control se puede determinar al mismo tiempo con la muestra biológica de ensayo al utilizar una muestra o muestras recolectadas anteriormente y almacenarlas a partir de un sujeto/sujetos cuyo estado mórbido (canceroso o no canceroso) es conocido. Alternativamente, el nivel de control se puede determinar mediante un método estadístico con base en los resultados obtenidos al analizar el nivel o niveles de expresión determinados anteriormente del gen NEIL3 en muestras provenientes de sujetos cuyo estado mórbido es conocido. Además, el nivel de control puede ser una base de datos de los patrones de expresión a partir de células ensayadas anteriormente. Además, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, el nivel de expresión del gen NEIL3 en una muestra biológica se puede comparar con múltiples niveles de control, niveles de control los cuales se determinan a partir de múltiples muestras de referencia. Se prefiere utilizar un nivel de control determinado a partir de una muestra de referencia derivada de un tipo de tejido similar al de la muestra biológica derivada de un paciente.

35 Además, se prefiere utilizar el valor estándar de los niveles de expresión del gen NEIL3 en una población con un estado mórbido conocido. El valor estándar se puede obtener mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, Como valor estándar se puede utilizar un intervalo de media +/- 2 S.D. o media +/- 3 S.D.

40 Cuando se aumenta el nivel de expresión del gen NEIL3 en comparación con el nivel de control normal o es similar al nivel de control canceroso, al sujeto se le puede diagnosticar que sufre o está en riesgo de desarrollar cáncer. Además, en el caso en el que se comparan los niveles de expresión de múltiples genes relacionados con cáncer, una similitud en el patrón de expresión génica entre la muestra y la referencia que es cancerosa indica que el sujeto sufre o está en riesgo de desarrollar cáncer.

45 La diferencia entre los niveles de expresión de una muestra biológica de ensayo y el nivel de control se puede normalizar al nivel de expresión de los ácidos nucleicos de control, por ejemplo genes de mantenimiento, cuyos niveles de expresión se sabe que no difieren según el estado canceroso o no canceroso de la célula. Los genes de control ilustrativos incluyen, de manera enunciativa, beta-actina, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, y la proteína ribosómica P1.

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención, más adelante se describen métodos y materiales adecuados.

55 La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Líneas celulares

- 5 T2 (HLA-A2), línea celular linfoblastoide B humana, COS7 y línea celular de riñón de mono verde africano se adquirieron de ATCC, y PSCCA0922 (HLA-A*0206) se adquirió de Japan Health Sciences Foundation. T1SI, la línea celular linfoblastoide B positiva para HLA-A*2402 se adquirió del IHWG Cell y Gene Bank (Seattle, WA).

Selección de candidatos de péptidos derivados de NEIL3

- 10 Los péptidos 9 mero y 10 mero derivados de NEIL3 que se unen a la molécula de HLA-A*0201 se predijeron utilizando el software para predicción de unión "BIMAS" (www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker et al. (J Immunol 1994, 152(1): 163-75), Kuzushima et al. (Blood 2001, 98(6): 1872-81)). Los péptidos 9 mero y 10 mero derivados de NEIL3 que se unen a la molécula HLA-A*2402 utilizando el servidor para predicción de unión "NetMHC3.0" (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003), Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004)). Estos péptidos se sintetizaron mediante Biosynthesis Inc. (Lewisville, TX) de acuerdo con un método de síntesis en fase sólida estándar, y se purificaron mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC) de fase inversa. La pureza (> 90%) y la identidad de los péptidos se determinaron mediante HPLC analítica y análisis de espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a 20 mg/ml, y se almacenaron a -80°C.

Inducción de CTL in vitro

- 20 Células dendríticas (DC) derivadas de monocitos se utilizaron como células presentadoras de antígeno (APC) para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra los péptidos presentados en el antígeno leucocitario humano (HLA). Las DC se generaron in vitro como se describe en otra parte (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8). Específicamente, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un voluntario normal (HLA-A*0201 o HLA-A*0206 positivas) mediante disolución en placas Ficoll (Pharmacia) se separaron mediante adherencia a una cápsula de cultivo tisular de plástico (Becton Dickinson) para enriquecerlas como la fracción de monocitos. La población enriquecida en monocitos se cultivó en presencia de 1.000 U/ml de un factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (R&D System) y 1.000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D System) en medio AIM-V (Invitrogen) que contiene 2% de suero autólogo (AS) activado por calor. Después de 7 días de cultivo, las DC inducidas por citocinas se pulsaron con 20 micro-g/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en presencia de 3 micro-g/ml de beta 2-microglobulina durante 3 horas a 37°C en medio AIM-V. Las células generadas parecieron expresar moléculas asociadas a DC, tales como CD80, CD83, CD86 y HLA clase II, sobre sus superficies celulares (datos no mostrados). Estas DC pulsadas con péptidos se inactivaron luego mediante irradiación por rayos X (20 Gy) y se mezclaron a una relación 1:20 con células T CD8+ autólogas, obtenidas mediante la selección positiva con el kit de aislamiento de células CD8 positivas (Dyna). Estos cultivos se colocaron en placas de 48 pocillos (Corning); cada pocillo contenía $1,5 \times 10^4$ DC pulsadas con péptidos, 3×10^5 células T CD8+ y 10 ng/ml de IL-7 (R&D System) en 0,5 ml de medio AIM-V/2% de AS. Tres días después, estos cultivos se suplementaron con IL-2 (CHIRON) a una concentración final de 20 UI/ml. En los días 7 y 14, las células T se estimularon adicionalmente con las DC pulsadas con péptidos autólogas. Las DC se prepararon cada vez de la misma forma como se describió anteriormente. El CTL se evaluó contra células T2 o PSCCA0922 pulsadas con péptidos después del 3^{er} ciclo de estimulación por péptidos en el día 21 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

Procedimiento para la expansión del CTL

- 45 Los CTL se expandieron en cultivo utilizando el método similar a uno descrito por Riddell et al. (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23). Se suspendieron un total de 5×10^4 de los CTL en 25 ml de medio AIM-V/5% de AS con 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas, inactivadas por MMC, en presencia de 40 ng/ml del anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen). Un día después de iniciar los cultivos, se añadieron a los cultivos 120 UI/ml de IL-2. Los cultivos se alimentaron con medio AIM-V/5% de AS recién preparado que contiene 30 UI/ml de IL-2 en los días 5, 8 y 11 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

Establecimiento de los clones de CTL

- 55 Se realizaron diluciones para tener 0,3, 1 y 3 CTL/pocillo en una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos (Nalge Nunc International). Los CTL se cultivaron con 1×10^4 células/pocillo de 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas, 30 ng/ml del anticuerpo anti-CD3, y 125 U/ml de IL-2 en un total de 150 micro-1/pocillo del medio AIM-V que contiene 5% de AS. 10 días más tarde se añadieron al medio 50 micro-1/pocillo de IL-2 para

alcanzar una concentración final de 125 U/ml de IL-2. En el día 14^o se evaluó la actividad del CTL, y los clones de CTL se expandieron utilizando el mismo método como se describió anteriormente (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

5 Actividad de CTL específica

Para examinar la actividad de CTL específica, se llevó a cabo el ensayo de inmunomancha ligado a enzimas (ELISPOT) de interferón (IFN)-gamma y el ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) de IFN-gamma. Específicamente, como células estimuladoras se preparó T2 pulsada con péptidos (1 x 10⁴/pocillo). Las células cultivadas en 48 pocillos se utilizaron como células respondedoras. El ensayo ELISPOT de IFN-gamma y el ensayo ELISA de IFN-gamma se llevaron a cabo según el procedimiento del fabricante.

Transfección de plásmidos

El ADNc que codifica un marco de lectura abierto de los genes diana, HLA-A*0201, HLA-A*0206 o HLA-A*2402 se amplificó mediante PCR. El producto amplificado mediante PCR se clonó en un vector. Los plásmidos se transfectaron en COS7, que es el gen diana y la línea celular HLA-A2- y A24-negativa, utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante. Después de dos días de transfección, las células transfectadas se recolectaron con Versene (Invitrogen) y se utilizaron como las células diana (5 x 10⁶ células/pocillo) para el ensayo de actividad del CTL.

Análisis de RT-PCR semi-cuantitativa

Se extrajo ARN total con un kit Qiagen RNeasy (Qiagen) o un reactivo Trizol (Life Technologies, Inc.), de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. Alícuotas de diez microgramos de ARN total se transcribieron inversamente para los ADNc monocatenarios utilizando el cebador poly dT₁₂₋₁₈ (Amersham Pharmacia Biotech) con la transcriptasa inversa Superscrip II (Life Technologies). Cada preparación de ADNc monocatenario se diluyó para una amplificación mediante PCR posterior mediante experimentos de RT-PCR estándar llevados a cabo en 12 micro-l volúmenes de amortiguador de PCR (TAKARA). La amplificación prosiguió durante 4 minutos a 94°C para desnaturalización, seguida de 28 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 72°C durante 60 segundos, en el GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Las secuencias cebadoras fueron para NEIL3: directo, 5'- TTGGTCCTCCTCTGTTTCATAGA-3' (SEQ ID NO: 46) e inverso, 5'- GCTTCTCCCCAGTTACAAGAGAC-3' (SEQ ID NO: 47).

Resultados

30 Expresión mejorada de NEIL3 en cánceres

Los datos del perfil de expresión génica globales obtenidos de diversos cánceres utilizando micromatriz de ADNc reveló que se elevó la expresión de NEIL3 (número de acceso GenBank NM_018248; SEC ID No: 44). La expresión de NEIL3 se elevó de manera válida en 4 de los 20 AML, 5 de los 6 cánceres de vejiga, 10 de los 11 cánceres de mama, 8 de los 8 cánceres cervicales, 1 de 1 carcinoma colangiocelular, 12 de los 12 CML, 3 de los 6 cánceres colorrectales, 1 de 1 endometriosis, 4 de los 8 cánceres esofágicos, 6 de los 10 cánceres hepáticos, 7 de los 7 NSCLC, 16 de los 16 osteosarcomas, 1 de 1 cáncer pancreático, 10 de los 10 cánceres prostáticos, 2 de los 2 carcinomas renales, 12 de los 12 SCLC, y 12 de los 12 tumores de tejido blando en comparación con el tejido normal correspondiente (Tabla 1).

Tabla 1

Relación de aumento observado de casos de NEIL3 en tejido canceroso en comparación con el tejido correspondiente normal	
Cánceres	Relación
AML	4/20
Cáncer de vejiga	5/6
Cáncer de mama	10/11
Cáncer cervical	8/8
Carcinoma colangiocelular	1/1
CML	12/12
Cáncer colorrectal	3/6

ES 2 617 434 T3

Relación de aumento observado de casos de NEIL3 en tejido canceroso en comparación con el tejido correspondiente normal	
Endometriosis	1/1
Cáncer esofágico	4/8
Cáncer hepático	6/10
NSCLC	7/7
Osteosarcoma	16/16
Cáncer pancreático	1/1
Cáncer prostático	10/10
Carcinoma renal	2/2
SCLC	12/12
Tumor de tejido blando	12/12

(Experimental 1)

Predicción de los péptidos de unión a HLA-A2 derivados de NEIL3

5 La Tabla 2 muestra los péptidos de unión a HLA-A2 de NEIL3 en el orden de alta afinidad de unión. Se seleccionó un total de 23 péptidos con potencial de capacidad de unión a HLA-A2 y se examinaron para determinar los péptidos epitópicos (Tabla 2).

Tabla 2

Péptidos de unión a HLA-A2 derivados de NEIL3				
	Posición de partida	Secuencia	Puntuación	SEC ID NO.
NEIL3-A2-9mero	64	VLSLFNGYV	321,3	1
	84	FMYFGPKAL	227,1	2
	585	KQCNFFQWA	70,0	3
	127	LICFFDSSV	61,8	4
	416	FQNSPPASV	32,4	5
	71	YVYSGVETL	31,0	6
	41	RLAASTVVV	28,5	7
	34	SLQGRALRL	21,4	8
	298	IISWTSSRV	16,3	9
	291	KLPTRNTII	15,0	10
	271	RMTYFCPHC	13,6	11
	492	NMTDGPRTL	12,7	12
NEIL3-A2-10mero	18	VLPQAVTGV	271,9	13
	212	QLTDEQIHHL	201,4	14
	198	ALFDSGLHPA	173,3	15
	181	LMDQNVLPGV	78,6	16

Péptidos de unión a HLA-A2 derivados de NEIL3				
	340	CLTSRPIDSV	78,4	17
	239	GLALSKHYKV	69,6	18
	55	ALNNDSSQNV	69,6	19
	63	NVLSLFNGYV	61,2	20
	590	FQWAENPGI	40,4	21
	378	KINRKTAFGT	20,8	22
	569	GPNNGKNFFV	14,5	23
La posición de partida indica el número de resto de aminoácido desde el término N de NEIL3.				
La puntuación de unión deriva de "BIMAS".				

Inducción del CTL con los péptidos predichos a partir de NEIL3 restringido con HLA-A*0201 o 0206 y el establecimiento para las líneas de CTL estimuladas con los péptidos derivados de NEIL3

5 Los CTL para aquellos péptidos derivados de NEIL3 se generaron de acuerdo con los protocolos como se describió en "Materiales y Métodos". La actividad de CTL específica del péptido se determinó mediante ensayo ELISPOT de IFN-gamma (Figuras 1a-j). Se mostró que el pocillo número #8 estimulado con NEIL3-A2-9-585 (SEC ID NO: 3) (a), #2 con NEIL3-A2-9-127 (SEC ID NO: 4) (b), #4 y 5 con NEIL3-A2-9-416 (SEC ID NO: 5) (c), #3 con NEIL3-A2-9-71 (SEC ID NO: 6) (d), #1 con NEIL3-A2-9-271 (SEC ID NO: 11) (e), #3 con NEIL3-A2-10-198 (SEC ID NO: 15) (f), #1 con NEIL3-A2-10-340 (SEC ID NO: 17) (g), #2 y 3 con NEIL3-A2-10-590 (SEC ID NO: 21) (h) y #6 con NEIL3-A2-10-378 (SEC ID NO: 22) (i) demostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control. Además, el número de pocillo #9, 10, 12 y 13 con NEIL3-A2-9-416 (SEC ID NO: 5) (j) demostraron una potente producción de IFN-gamma contra las células PSCCA0922 positivas a A0206 pulsadas con el péptido. Además, las células en el pocillo positivo número #8 estimuladas con NEIL3-A2-9-585 (SEC ID NO: 3), #2 con NEIL3-A2-9-127 (SEC ID NO: 4), #4 y 5 con NEIL3-A2-9-416 (SEC ID NO: 5), #3 con NEIL3-A2-9-71 (SEC ID NO: 6), #1 con NEIL3-A2-9-271 (SEC ID NO: 11), #3 con NEIL3-A2-10-198 (SEC ID NO: 15) and, #2 y 3 con NEIL3-A2-10-590 (SEC ID NO: 21) se expandieron y se establecieron las líneas de CTL, y #10 y 12 con NEIL3-A2-9-416 para A0206 (SEC ID NO: 5). También se expandieron y se establecieron las líneas de CTL. La actividad del CTL de aquellas líneas de CTL se determinó mediante ensayo ELISA de IFN-gamma (Figuras 2a-k). Se mostró que todas las líneas de CTL demostraron una potente producción de IFN-gamma contra las células diana pulsadas con el péptido correspondiente, en comparación con las células diana sin pulso de péptido. Por otro lado, ninguna de las líneas de CTL se pudo establecer por la estimulación con otros péptidos mostrados en la Tabla 2, a pesar de que esos péptidos tuvieron una posible actividad de unión con HLA-A*0201 (datos no mostrados). Como resultado, se indica que 7 péptidos derivados de NEIL3 se seleccionaron como los péptidos que podrían inducir los CTL potentes.

Establecimiento de los clones de CTL contra los péptidos específicos NEIL3

25 Los clones de CTL se establecieron mediante dilución limitante a partir de líneas de CTL como se describió en "Materiales y Métodos", y se determinó mediante ensayo ELISA de IFN-gamma la producción de IFN-gamma a partir de clones de CTL contra células diana pulsadas con el péptido. Las potentes producciones de IFN-gamma se determinaron a partir de los clones de CTL estimulados con las SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 15 y SEC ID NO: 21 en las Figura 3.

30 Actividad de CTL específica contra células diana que expresan exógenamente NEIL3 y HLA-A*0201 o HLA-A*0206

Las líneas de CTL establecidas creadas frente a estos péptidos se examinaron en busca de su capacidad para reconocer células diana que expresan endógenamente la molécula NEIL3 y HLA-A*0201 o HLA-A*0206. La actividad de CTL específica contra células COS7 que se transfectaron tanto con la longitud completa del gen de la molécula de NEIL3 y HLA-A*0201 o HLA-A*0206 (un modelo específico para las células diana que expresan exógenamente el gen NEIL3 y HLA-A*0201 o HLA-A*0206) se ensayó utilizando las líneas de CTL creadas por el péptido correspondiente como las células efectoras. Las células COS7 transfectadas con ya sea la longitud completa del gen NEIL3, HLA-A*0201 o HLA-A*0206 se prepararon como control. En las Figura 4, los CTL estimulados con la SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6 y SEC ID NO: 15 mostraron potente actividad de CTL contra las células COS7 que expresan tanto NEIL3 como HLA-A*0201, y los CTL estimulados con SEC ID NO: 5 también mostraron una potente actividad de CTL contra las células COS7 que expresan tanto NEIL3 como HLA-A*0206. Por otro lado, no se detectó ninguna actividad del CTL específica significativa contra los controles. De esta forma, estos datos demuestran claramente que NEIL3-A2-9-416 (SEC ID NO: 5), NEIL3-A2-9-71 (SEC ID NO: 6) y NEIL3-A2-10-198 (SEC ID NO: 15)

15) se expresaron naturalmente sobre las células diana con la molécula de HLA-A*0201 y fueron reconocidos por los CTL, y NEIL3-A2-9-416 (SEC ID NO: 5) también se expresó naturalmente en las células diana con la molécula de HLA-A*0206 y fue reconocido por los CTL. Estos resultados indican que estos péptidos derivados de NEIL3 pueden estar disponibles para aplicar las vacunas contra el cáncer a pacientes con tumores que expresan NEIL3.

5 Análisis de homología de los péptidos antigénicos

Los CTL estimulados con NEIL3-A2-9-585 (SEC ID NO: 3), NEIL3-A2-9-127 (SEC ID NO: 4), NEIL3-A2-9-416 (SEC ID NO: 5), NEIL3-A2-9-71 (SEC ID NO: 6), NEIL3-A2-9-271 (SEC ID NO: 11), NEIL3-A2-10-198 (SEC ID NO: 15), NEIL3-A2-10-340 (SEC ID NO: 17), NEIL3-A2-10-590 (SEC ID NO: 21) y NEIL3-A2-10-378 (SEC ID NO: 22) mostraron una actividad de CTL significativa y específica. Este resultado puede ser debido al hecho de que las secuencias de NEIL3-A2-9-585 (SEC ID NO: 3), NEIL3-A2-9-127 (SEC ID NO: 4), NEIL3-A2-9-416 (SEC ID NO: 5), NEIL3-A2-9-71 (SEC ID NO: 6), NEIL3-A2-9-271 (SEC ID NO: 11), NEIL3-A2-10-198 (SEC ID NO: 15), NEIL3-A2-10-340 (SEC ID NO: 17), NEIL3-A2-10-590 (SEC ID NO: 21) y NEIL3-A2-10-378 (SEC ID NO: 22) son homólogas a péptidos derivados de otras moléculas que se sabe que sensibilizan el sistema inmunitario humano. Para excluir esta posibilidad, se realizaron análisis de homología para estas secuencias peptídicas utilizando como búsquedas el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi), que no reveló ninguna secuencia con homología significativa. Los resultados de los análisis de homología indican que las secuencias de NEIL3-A2-9-585 (SEC ID NO: 3), NEIL3-A2-9-127 (SEC ID NO: 4), NEIL3-A2-9-416 (SEC ID NO: 5), NEIL3-A2-9-71 (SEC ID NO: 6), NEIL3-A2-9-271 (SEC ID NO: 11), NEIL3-A2-10-198 (SEC ID NO: 15), NEIL3-A2-10-340 (SEC ID NO: 17), NEIL3-A2-10-590 (SEC ID NO: 21) y NEIL3-A2-10-378 (SEC ID NO: 22) son únicas y de esta forma existe una pequeña posibilidad, según nuestro conocimiento, de que estas moléculas creen una respuesta inmunológica no buscada contra alguna molécula no relacionada.

En conclusión, se identificaron péptidos epitópicos HLA-A2 nuevos derivados de NEIL3. Además, se demostró que los péptidos epitópicos de NEIL3 se pueden aplicar para inmunoterapia del cáncer.

Expresión elevada de NEIL3 en una amplia gama de cánceres humanos

25 Un análisis de RT-PCR semi-cuantitativa posterior reveló una expresión mejorada de NEIL3 en 7 de 8 de los ICC que se sometieron al análisis de micromatriz (Figura 5a).

Para confirmar el patrón de expresión de este gen en cánceres hepáticos, los inventores realizaron análisis de RT-PCR semi-cuantitativa utilizando especímenes de cáncer hepático clínico y tejidos humanos normales que incluyen células hepáticas normales. Como resultado, los inventores encontraron que NEIL3 cuya expresión mostró la expresión elevada en 7 de 8 especímenes con cáncer hepático clínico (lesiones diferenciadas deficientemente) en comparación con células hepáticas normales (Figura 5a), y se sobre-expresó en 5 de 5 líneas celulares de HCC y no se expresó en otros tejidos normales (Figura 5b).

(Experimental 2)

Predicción de los péptidos de unión a HLA-A24 derivados de NEIL3

35 La Tabla 3a y 3b muestran los péptidos 9mero y 10mero de unión a HLA-A24 de NEIL3 en el orden de alta afinidad de unión. Para determinar los péptidos epitópicos se seleccionaron y examinaron un total de 21 péptidos con potencial capacidad de unión a HLA-A24.

Tabla 3a

Péptidos 9meros de unión a HLA-A24 derivados de NEIL3			
Posición de partida	Secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEC ID NO
545	EWADLSFPF	10	24
364	KYPCNTFGK	314	25
320	HWTCVVCTL	456	26
86	YFGPKALRI	779	27
60	SSQNVLSLF	878	28
591	QWAENGPGI	1038	29
560	STMKTVLKI	1250	30
192	NIKNEALF	3681	31

186	VLPGVGNII	7297	32
362	LMKYPCNTF	9549	33
445	SKVNISPTI	10676	34

Tabla 3b

Péptidos 10meros de unión a HLA-A24 derivados de NEIL3			
Posición de partida	Secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEC ID NO
320	HWTCVVCTLI	195	35
361	HLMKYPCNTF	6226	36
257	CHCRITVCRF	10173	37
319	EHWTCVVCTL	13366	38
568	IGPNNGKNFF	14846	39
122	QLTKDLICFF	15324	40
544	FEWADLSFPF	18029	41
534	PLPREAQCGF	19346	42
87	FGPKALRIHF	21307	43

La posición de partida indica el número del resto de aminoácido a partir del término-N de NEIL3.

- 5 La constante de disociación [Kd (nM)] deriva de "NetMHC3.0".

Inducción de los CTL con los péptidos predichos de NEIL3 restringidos con HLA-A*2402

Los CTL para aquellos péptidos derivados de NEIL3 se generaron de acuerdo con los protocolos según se describe en "Materiales y Métodos". La actividad del CTL específica del péptido se determinó mediante el análisis ELISPOT de IFN-gamma (Figuras 6a-e). Se mostró que el pocillo número #7 estimulado con NEIL3-A24-9-545 (SEC ID NO: 24) (a), #6 estimulado con NEIL3-A24-9-362 (SEC ID NO: 33) (b), #2 y #8 estimulados con NEIL3-A24-10-320 (SEC ID NO: 35) (c), #8 estimulado con NEIL3-A24-10-544 (SEC ID NO: 41) (d) y #1 y #4 estimulados con NEIL3-A24-10-87 (SEC ID NO: 43) (e) demostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control. Por otro lado, no se determinó ninguna actividad de CTL específica mediante la estimulación con otros péptidos mostrados en las Tablas 3a y 3b, a pesar de que esos péptidos tuvieron una posible actividad de unión con HLA-A*2402. Por ejemplo, datos negativos típicos de la respuesta de CTL estimulada con NEIL3-A24-9-364 (SEC ID NO: 25) contra las células diana pulsadas con péptidos (f). Como resultado, se indica que se seleccionaron 5 péptidos derivados de NEIL3 como los péptidos que podrían inducir CTL potentes.

Establecimiento de líneas de CTL y clones contra péptido derivado de NEIL3

Las células que mostraron actividad de CTL específica del péptido detectada mediante el ensayo ELISPOT de IFN-gamma en el pocillo número #7 con NEIL3-A24-9-545 (SEC ID NO:24) (a), #6 con NEIL3-A24-9-362 (SEC ID NO: 33) (b), #8 con NEIL3-A24-10-320 (SEC ID NO: 35) (c), #8 con NEIL3-A24-10-544 (SEC ID NO: 41) (d) y #1 con NEIL3-A24-10-87 (SEC ID NO: 43) (e) se expandieron, y se establecieron las líneas de CTL. La actividad de CTL de aquellas líneas de CTL se determinó mediante el ensayo ELISA de IFN-gamma (Figuras 7a-e). Se mostró que todas las líneas de CTL demostraron una potente producción de IFN-gamma contra las células diana pulsadas con el péptido correspondiente, en comparación con las células diana sin el pulso con péptido. Además, los clones de CTL se establecieron mediante dilución limitante de las líneas de CTL, y la producción de IFN-gamma a partir de los clones de CTL contra células diana pulsadas con péptido se determinó mediante el ensayo ELISA de IFN-gamma. Las potentes producciones de IFN-gamma se determinaron a partir de los clones de CTL estimulados con NEIL3-A24-9-545 (SEC ID NO: 24) (a), NEIL3-A24-10-320 (SEC ID NO: 35) (b) y NEIL3-A24-10-544 (SEC ID NO: 41) (c) en la Figura 8.

Actividad de CTL específica contra las células diana que expresan exógenamente NEIL3 y HLA-A*2402

Las líneas de CTL establecidas y los clones creados contra cada uno de los péptidos se examinaron en busca de su capacidad para reconocer células diana que expresan endógenamente el gen NEIL3 y HLA-A*2402. La actividad de CTL específica contra células COS7 que se transfectaron tanto con la longitud completa del gen NEIL3 y HLA-A*2402 (un modelo específico para las células diana que expresan exógenamente el gen NEIL3 y HLA-A*2402) se ensayó utilizando las líneas de CTL y los clones creados por el péptido correspondiente como las células efectoras. Las células COS7 transfectadas con la longitud completa de los genes NEIL3 o HLA-A*2402 se prepararon como controles. En la Figura 9, los CTL estimulados con NEIL3-A24-9-545 (SEC ID NO: 24) mostraron una potente actividad de CTL contra las células COS7 que expresan tanto NEIL3 como HLA-A*2402. Por otro lado, no se detectó ninguna actividad significativa de CTL específica contra el control. De esta forma, estos datos demuestran claramente que NEIL3-A24-9-545 (SEC ID NO: 24) fue expresado naturalmente en las células diana con la molécula de HLA-A*2402 y se reconocieron por los CTL. Estos resultados indican que este péptido derivado de NEIL3 puede estar disponible para aplicarse a las vacunas contra el cáncer para pacientes con tumores que expresan NEIL3.

Análisis de homología de los péptidos antigénicos

Los CTL estimulados con NEIL3-A24-9-545 (SEC ID NO: 24), NEIL3-A24-9-362 (SEC ID NO: 33), NEIL3-A24-10-320 (SEC ID NO: 35), NEIL3-A24-10-544 (SEC ID NO: 41) y NEIL3-A24-10-87 (SEC ID NO: 43) mostraron una actividad de CTL significativa y específica. Este resultado puede ser debido al hecho de que la secuencia de NEIL3-A24-9-545 (SEC ID NO: 24), NEIL3-A24-9-362 (SEC ID NO: 33), NEIL3-A24-10-320 (SEC ID NO: 35), NEIL3-A24-10-544 (SEC ID NO: 41) y NEIL3-A24-10-87 (SEC ID NO: 43) son homólogas al péptido derivado de otras moléculas que se sabe que sensibilizan al sistema inmunitario humano. Para excluir esta posibilidad, se realizaron análisis de homología para esta secuencia peptídica utilizando como búsquedas el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi), que no reveló ninguna secuencia con homología significativa. Los resultados de los análisis de homología indican que la secuencia de NEIL3-A24-9-545 (SEC ID NO: 24), NEIL3-A24-9-362 (SEC ID NO: 33), NEIL3-A24-10-320 (SEC ID NO: 35), NEIL3-A24-10-544 (SEC ID NO: 41) y NEIL3-A24-10-87 (SEC ID NO: 43) son únicas y de esta forma existe una pequeña posibilidad, según nuestro conocimiento, de que estas moléculas creen una respuesta inmunológica no buscada contra alguna molécula no relacionada.

En conclusión, se identificaron nuevos péptidos epitópicos HLA-A*2402 derivados de NEIL3. Además, se demostró que los péptidos epitópicos de NEIL3 se pueden aplicar para inmunoterapia del cáncer.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona nuevos TAA, en particular aquellos derivados de NEIL3 que pueden inducir respuestas inmunitarias anti-tumorales potentes y específicas y tienen aplicabilidad para una amplia variedad de tipos de cáncer.

Estos TAA pueden ser de utilidad en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
 <120> PÉPTIDOS NEIL3 Y VACUNAS QUE LOS INCLUYEN
 <130> ONC-A0905P
 <150> US 61/210,512
 <151> 2009-03-18
 <160> 51
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 1

Val Leu Ser Leu Phe Asn Gly Tyr Val
 1 5
 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 2
 Phe Met Tyr Phe Gly Pro Lys Ala Leu
 1 5
 10 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 3
 Lys Gln Cys Asn Phe Phe Gln Trp Ala
 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 4
 Leu Ile Cys Phe Phe Asp Ser Ser Val
 1 5
 25 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 5
 Phe Gln Asn Ser Pro Pro Ala Ser Val
 1 5
 <210> 6

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 6
 Tyr Val Tyr Ser Gly Val Glu Thr Leu
 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 7
 Arg Leu Ala Ala Ser Thr Val Val Val
 1 5
 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 8
 Ser Leu Gln Gly Arg Ala Leu Arg Leu
 1 5
 <210> 9
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 9
 Ile Ile Ser Trp Thr Ser Ser Arg Val
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 10
 Lys Leu Pro Thr Arg Asn Thr Ile Ile
 1 5

5 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

10 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 11
 Arg Met Thr Tyr Phe Cys Pro His Cys
 1 5

<210> 12
 <211> 9

15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 12
 Asn Met Thr Asp Gly Pro Arg Thr Leu
 1 5

20 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 13
 Val Leu Pro Gly Gln Ala Val Thr Gly Val
 1 5 10

<210> 14

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

35 <400> 14

Gln Leu Thr Asp Glu Gln Ile His His Leu
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 15
 Ala Leu Phe Asp Ser Gly Leu His Pro Ala
 1 5 10
 10 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 16
 Leu Met Asp Gln Asn Val Leu Pro Gly Val
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 17
 Cys Leu Thr Ser Arg Pro Ile Asp Ser Val
 25 1 5 10
 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 18
 Gly Leu Ala Leu Ser Lys His Tyr Lys Val
 1 5 10
 <210> 19

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 19
 Ala Leu Asn Asn Asp Ser Ser Gln Asn Val
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 20
 Asn Val Leu Ser Leu Phe Asn Gly Tyr Val
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 21
 Phe Gln Trp Ala Glu Asn Gly Pro Gly Ile
 1 5 10
 <210> 22
 25 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 30 <400> 22
 Lys Ile Asn Arg Lys Thr Ala Phe Gly Thr
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 23
 Gly Pro Asn Asn Gly Lys Asn Phe Phe Val
 1 5 10

5 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 24
 Glu Trp Ala Asp Leu Ser Phe Pro Phe
 1 5

<210> 25
 <211> 9

15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 25
 Lys Tyr Pro Cys Asn Thr Phe Gly Lys
 1 5

20 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 26
 His Trp Thr Cys Val Val Cys Thr Leu
 1 5

<210> 27

30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente

35 <400> 27

Tyr Phe Gly Pro Lys Ala Leu Arg Ile
 1 5
 <210> 28
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Virus de las manchas onduladas de la alcachofa
 <400> 28
Ser Ser Gln Asn Val Leu Ser Leu Phe
 1 5
 <210> 29
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 15 <400> 29
Gln Trp Ala Glu Asn Gly Pro Gly Ile
 1 5
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 30
Ser Thr Met Lys Thr Val Leu Lys Ile
 1 5
 25 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 31
Asn Ile Ile Lys Asn Glu Ala Leu Phe
 1 5
 <210> 32
 <211> 9
 35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 32
 Val Leu Pro Gly Val Gly Asn Ile Ile
 5 1 5
 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 33
 Leu Met Lys Tyr Pro Cys Asn Thr Phe
 1 5
 <210> 34
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 20 <400> 34
 Ser Lys Val Asn Ile Ser Pro Thr Ile
 1 5
 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 35
 His Trp Thr Cys Val Val Cys Thr Leu Ile
 1 5 10
 30 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 36

His Leu Met Lys Tyr Pro Cys Asn Thr Phe
1 5 10

<210> 37

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 37

10 Cys His Cys Arg Ile Thr Val Cys Arg Phe
1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 38

Glu His Trp Thr Cys Val Val Cys Thr Leu
1 5 10

<210> 39

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente

25 <400> 39

Ile Gly Pro Asn Asn Gly Lys Asn Phe Phe
1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 40

Gln Leu Thr Lys Asp Leu Ile Cys Phe Phe
1 5 10

<210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 41
 Phe Glu Trp Ala Asp Leu Ser Phe Pro Phe
 1 5 10
 <210> 42
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 15 <400> 42
 Pro Leu Pro Arg Glu Ala Gln Cys Gly Phe
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 43
 Phe Gly Pro Lys Ala Leu Arg Ile His Phe
 1 5 10
 25 <210> 44
 <211> 2402
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 30 <221> CDS
 <222> (118)..(1935)
 <400> 44

ES 2 617 434 T3

gacgcgcgcg agatttgaat ttctctgcg tgcggtcagt gcccgcgag cgttgagttg	60
cacagcggta ttctcaccag gccctgcaat cgggtggcca cagtgccggc cacagag	117
atg gtg gaa gga cca ggc tgt act ctg aat gga gag aag att cgc gcg Met Val Glu Gly Pro Gly Cys Thr Leu Asn Gly Glu Lys Ile Arg Ala 1 5 10 15	165
cgg gtg ctc ccg ggc cag gcg gtg acc ggc gtg cgg gga agc gct ctg Arg Val Leu Pro Gly Gln Ala Val Thr Gly Val Arg Gly Ser Ala Leu 20 25 30	213
cgg agt ctg cag ggc cgc gcc ttg cgg ctc gca gcc tcc acg gtt gtg Arg Ser Leu Gln Gly Arg Ala Leu Arg Leu Ala Ala Ser Thr Val Val 35 40 45	261
gtc tcc ccg cag gct gct gca ctg aat aat gat tcc agc cag aat gtc Val Ser Pro Gln Ala Ala Ala Leu Asn Asn Asp Ser Ser Gln Asn Val 50 55 60	309
ttg agc ctg ttt aat gga tat gtt tac agt ggc gtg gaa act ttg ggg Leu Ser Leu Phe Asn Gly Tyr Val Tyr Ser Gly Val Glu Thr Leu Gly 65 70 75 80	357
aag gag ctc ttt atg tac ttt gga cca aaa gct tta cgg att cat ttc	405

ES 2 617 434 T3

Lys	Glu	Leu	Phe	Met	Tyr	Phe	Gly	Pro	Lys	Ala	Leu	Arg	Ile	His	Phe	
				85					90					95		
gga	atg	aaa	ggc	ttc	atc	atg	att	aat	cca	ctt	gag	tat	aaa	tat	aaa	453
Gly	Met	Lys	Gly	Phe	Ile	Met	Ile	Asn	Pro	Leu	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	
			100					105					110			
aat	gga	gct	tct	cct	ggt	ttg	gaa	gtg	cag	ctc	acc	aaa	gat	ttg	att	501
Asn	Gly	Ala	Ser	Pro	Val	Leu	Glu	Val	Gln	Leu	Thr	Lys	Asp	Leu	Ile	
		115					120					125				
tgt	ttc	ttt	gac	tca	tca	gta	gaa	ctc	aga	aac	tca	atg	gaa	agc	caa	549
Cys	Phe	Phe	Asp	Ser	Ser	Val	Glu	Leu	Arg	Asn	Ser	Met	Glu	Ser	Gln	
	130					135						140				
cag	aga	ata	aga	atg	atg	aaa	gaa	tta	gat	gta	tgt	tca	cct	gaa	ttt	597
Gln	Arg	Ile	Arg	Met	Met	Lys	Glu	Leu	Asp	Val	Cys	Ser	Pro	Glu	Phe	
	145				150					155					160	
agt	ttc	ttg	aga	gca	gaa	agt	gaa	gtt	aaa	aaa	cag	aaa	ggc	cgg	atg	645
Ser	Phe	Leu	Arg	Ala	Glu	Ser	Glu	Val	Lys	Lys	Gln	Lys	Gly	Arg	Met	
				165					170					175		
cta	ggt	gat	gtg	cta	atg	gat	cag	aac	gta	ttg	cct	gga	gta	ggg	aac	693
Leu	Gly	Asp	Val	Leu	Met	Asp	Gln	Asn	Val	Leu	Pro	Gly	Val	Gly	Asn	
			180					185					190			
atc	atc	aaa	aat	gaa	gct	ctc	ttt	gac	agt	ggt	ctc	cac	cca	gct	ggt	741
Ile	Ile	Lys	Asn	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Ser	Gly	Leu	His	Pro	Ala	Val	
		195					200					205				
aaa	ggt	tgt	caa	tta	aca	gat	gaa	cag	atc	cat	cac	ctc	atg	aaa	atg	789
Lys	Val	Cys	Gln	Leu	Thr	Asp	Glu	Gln	Ile	His	His	Leu	Met	Lys	Met	
	210					215					220					
ata	cgt	gat	ttc	agc	att	ctc	ttt	tac	agg	tgc	cgt	aaa	gca	gga	ctt	837
Ile	Arg	Asp	Phe	Ser	Ile	Leu	Phe	Tyr	Arg	Cys	Arg	Lys	Ala	Gly	Leu	
	225				230					235					240	
gct	ctc	tct	aaa	cac	tat	aag	gtt	tac	aag	cgt	cct	aat	tgt	ggt	cag	885
Ala	Leu	Ser	Lys	His	Tyr	Lys	Val	Tyr	Lys	Arg	Pro	Asn	Cys	Gly	Gln	
				245					250					255		
tgc	cac	tgc	aga	ata	act	gtg	tgc	cgc	ttt	ggg	gac	aat	aac	aga	atg	933
Cys	His	Cys	Arg	Ile	Thr	Val	Cys	Arg	Phe	Gly	Asp	Asn	Asn	Arg	Met	
			260					265					270			
aca	tat	ttc	tgt	cct	cac	tgt	caa	aaa	gaa	aat	cct	caa	cat	ggt	gac	981
Thr	Tyr	Phe	Cys	Pro	His	Cys	Gln	Lys	Glu	Asn	Pro	Gln	His	Val	Asp	
		275					280					285				
ata	tgc	aag	cta	ccg	act	aga	aat	act	ata	atc	agt	tgg	aca	tct	agc	1029
Ile	Cys	Lys	Leu	Pro	Thr	Arg	Asn	Thr	Ile	Ile	Ser	Trp	Thr	Ser	Ser	
	290					295					300					
agg	gtg	gat	cat	ggt	atg	gac	tcc	gtg	gct	cgg	aag	tcg	gaa	gag	cac	1077
Arg	Val	Asp	His	Val	Met	Asp	Ser	Val	Ala	Arg	Lys	Ser	Glu	Glu	His	
	305				310					315					320	
tgg	acc	tgt	gtg	gtg	tgt	act	tta	atc	aat	aag	ccc	tct	tct	aag	gca	1125
Trp	Thr	Cys	Val	Val	Cys	Thr	Leu	Ile	Asn	Lys	Pro	Ser	Ser	Lys	Ala	
				325					330					335		
tgt	gat	gct	tgc	ttg	acc	tca	agg	cct	att	gat	tca	gtg	ctc	aag	agt	1173
Cys	Asp	Ala	Cys	Leu	Thr	Ser	Arg	Pro	Ile	Asp	Ser	Val	Leu	Lys	Ser	

ES 2 617 434 T3

	340		345		350		
	gaa gaa aat tct act gtc ttt agc cac tta atg aag tac ccg tgt aat						1221
	Glu Glu Asn Ser Thr Val Phe Ser His Leu Met Lys Tyr Pro Cys Asn						
	355		360		365		
	act ttt gga aaa cct cat aca gaa gtc aag atc aac aga aaa act gca						1269
	Thr Phe Gly Lys Pro His Thr Glu Val Lys Ile Asn Arg Lys Thr Ala						
	370		375		380		
	ttt gga act aca act ctt gtc ttg act gat ttt agc aat aaa tcc agt						1317
	Phe Gly Thr Thr Thr Leu Val Leu Thr Asp Phe Ser Asn Lys Ser Ser						
	385		390		395		400
	act ttg gaa aga aaa aca aag caa aac cag ata cta gat gag gag ttt						1365
	Thr Leu Glu Arg Lys Thr Lys Gln Asn Gln Ile Leu Asp Glu Glu Phe						
		405		410		415	
	caa aac tct cct cct gct agt gtt tgt ttg aat gat ata cag cac ccc						1413
	Gln Asn Ser Pro Pro Ala Ser Val Cys Leu Asn Asp Ile Gln His Pro						
		420		425		430	
	tcc aag aag aca aca aac gat ata act caa cca tcc agc aaa gta aac						1461
	Ser Lys Lys Thr Thr Asn Asp Ile Thr Gln Pro Ser Ser Lys Val Asn						
		435		440		445	
	ata tca cct aca atc agt tca gaa tct aaa tta ttt agt cca gca cat						1509
	Ile Ser Pro Thr Ile Ser Ser Glu Ser Lys Leu Phe Ser Pro Ala His						
		450		455		460	
	aaa aaa ccg aaa aca gcc caa tac tca tca cca gag ctt aaa agc tgc						1557
	Lys Lys Pro Lys Thr Ala Gln Tyr Ser Ser Pro Glu Leu Lys Ser Cys						
		465		470		475	480
	aac cct gga tat tct aac agt gaa ctt caa att aat atg aca gat ggc						1605
	Asn Pro Gly Tyr Ser Asn Ser Glu Leu Gln Ile Asn Met Thr Asp Gly						
		485		490		495	
	cct cgt acc tta aat cct gac agc cct cgc tgc agt aaa cac aac cgc						1653
	Pro Arg Thr Leu Asn Pro Asp Ser Pro Arg Cys Ser Lys His Asn Arg						
		500		505		510	
	ctc tgc att ctc cga gtt gtg agg aag gat ggg gaa aac aag ggc agg						1701
	Leu Cys Ile Leu Arg Val Val Lys Asp Gly Glu Asn Lys Gly Arg						
		515		520		525	
	cag ttt tat gcc tgt cct cta cct aga gaa gca caa tgt gga ttt ttt						1749
	Gln Phe Tyr Ala Cys Pro Leu Pro Arg Glu Ala Gln Cys Gly Phe Phe						
		530		535		540	
	gaa tgg gca gat ttg tcc ttc cca ttc tgc aac cat ggc aag cgt tcc						1797
	Glu Trp Ala Asp Leu Ser Phe Pro Phe Cys Asn His Gly Lys Arg Ser						
		545		550		555	560
	acc atg aaa aca gta ttg aag att gga cct aac aat gga aag aat ttt						1845
	Thr Met Lys Thr Val Leu Lys Ile Gly Pro Asn Asn Gly Lys Asn Phe						
		565		570		575	
	ttt gtg tgt cct ctt ggg aag gaa aaa caa tgc aat ttt ttc cag tgg						1893
	Phe Val Cys Pro Leu Gly Lys Glu Lys Gln Cys Asn Phe Phe Gln Trp						
		580		585		590	
	gca gaa aat ggg cca gga ata aaa att att cct gga tgc taa						1935
	Ala Glu Asn Gly Pro Gly Ile Lys Ile Ile Pro Gly Cys						
		595		600		605	

ES 2 617 434 T3

tatctgtaga ttctctggca tttagtctct tcaaactgtg tataatgttt ggtcctcctc 1995
 tgtttcatag aaaagtcata gaatatctat gatacattga aaagttactg caatatttga 2055
 gaactgttct ttttttttct tgtgtgtgcc atctttccat tgttggctac gtcttttctt 2115
 ttgccttgat gaacgttcta tgtatttcat cggatatata gcatattcca tttaggatgt 2175
 gtatttaatg catttagtaa tgacgataaa gtgttttttag tatgctttta gtctcttgta 2235
 actggggaga agcagtgttt ttttttttagg aaaggattat gcgacacaat aaaataagat 2295
 attctgtctg tagtgaatac atttctcatg tactaacact atttataata tatgattaaa 2355
 gatatttctt gttttattaa ataataagaa ataagatctc ctttatg 2402

<210> 45

<211> 605

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 45

Met Val Glu Gly Pro Gly Cys Thr Leu Asn Gly Glu Lys Ile Arg Ala
 1 5 10 15
 Arg Val Leu Pro Gly Gln Ala Val Thr Gly Val Arg Gly Ser Ala Leu
 20 25 30
 Arg Ser Leu Gln Gly Arg Ala Leu Arg Leu Ala Ala Ser Thr Val Val
 35 40 45
 Val Ser Pro Gln Ala Ala Ala Leu Asn Asn Asp Ser Ser Gln Asn Val
 50 55 60
 Leu Ser Leu Phe Asn Gly Tyr Val Tyr Ser Gly Val Glu Thr Leu Gly
 65 70 75 80
 Lys Glu Leu Phe Met Tyr Phe Gly Pro Lys Ala Leu Arg Ile His Phe
 85 90 95
 Gly Met Lys Gly Phe Ile Met Ile Asn Pro Leu Glu Tyr Lys Tyr Lys
 100 105 110
 Asn Gly Ala Ser Pro Val Leu Glu Val Gln Leu Thr Lys Asp Leu Ile
 115 120 125
 Cys Phe Phe Asp Ser Ser Val Glu Leu Arg Asn Ser Met Glu Ser Gln
 130 135 140
 Gln Arg Ile Arg Met Met Lys Glu Leu Asp Val Cys Ser Pro Glu Phe
 145 150 155 160

ES 2 617 434 T3

Ser Phe Leu Arg Ala Glu Ser Glu Val Lys Lys Gln Lys Gly Arg Met
 165 170 175

Leu Gly Asp Val Leu Met Asp Gln Asn Val Leu Pro Gly Val Gly Asn
 180 185 190

Ile Ile Lys Asn Glu Ala Leu Phe Asp Ser Gly Leu His Pro Ala Val
 195 200 205

Lys Val Cys Gln Leu Thr Asp Glu Gln Ile His His Leu Met Lys Met
 210 215 220

Ile Arg Asp Phe Ser Ile Leu Phe Tyr Arg Cys Arg Lys Ala Gly Leu
 225 230 235 240

Ala Leu Ser Lys His Tyr Lys Val Tyr Lys Arg Pro Asn Cys Gly Gln
 245 250 255

Cys His Cys Arg Ile Thr Val Cys Arg Phe Gly Asp Asn Asn Arg Met
 260 265 270

Thr Tyr Phe Cys Pro His Cys Gln Lys Glu Asn Pro Gln His Val Asp
 275 280 285

Ile Cys Lys Leu Pro Thr Arg Asn Thr Ile Ile Ser Trp Thr Ser Ser
 290 295 300

Arg Val Asp His Val Met Asp Ser Val Ala Arg Lys Ser Glu Glu His
 305 310 315 320

Trp Thr Cys Val Val Cys Thr Leu Ile Asn Lys Pro Ser Ser Lys Ala
 325 330 335

Cys Asp Ala Cys Leu Thr Ser Arg Pro Ile Asp Ser Val Leu Lys Ser
 340 345 350

Glu Glu Asn Ser Thr Val Phe Ser His Leu Met Lys Tyr Pro Cys Asn
 355 360 365

Thr Phe Gly Lys Pro His Thr Glu Val Lys Ile Asn Arg Lys Thr Ala
 370 375 380

Phe Gly Thr Thr Thr Leu Val Leu Thr Asp Phe Ser Asn Lys Ser Ser
 385 390 395 400

Thr Leu Glu Arg Lys Thr Lys Gln Asn Gln Ile Leu Asp Glu Glu Phe
 405 410 415

Gln Asn Ser Pro Pro Ala Ser Val Cys Leu Asn Asp Ile Gln His Pro

<400> 47
 gcttctccc agtacaaga gac 23
 <210> 48
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <400> 48
 10 gtctaccagg cattcgcttc at 22
 <210> 49
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <400> 49
 tcagctggac cacagccgca gcgt 24
 <210> 50
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 25 <400> 50
 tcagaaatcc tttcttga c 21
 <210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <400> 51
 ctagcctctg gaatccttc tctt 24
 35

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en (i) y (ii) a continuación:
 - (i) un péptido aislado de (a) o (b) a continuación:
 - 5 (a) un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 24, 33, 35, 41 y 43;
 - (b) un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 24, 33, 35, 41 y 43, en la que 1 o 2 aminoácidos están sustituidos, suprimidos, o añadidos, en el que el péptido tiene inducibilidad de CTL; y
 - (ii) un péptido aislado de (c) o (d) a continuación:
 - 10 (c) un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 5, 3, 4, 6, 11, 15, 17, 21 y 22;
 - (d) un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 5, 3, 4, 6, 11, 15, 17, 21 y 22, en la que 1 o 2 aminoácidos están sustituidos, suprimidos, o añadidos, en el que el péptido tiene inducibilidad de CTL.
- 15 2. El péptido aislado de la reivindicación 1, en el que el péptido tiene una o ambas de las siguientes características:
 - (a) el segundo aminoácido del término N de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 24, 33, 35, 41 o 43 está sustituido por el aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, metionina y triptófano; y
 - 20 (b) el aminoácido C-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 24, 33, 35, 41 o 43 está sustituido por el aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano y metionina.
3. El péptido aislado de la reivindicación 1, en el que el péptido tiene una o ambas de las siguientes características:
 - (a) el segundo aminoácido del término N de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 5, 3, 4, 6, 11, 15, 17, 21 o 22 está sustituido por el aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina y metionina; y
 - 25 (b) el aminoácido C-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 5, 3, 4, 6, 11, 15, 17, 21 o 22 está sustituido por el aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina y leucina.
4. El péptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un nonapéptido o decapeptido.
5. El péptido aislado de la reivindicación 1 o 4, en el que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 5, 3, 4, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 y 43.
- 30 6. Un polinucleótido aislado que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una composición que comprende uno o más péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o uno o más polinucleótidos de la reivindicación 6.
8. Una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o uno o más polinucleótidos de la reivindicación 6.
- 35 9. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el polinucleótido según la reivindicación 6, o la composición según la reivindicación 7 u 8, para uso como medicamento.
10. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el polinucleótido según la reivindicación 6, o la composición según la reivindicación 7 u 8, para uso en el tratamiento o prevención de cáncer, y/o para prevenir la recurrencia post-operatoria del mismo.
- 40 11. El péptido, polinucleótido, o composición para uso en el tratamiento o prevención de cáncer y/o para prevenir la recurrencia post-operatoria del mismo según la reivindicación 10, para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A2.
12. Un método in vitro para inducir una célula presentadora de antígeno (APC) con inducibilidad de CTL, que comprende un etapa seleccionada del grupo que consiste en:
 - 45 (a) poner en contacto una APC con el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 in vitro, y

(b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en una APC in vitro.

13. Un método in vitro para inducir CTL mediante un método que comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

5 (a) co-cultivar con las APC células T CD8 positivas, que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;

(b) co-cultivar células T CD8 positivas con exosomas, que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y

10 (c) introducir en una célula T un gen que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la subunidad del receptor de células T (TCR) que se une al péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

14. Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

15. La APC de la reivindicación 14, que es inducida por el método de la reivindicación 12.

15 16. Un CTL aislado que selecciona como diana el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

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

18. Un exosoma que presenta un complejo que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un antígeno HLA.

19. Un anticuerpo o fragmento del mismo contra el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

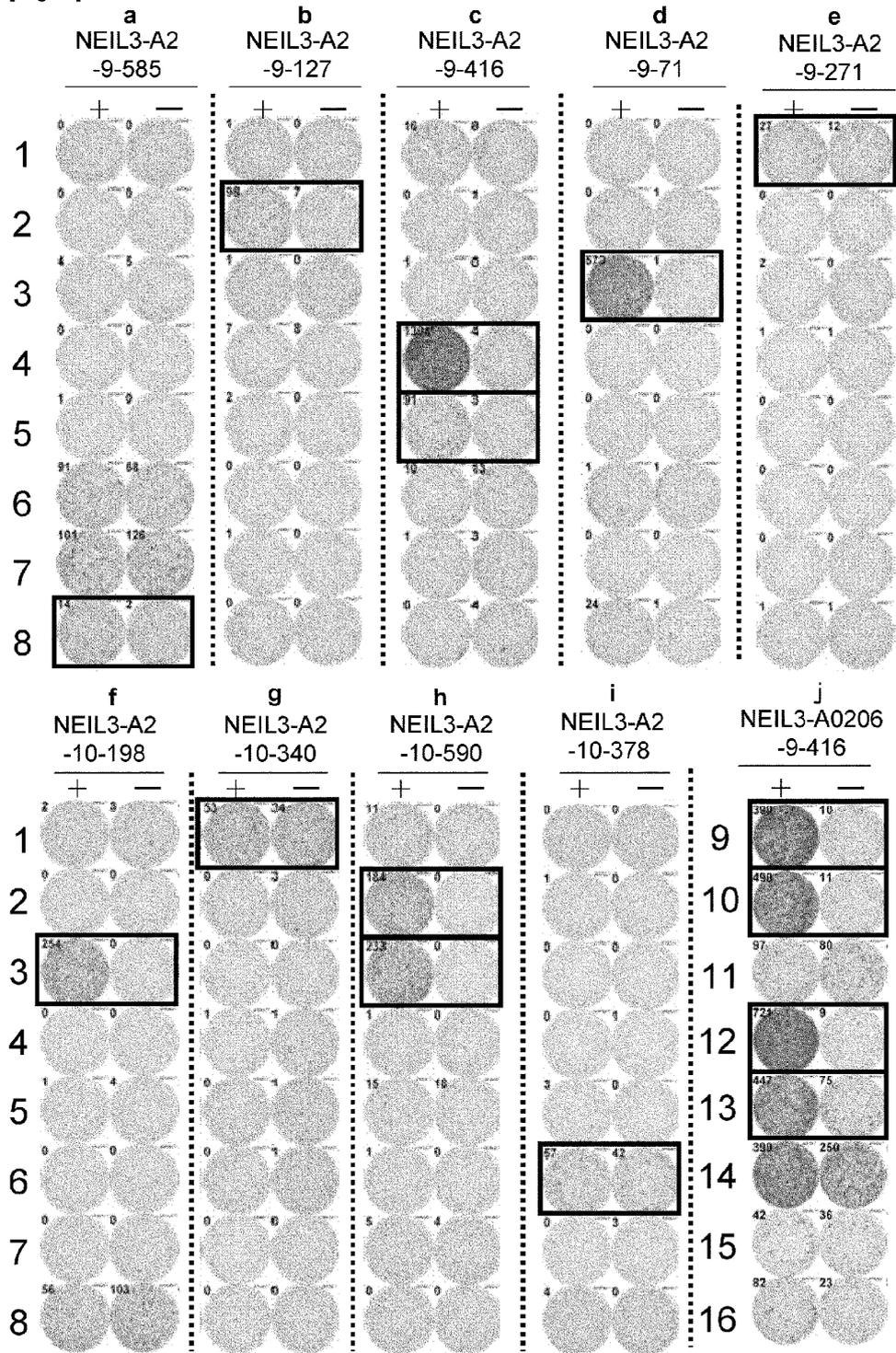
20 20. Un vector que comprende una secuencia nucleotídica que codifica los péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

21. Una célula hospedante transformada o transfectada con un vector de expresión según la reivindicación 20.

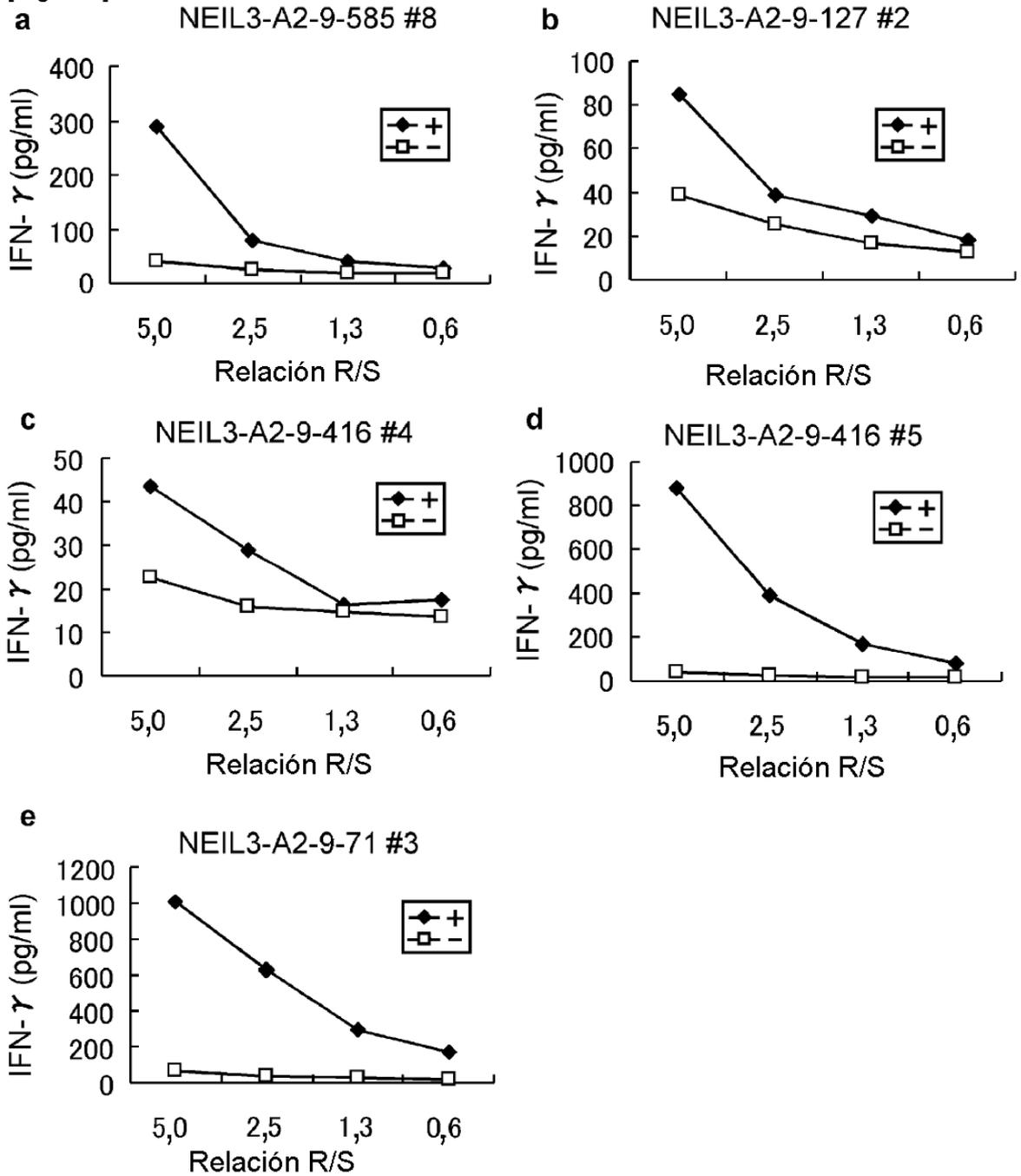
22. Un kit de diagnóstico que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el polinucleótido de la reivindicación 6, o el anticuerpo de la reivindicación 19.

25

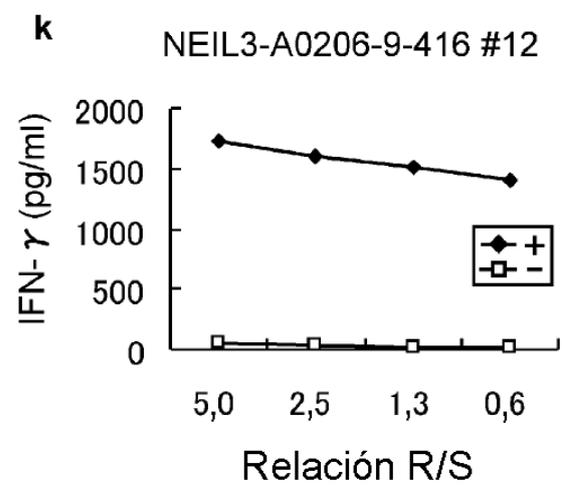
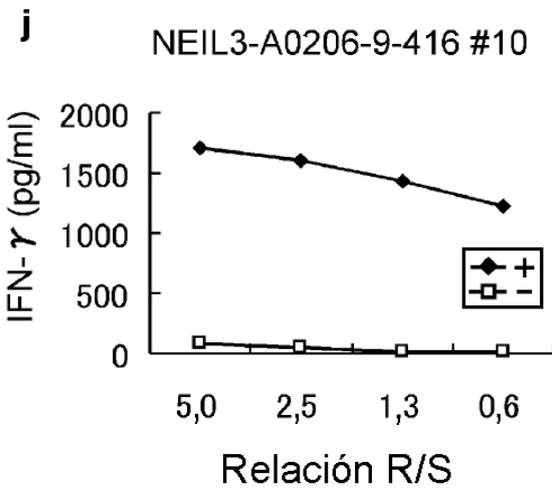
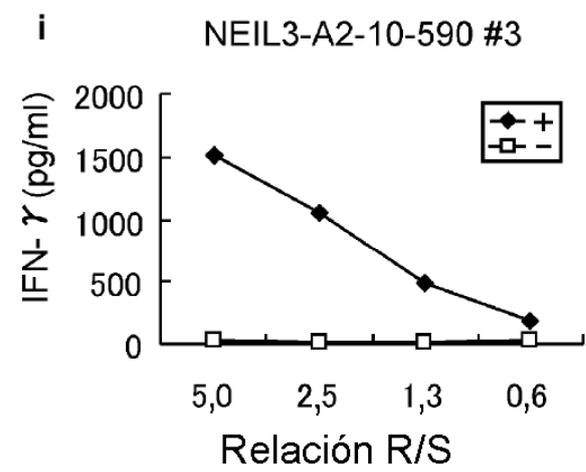
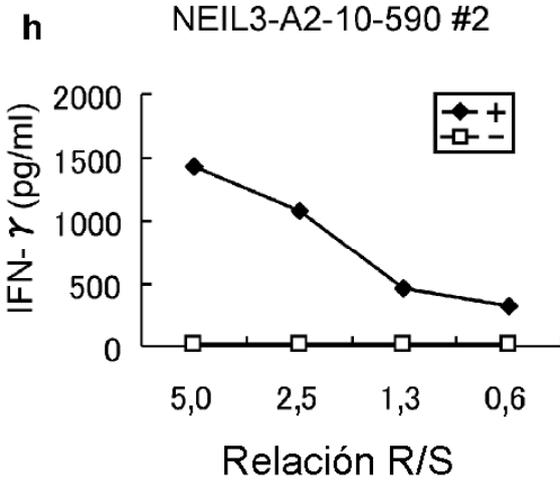
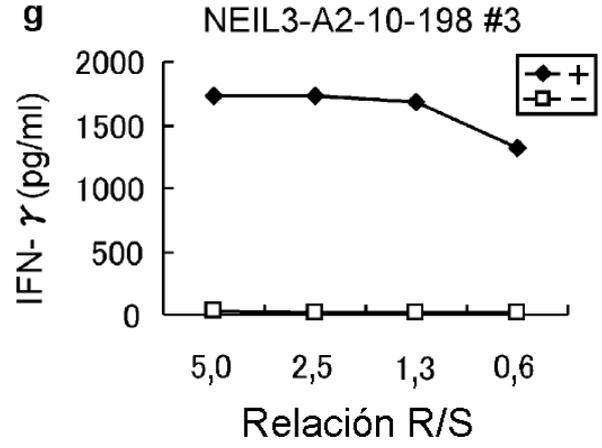
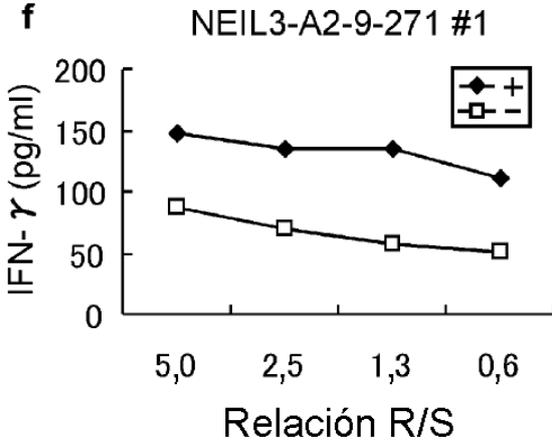
[Fig. 1]



[Fig. 2-1]

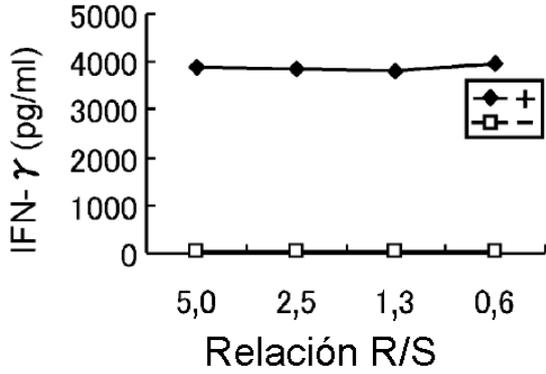


[Fig. 2-2]

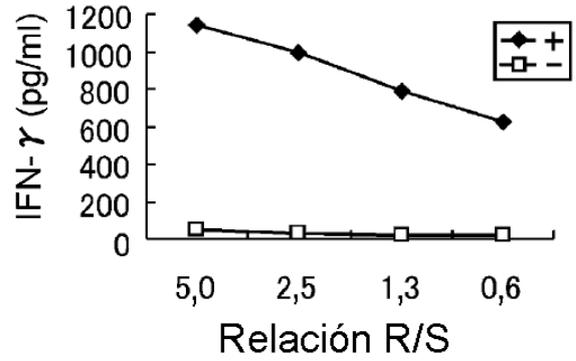


[Fig. 3]

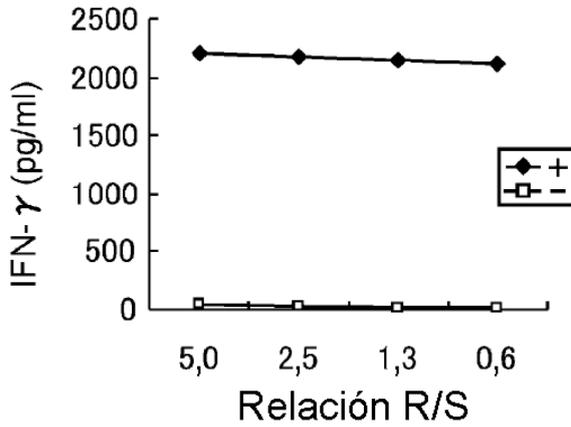
a NEIL3-A02-9-416 #6 clon #58



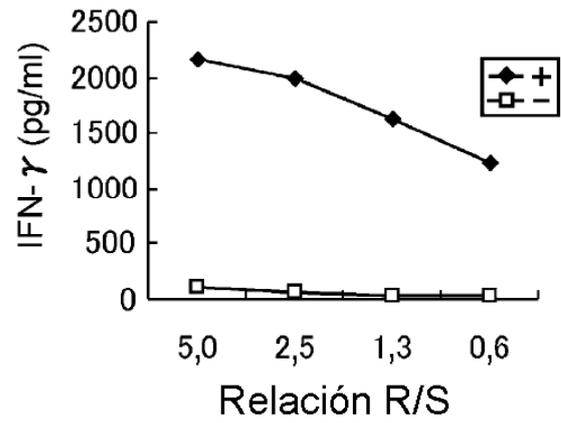
b NEIL3-A02-9-71 #3 clon #324



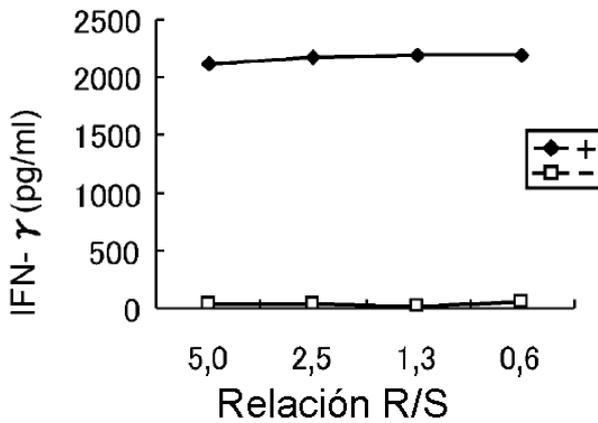
c NEIL3-A02-10-198 #3 clon #109



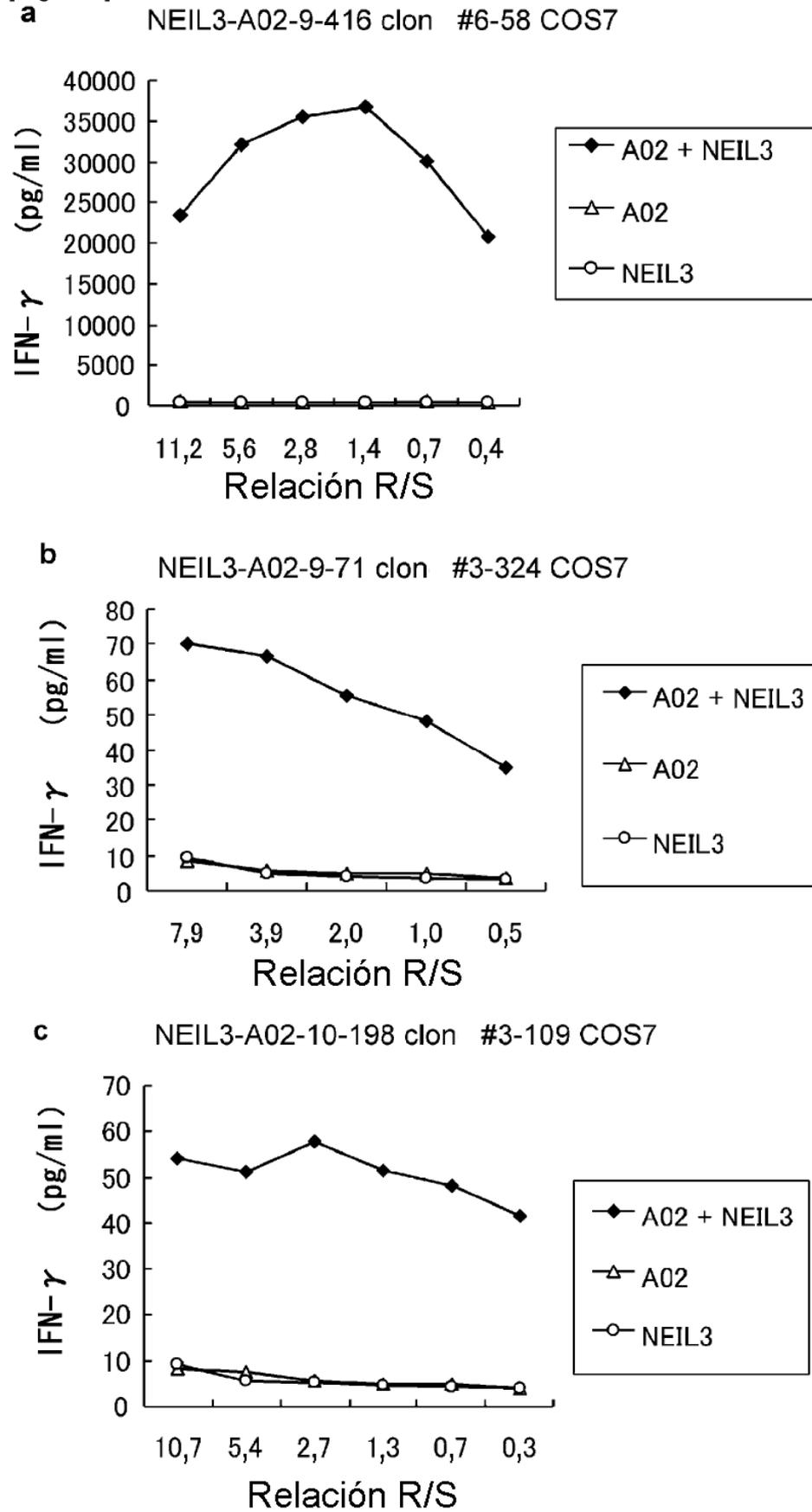
d NEIL3-A02-10-590 #3 clon #22



e NEIL3-A0206-9-416 #12-5

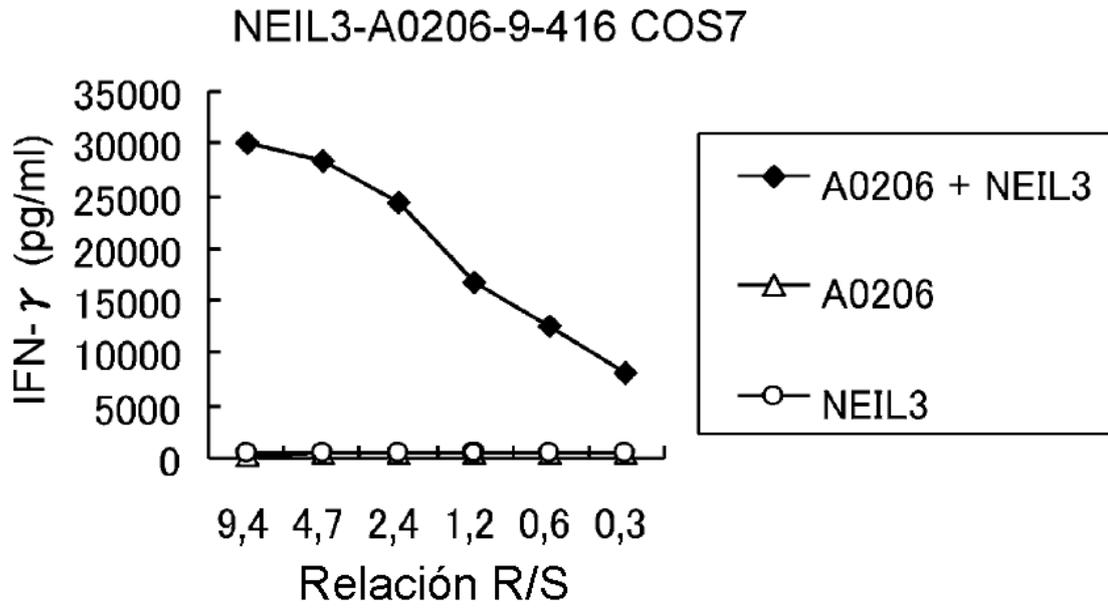


[Fig. 4-1]



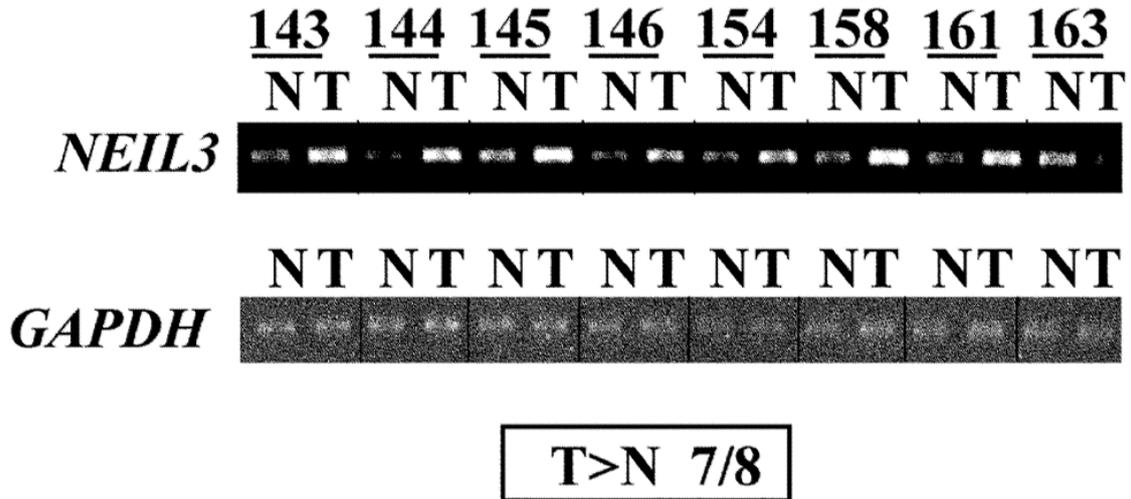
[Fig. 4-2]

d



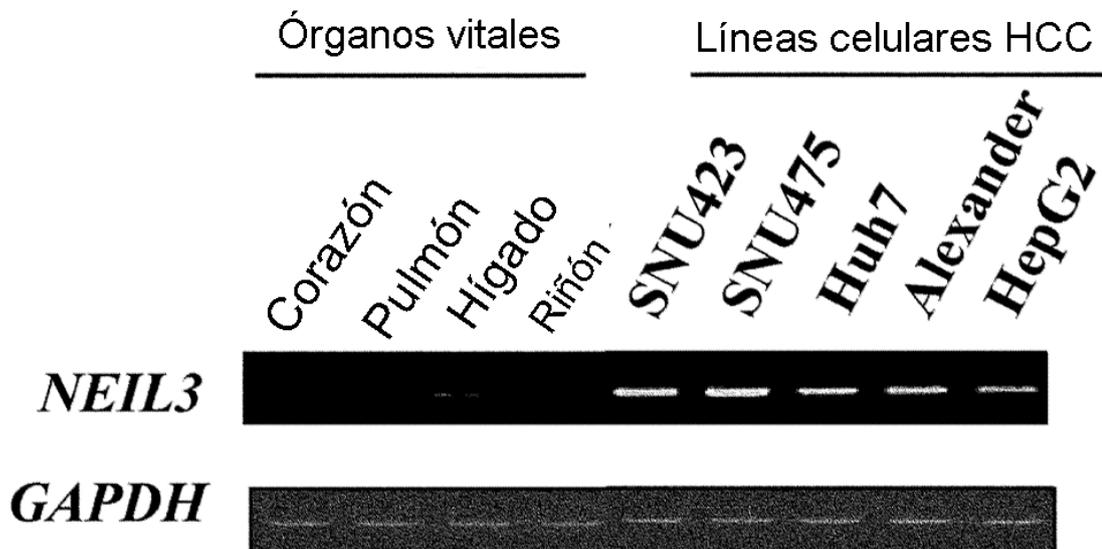
[Fig. 5]
a

RT-PCR semicuantitativa

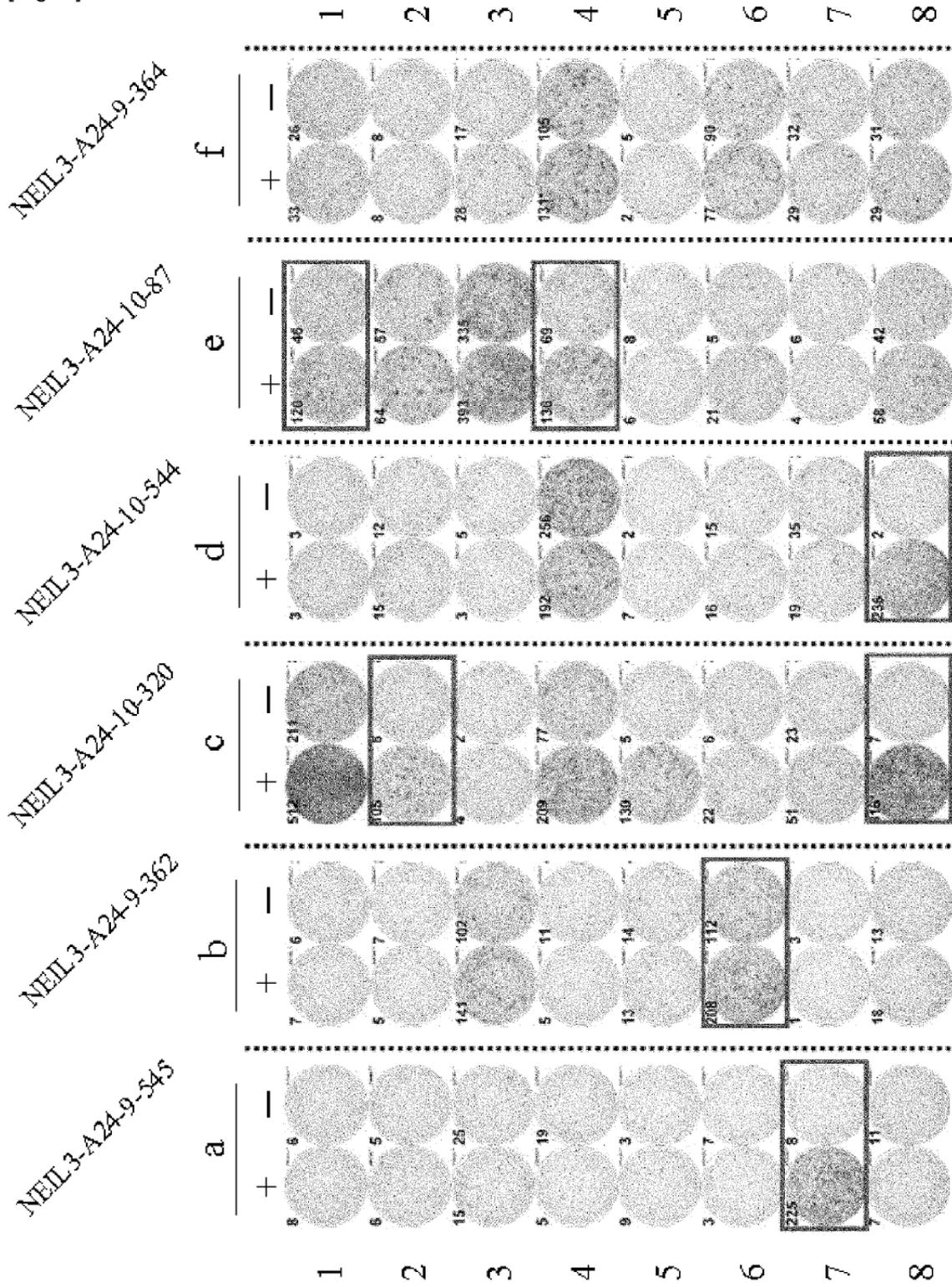


b

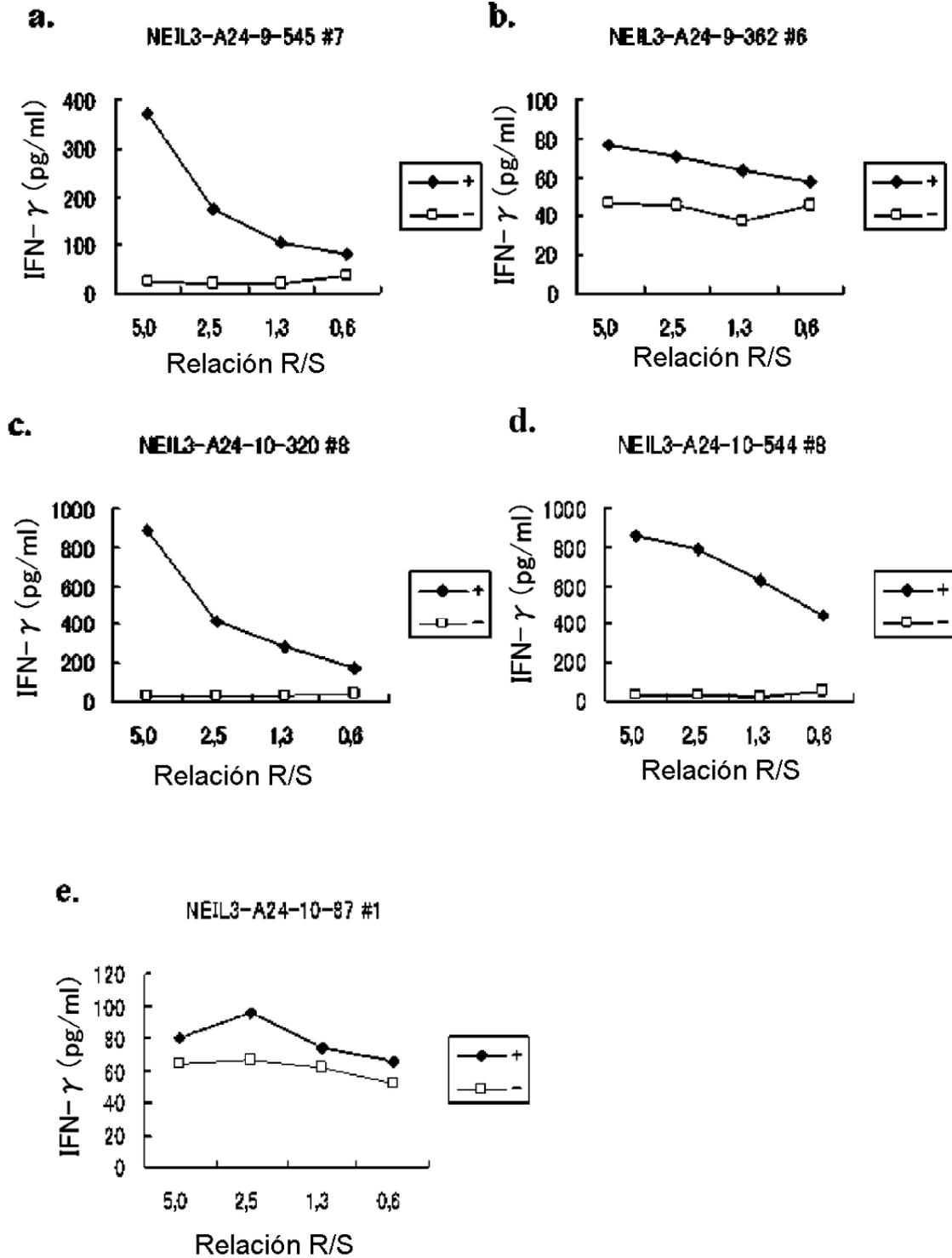
RT-PCR semicuantitativa
(ARN purificado mediante poly A)



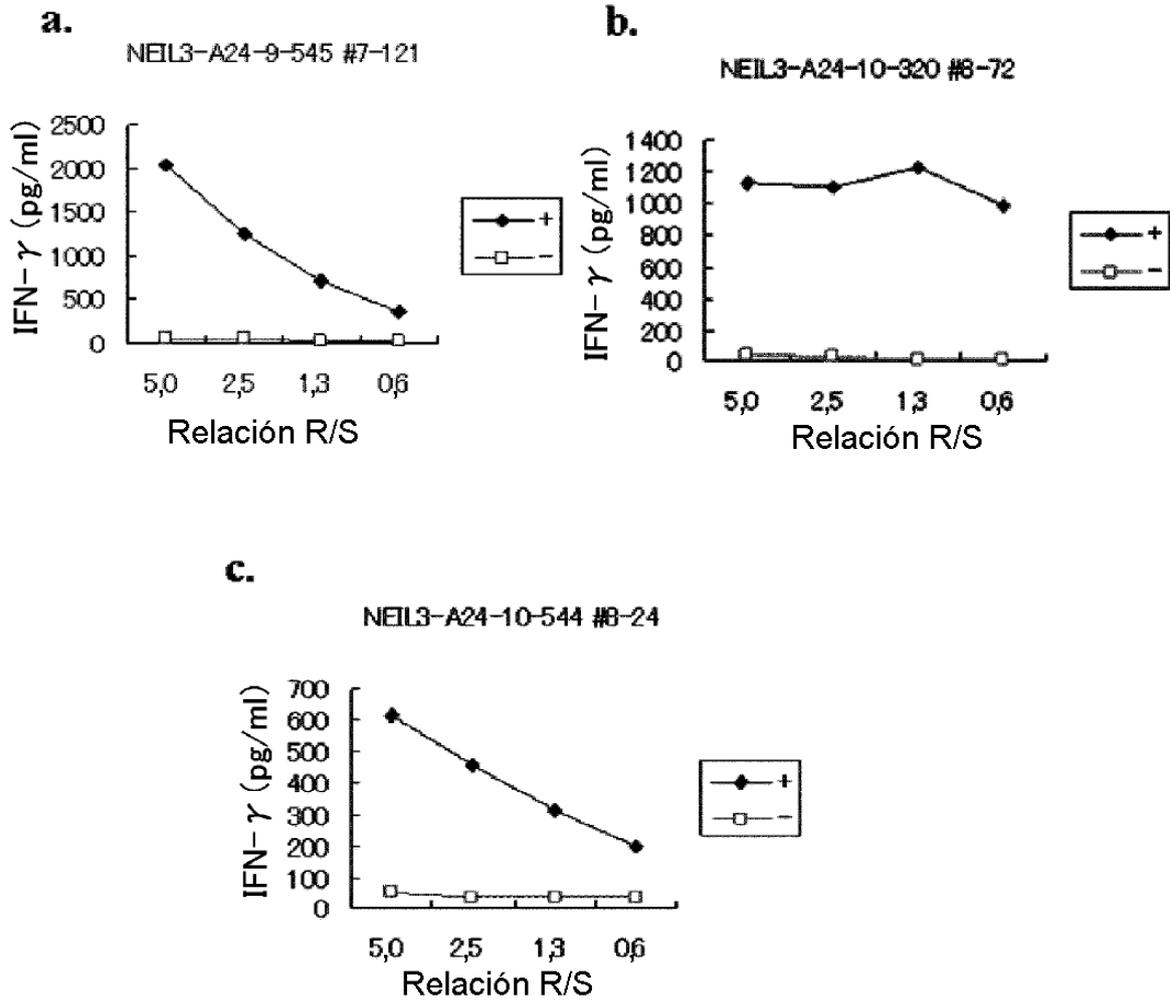
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

