(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 623 447**

(51) Int. CI.:

A61K 39/00 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2008 PCT/DK2008/050324**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2009 WO09076966**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2008 E 08862897 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2234635**

(54) Título: **Inmunoterapia basada en RhoC**

(30) Prioridad:

19.12.2007 DK 200701844

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2017

(73) Titular/es:

RHOVAC APS (100.0%)
CATHERINE BOOTHS VEJ 17
2650 HVIDOVRE, DK

(72) Inventor/es:

ANDERSEN, MADS HALD y
STRATEN, PER THOR

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Inmunoterapia basada en RhoC

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al campo de la profilaxis y la terapia del cáncer metastásico. En particular, se proporciona una proteína; familia del gen de homología Ras, miembro C (RhoC) o fragmentos peptídicos de los mismos que son capaces de provocar respuestas inmunitarias contra el cáncer. Específicamente, la invención se refiere al uso de RhoC o péptidos derivados del mismo o linfocitos T específicos de RhoC para el tratamiento del cáncer metastásico. Por lo tanto, los linfocitos T específicos de RhoC transferidos o inducidos *in vivo* por vacunación se describen como un tratamiento del cáncer.

También se proporciona el uso de RhoC y fragmentos peptídicos inmunógenos del mismo en el tratamiento, diagnóstico y pronóstico del cáncer.

Antecedentes de la invención

El desarrollo de metástasis en el cáncer plantea un obstáculo importante en el tratamiento exitoso del cáncer. La mayoría de las muertes por cáncer son causadas por el desarrollo de metástasis.

La búsqueda de proteínas responsables de la metástasis ha implicado la familia de genes de homología de Ras GTPasa RhoC. Se ha sugerido que la sobreexpresión de RhoC desempeña un papel en el desarrollo de la metástasis. Aunque una comprensión precisa de cómo RhoC ejerce sus efectos metastásicos sigue siendo esquiva, se ha encontrado que se sobreexpresa en muchos cánceres, incluyendo cáncer de ovario, cáncer de pulmón y melanomas.

El proceso por el cual el sistema inmunitario de mamífero reconoce y reacciona a materiales externos o extraños es complejo. Una faceta importante del sistema es la respuesta de los linfocitos T. Esta respuesta requiere que los linfocitos T reconozcan e interactúen con complejos de moléculas de superficie celular denominadas antígenos de leucocitos humanos (HLA) que constituyen el complejo de histocompatibilidad mayor humano (MHC) y péptidos. Los péptidos se obtienen a partir de moléculas más grandes, que son procesadas por las células que presentan antígeno, que a su vez presentan la molécula HLA/MHC. La interacción de linfocitos T y complejos de HLA/péptido está restringida, requiriendo un linfocito T que es específico para una combinación particular de una molécula de HLA y un péptido. Si no existe un linfocito T específico, no hay respuesta de los linfocitos T incluso si su complejo asociado está presente. De forma similar, no hay respuesta si el complejo específico está ausente, pero el linfocito T está presente.

El documento WO 99/63232 desvela un método para inhibir la entrada y propagación vírica. Los péptidos usados en el documento WO 99/63232 deben contener el dominio de unión a proteína de fusión vírica de RhoA localizado en los residuos aminoácidos 67-109 de la proteína RhoA. Dichos péptidos se administran a un sujeto que padece una infección vírica.

El mecanismo mediante el cual los linfocitos T reconocen anomalías celulares también se ha visto implicado en el cáncer. Por ejemplo, en el documento WO92/20356, se desvela una familia de genes que se procesan en péptidos que a su vez, se expresan sobre las superficies celulares, y pueden conducir a la lisis de las células tumorales mediante linfocitos T citotóxicos específicos (CTL, células CD8). Estos genes se denominan como de la familia MAGE y se dice que codifican los "precursores de antígenos de rechazo tumoral" o moléculas "TRAP", y los péptidos derivados de la misma se denominan "antígenos de rechazo de tumor" o "TRA".

En el documento WO 94/05304, se desvelan nonapéptidos que se unen a la molécula HLA-A1. Esta referencia desvela que, dada la especificidad conocida de los péptidos particulares para las moléculas HLA particulares, se debería esperar que un péptido particular se una a una molécula HLA, pero no a otras. Esto es significativo, ya que los diferentes individuos tienen diferentes fenotipos HLA. Como resultado, mientras que la identificación de un péptido particular como un compañero para una molécula HLA específica tiene ramificaciones de diagnóstico y terapéuticas, éstas sólo son relevantes para individuos con ese fenotipo HLA particular.

Por lo tanto, está bien establecido que los epítopos peptídicos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) pueden reconocerse como antígenos por CTL en el contexto de moléculas MHC. Sin embargo, aunque

generalmente se acepta que la mayoría de los tumores, si no todos, son antigénicos, únicamente unos pocos son realmente inmunógenos en el sentido de que el avance del tumor es fácilmente controlada por el sistema inmunitario.

Para superar esta limitación, se han iniciado varios estudios inmunoterapéuticos, por ejemplo, vacunaciones con péptidos derivados de TAA. Para el melanoma, el tumor para el cual se ha caracterizado el mayor número de ATT definidos por CTL, se han inducido potentes respuestas CTL contra antígenos mediante vacunación y algunos pacientes experimentaron una remisión completa de su enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los epítopos peptídicos utilizados en estos ensayos de vacunación son específicos de melanocitos, y estos péptidos no pueden aplicarse para tumores de origen no melanocítico. Además, la expresión de estos TAA es heterogénea entre tumores de diferentes pacientes e incluso puede variar entre las metástasis obtenidas de un paciente. Sin embargo, durante los últimos dos años se ha identificado cierto número de antígenos peptídicos específicos de tumores, que se expresan en varios cánceres diferentes, es decir HER-2, Muc-1 y telomerasa.

Durante la última década, numerosos ensayos clínicos han demostrado la viabilidad de la vacunación específica de péptidos para inducir las respuestas de los linfocitos T antitumorales en pacientes con cáncer. El curso clínico de los pacientes, sin embargo, en la mayoría de los casos no mejoró. Esta discrepancia se ha explicado en numerosos casos por mecanismos de escape inmune de las células tumorales.

Al igual que las otras Rho GTPasas, RhoC afecta a varios aspectos del control del crecimiento, y la organización citoesquelética en respuesta a factores extracelulares. Datos más recientes sugieren un papel más diferencial en el que RhoC ha demostrado desempeñar un papel importante en la metástasis de las células cancerosas. Por lo tanto, varias líneas de evidencia demuestran una alta expresión de RhoC en las células cancerosas, y que el potencial metastásico de las células cancerosas depende de la expresión de RhoC. La expresión selectiva aumentada de RhoC se ha descrito en cánceres metastásicos.

Resumen de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que los péptidos restringidos a MHC de Clase I y Clase II pueden derivarse de RhoC, siendo dichos péptidos capaces de unirse a moléculas MHC de Clase I y Clase II. Sorprendentemente, los inventores encontraron que estos auto-antígenos eran capaces de provocar una respuesta espontánea de los linfocitos T en pacientes que padecen enfermedades cancerosas en particular, enfermedades de cáncer metastásico. Estos hallazgos abren el camino para nuevos enfoques terapéuticos y de diagnóstico que pueden ser aplicables en general en el control de las enfermedades cancerosas metastásicas.

Ha habido dificultad para encontrar dianas de proteína apropiadas específicamente para diseñar una vacuna contra la metástasis. La presente invención desvela nuevos péptidos RhoC, algunos de los cuales son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (CD8) y algunos de los cuales son reconocidos por los linfocitos T auxiliares (CD4). Estos epítopos están restringidos a las proteínas MHC de Clase II y Clase I, respectivamente.

Un enfoque de la presente invención es, por lo tanto, provocar inmunidad a los linfocitos T específicos de tumor, es decir, la vacunación con epítopos restringidos a MHC de clase I y clase II a pesar de que los tumores generalmente no expresan MHC de clase II. Esto se basa en el hallazgo de que la inducción y la eficacia de la respuesta antitumoral inducida por vacuna a RhoC puede requerir la cooperación de células T_h positivas a CD4 específicas de tumor.

Por lo tanto, en un aspecto, un factor importante que impulsa el desarrollo de las vacunas puede ser el deseo de dirigir múltiples antígenos tumorales, por ejemplo, mediante el diseño de vacunas que comprenden o codifican una colección de epítopos CTL y de células T_h cuidadosamente seleccionados. Las vacunas con múltiples epítopos pueden constituir una forma eficaz de aumentar la inmunidad contra epítopos derivados de varios antígenos diferentes sin la necesidad de introducir (genes que codifican) proteínas potencialmente peligrosas tales como oncoproteínas. Dichas vacunas también permiten la inducción selectiva de inmunidad contra epítopos de linfocitos T subdominantes y crípticos, que pueden ser especialmente importantes en el caso de autoantígenos asociados a tumor para los cuales puede existir tolerancia para los epítopos que se presentan de forma prominente en tejidos normales. Además, las células que presentan antígeno pueden dejar de presentar ciertos epítopos que se expresan en células tumorales debido a las diferencias funcionales entre los inmunoproteasomas de las células que presentan antígeno y los proteasomas "constitutivos" presentes en la mayoría de las células tumorales.

En el caso de las vacunas basadas en péptidos, los epítopos se pueden administrar en una forma "preparada para

MHC", que permite la presentación a través de carga exógena independientemente de la captación y procesamiento del antígeno por células que presentan antígeno del huésped. Los péptidos de la presente invención comprenden ambos péptidos en una forma corta "preparada para MHC" y en una forma mayor que requiere procesamiento por el proteasoma, proporcionando así una composición de vacuna más compleja que puede dirigirse a múltiples antígenos tumorales. Cuanto más grupos diferentes de HLA se dirigen por una vacuna, mayor es la probabilidad de que la vacuna funcione en diversas poblaciones.

La presente invención desvela que RhoC es como una diana adecuada para la inmunoterapia contra el cáncer metastásico. La expresión de RhoC se ha propuesto para promover la metástasis, que potencialmente hace de RhoC una diana atractiva para la vacunación debido a un escape inmune por la regulación descendente o la pérdida de expresión de esta proteína puede alterar la metástasis. Los inventores buscaron y sorprendentemente detectaron reactividad espontánea de los linfocitos T en linfocitos de sangre periférica (PBL) contra péptidos derivados de RhoC en pacientes de melanoma usando un ensayo ELISPOT.

Por consiguiente, la presente invención pertenece en un primer aspecto, a una composición de vacuna capaz de provocar una respuesta inmune contra un cáncer metastásico que expresa RhoC de la SEQ ID no 1 cuando se administra a un individuo que padece un cáncer metastásico que expresa RhoC, comprendiendo dicha composición de vacuna

a) RhoC de la SEQ ID no 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 92 % de identidad con la SEQ ID NO 1 o un fragmento peptídico inmunogénicamente activo que comprende una secuencia consecutiva de dicho RhoC de la SEQ ID no. 1 o un ácido nucleico que codifica dicho RhoC o dicho fragmento peptídico; donde el fragmento peptídico comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 8 a 60 aminoácidos de RhoC de la SEQ ID no 1, donde se han sustituido como mucho tres aminoácidos de la SEQ ID no. 1, que es diferente de las secuencias de RhoA de la SEQ ID NO 2 y RhoB de la SEQ ID NO 3 por al menos un aminoácido, y

b) un adyuvante para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer metastásico que expresa RhoC.

En un segundo aspecto, la presente invención pertenece a un kit de piezas que comprende la composición de vacuna descrita anteriormente y un agente anti-canceroso adicional para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer metastásico que expresa RhoC.

Se describen RhoC o un fragmento peptídico del mismo para su uso como un medicamento en la prevención o tratamiento del cáncer metastásico.

En particular, se describe un fragmento peptídico inmunogénicamente activo aislado que consiste en 18 a 25 aminoácidos consecutivos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional de dicho fragmento peptídico, donde se han sustituido como mucho tres aminoácidos, donde el fragmento peptídico contiene al menos uno de los residuos aminoacídicos 143, Q123, R140, S141, S152, L157, E165, G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o 1192 de RhoC de la SEQ ID no 1.

Además, se describen fragmentos peptídicos inmunogénicamente activos aislados que consisten en 8 a 10 aminoácidos consecutivos de RhoC de la SEQ ID no 1 o un homólogo funcional de dicho fragmento peptídico, donde se han sustituido como mucho tres aminoácidos, donde el fragmento peptídico contiene al menos uno de los residuos aminoacídicos 143, Q123, R140, S141, S152, L157, E165, G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o 1192 de RhoC de la SEQ ID no 1.

Además, se describen fragmentos peptídicos inmunogénicamente activos aislados que consisten en 26 a 75 aminoácidos consecutivos de RhoC de la SEQ ID no 1 o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos, donde el fragmento peptídico contiene al menos uno de los residuos aminoacídicos I43, Q123, R140, S141, S152, L157, E165, G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o I192 de RhoC de la SEQ ID no 1

Por lo tanto, se describen fragmentos peptídicos inmunogénicamente activos de RhoC para su uso como un medicamento en la prevención o tratamiento del cáncer metastásico.

En particular, se describen en el presente documento fragmentos peptídicos inmunogénicamente activos aislados derivados de RhoC para su uso como un medicamento en la prevención o tratamiento del cáncer metastásico.

En un aspecto adicional, se describe una composición farmacéutica que comprende los fragmentos de proteína y/o peptídicos anteriores.

Es también un aspecto de la divulgación proporcionar una composición de vacuna que comprende RhoC o un fragmento peptídico inmunogénicamente activo del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento de proteína o dicho fragmento peptídico para su uso como un medicamento en la prevención o tratamiento de cáncer metastásico.

Aún en aspectos adicionales, la divulgación se refiere un kit de diagnóstico para el diagnóstico *ex vivo* o *in situ* de la presencia en un paciente con cáncer de linfocitos T en PBL o en tejido tisular que son reactivas con RhoC, comprendiendo el kit el fragmento peptídico de la invención como se ha definido anteriormente; un complejo de un fragmento peptídico de la invención y una molécula HLA de Clase I o clase II o un fragmento de dicha molécula.

También es un objetivo de la divulgación proporcionar un método para detectar en un paciente con cáncer metastásico la presencia de linfocitos T reactivos con RhoC, comprendiendo el método poner en contacto un tejido tumoral o una muestra de sangre con un complejo de la invención como se ha definido anteriormente, y detectar la unión del complejo al tejido o a las células sanguíneas.

Además, se describe una molécula que es capaz de unirse específicamente a un fragmento peptídico de la invención y una molécula que es capaz de bloquear dicha unión.

En otro aspecto, la divulgación pertenece a un método de tratamiento de una enfermedad de cáncer metastásico, comprendiendo el método administrar a un paciente que padece la enfermedad una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la invención, la molécula de la invención que es capaz de unirse específicamente a un fragmento peptídico de la invención y/o una molécula de la invención que es capaz de bloquear dicha unión.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona el uso de la proteína o fragmento peptídico como se define en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de cáncer.

Adicionalmente, se describe en el presente documento RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO 1 o un fragmento peptídico inmunogénicamente activo que comprende una secuencia consecutiva de dicho RhoC o dicho homólogo funcional del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho RhoC o dicho fragmento peptídico para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer metastásico.

Se describe adicionalmente en el presente documento el fragmento peptídico como se define en el presente documento o la composición de vacuna como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer metastásico.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para controlar la inmunización, comprendiendo dicho método las etapas de

i) proporcionar una muestra de sangre de un individuo
ii) proporcionar RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO 1 o un fragmento peptídico inmunogénicamente activo que comprende una secuencia consecutiva de dicho RhoC o dicho homólogo funcional del mismo o un ácido nucleico que codifica dicho RhoC o dicho fragmento peptídico.
iii) determinar si dicha muestra de sangre comprende anticuerpos o linfocitos T que comprenden receptores de linfocitos T que se unen específicamente a la proteína o el péptido
iv) determinar así si una respuesta inmune a dicha proteína o péptido se ha elevado en dicho individuo.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a linfocitos T aislados que son capaces de interactuar específicamente con RhoC o fragmentos peptídicos del mismo y un método para producir dichas linfocitos T.

Todavía otro aspecto de la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el clon aislado de linfocitos T específicos de RhoC y un método para tratar y/o prevenir el cáncer metastásico que comprende administrar a un individuo que lo necesite una composición que comprende los linfocitos T específicos de RhoC.

Descripción detallada

Es un objetivo principal de la presente invención proporcionar RhoC o un fragmento de péptido inmunológicamente activo del mismo para su uso como medicamento en la prevención o tratamiento de un cáncer.

Las Rho GTPasas

Los tres miembros de la familia Rho humana RhoA, B y C son altamente homólogos, siendo RhoA y RhoC los más homólogos. RhoA y RhoC tienen ambos 193 aminoácidos de largo, mientras que RhoC consiste en 191 aminoácidos. A pesar de que RhoA y RhoC son altamente homólogos, existe una extensa heterogeneidad en el C-terminal de la secuencia entre RhoA y RhoC. La Figura 1 muestra una alineación de RhoA; RhoB y RhoC, en la que se marcan los residuos idénticos ("*") y los residuos con sustituciones conservativas (":") y semiconservativas (".").

La mitad N-terminal de Rho GTPasas contiene la mayoría de los aminoácidos implicados en la unión a GTP e hidrólisis, junto con las regiones Switch 1 y 2 que cambian la conformación entre los estados unidos a GTP y unidos a GDP (Bishop, A. L., Hall, A., Biochem. J. 2000, 348 (Pt. 2): 241).

El C-terminal de las GTPasas de la familia Rho es esencial para la localización correcta de las proteínas. Se modifica después de la traducción por prenilación de una cisteína C-terminal conservada, seguida de metilación y eliminación proteolítica de los últimos tres aminoácidos (Shao, F., Dixon, J. E., Adv. Exp. Med. Biol. 2003, 529: 79). El grupo prenilo ancla las GTPasas en membranas y esta modificación es esencial para el crecimiento celular, la transformación y las funciones de organización del citoesqueleto de las proteínas Rho (Allal, C., et al., J. Biol. Chem. 2000, 275: 31001). La prenilación de proteínas Rho parece ser importante para su estabilidad, los inhibidores de enzimas que sintetizan grupos prenilo inducen una disminución en los niveles de proteína Rho y su función (Stamatakis, K., et al., J. Biol. Chem 2002, 277: 49389).

RhoA

RhoA se sobreexpresa en varios cánceres humanos, y parece que la sobreexpresión de RhoA se correlaciona con un mal pronóstico. Varios informes también demuestran la implicación de RhoA en la angiogénesis, lo que facilita el crecimiento de tumores sólidos y metástasis (Abecassis et al., 2003). Mientras que la activación del ensamblaje del citoesqueleto con más frecuencia da como resultado el crecimiento o la extensión de una célula, en las neuronas, se ha demostrado que las proteínas de la familia Rho inducen la retracción de las neuritas y provocan el redondeo celular.

Se describen fragmentos peptídicos comunes tanto a RhoA de la SEQ ID NO 2 como a RhoC de la SEQ ID NO 1. Sin embargo, en aspectos preferidos, los fragmentos peptídicos de la divulgación son específicos de RhoC humano de la SEQ ID NO 1 únicamente.

RhoC

Los datos recientes han mostrado que RhoC desempeña un papel importante en la metástasis de las células cancerosas. Los estudios han indicado que la señalización celular dependiente de proteína Rho podría ser importante para la transformación maligna. RhoC ha demostrado estar involucrado en la invasión del cáncer en melanoma, cáncer de mama inflamatorio (Clark et al., 2000; Kleer et al., 2002), y cáncer de ovario (Horiuchi et al., 2003).

En general, ha sido difícil diseñar vacunas contra el cáncer dirigidas a auto-antígenos, ya que el sistema inmunitario rara vez provoca una respuesta contra las "auto-proteínas". Sorprendentemente, los péptidos RhoC de la presente invención eran capaces de provocar una respuesta espontánea de los linfocitos T en pacientes que padecen enfermedades cancerosas en particular, enfermedades de cáncer metastásico.

La presente divulgación muestra que RhoC es como una diana adecuada para la inmunoterapia contra el cáncer metastásico. La expresión de RhoC se ha propuesto para promover la metástasis, que potencialmente hace de RhoC una diana atractiva para la vacunación debido a un escape inmune por la regulación descendente o la pérdida de expresión de esta proteína puede alterar la metástasis. Los inventores detectaron sorprendentemente la reactividad espontánea de linfocitos T en linfocitos de sangre periférica (PBL) contra péptidos derivados de RhoC en pacientes de melanoma usando un ensayo ELISPOT, lo que demuestra que los fragmentos peptídicos RhoC pueden ser epítopos de linfocitos T útiles.

En un aspecto preferido de la divulgación, RhoC es RhoC humano, más preferiblemente RhoC humano de la SEQ ID NO 1.

En aspectos preferidos de la divulgación, los péptidos RhoC se seleccionado de residuos aminoacídicos, que difieren de la secuencia de RhoB. En aspectos más preferidos, los péptidos RhoC son péptidos que comprenden residuos aminoacídicos, que difieren de la secuencia tanto de RhoA como de RhoB. Por consiguiente, en realizaciones muy preferidas, los fragmentos peptídicos de la divulgación contienen al menos uno de los residuos aminoacídicos I43, Q123, R140, S141, S152, L157, E165, G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o I192 de RhoC de la SEQ ID no 1.

Se describen los péptidos RhoC que comprenden residuos aminoacídicos, que difieren de la secuencia de RhoB, pero son iguales que la secuencia de RhoA. Por consiguiente, se describen los fragmentos peptídicos que contienen al menos uno de los residuos aminoacídicos L81, M82, C83, F84, S85, I86, D87, S88, P89, D90, S91, L92, E93, N94, I95, K98, W99, T100, P101, E102, V103, K104, H105, F106, C107, P108, N109, P111, I112, 1113, V115, G116, N117, K118, K119, T127, R129, E142, E143, D146, N149, F154, D155, G166, V167, R168, E169, V170, F171, E172, M173, A174, T175, R176, A177, L179, Q180, R182, K185, G189, C190.

Como se describe anteriormente en el presente documento, RhoC difiere principalmente de RhoA y RhoB en la parte C-terminal de la secuencia. Dado que únicamente RhoC parece tener una influencia sobre el potencial metastásico de un tumor, los aspectos preferidos se refiere a péptido RhoC que se obtienen a partir de los 120 residuos más C-terminales de RhoC, tal como los 100 residuos más C-terminales de RhoC, por ejemplo, los 75 residuos más C-terminales de RhoC, tales como 52 residuos más C-terminales de RhoC, por ejemplo, los 40 residuos más C-terminales de RhoC, tal como los 30 residuos más C-terminales de RhoC, por ejemplo, los 25 residuos más C-terminales de RhoC, tal como los 24 residuos más C-terminales de RhoC, tal como los 23 residuos más C-terminales de RhoC, por ejemplo, los 22 residuos más C-terminales de RhoC, tal como los 21 residuos más C-terminales de RhoC, tal como los 20 residuos más C-terminales de RhoC, por ejemplo, los 19 residuos más C-terminales de RhoC, tal como los 18 residuos más C-terminales de RhoC, tal como los 17 residuos más C-terminales de RhoC, tal como los 16 residuos más C-terminales de RhoC, por ejemplo, los 15 residuos más C-terminales de RhoC, tal como los 14 residuos más C-terminales de RhoC de la SEQ ID NO 1. Lo más preferido es un péptido que consiste en los 20 residuos más C-terminales de RhoC de la SEQ ID NO 1.

Por consiguiente, en aspectos muy preferidos, los fragmentos peptídicos de la invención contienen al menos uno de los 20 residuos aminoacídicos específicos de RhoC más C-terminales G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o 1192 de RhoC de la SEQ ID no 1.

En un aspecto específico de la divulgación, el fragmento peptídico de la divulgación consiste en los 20 residuos aminoacídicos más C-terminales de RhoC de la SEQ ID NO 1. Por consiguiente, en este aspecto particular, el péptido es ATRAGLQVRKNKRRRGCPIL (SEQ ID NO 4).

En otros aspectos específicos de la divulgación, el fragmento peptídico de la divulgación comprende la secuencia RXGLQVRKNK, donde X se selecciona del grupo que consiste en alanina y leucina, y donde dicho fragmento peptídico tiene como mucho 60 aminoácidos de longitud.

Homólogos funcionales

El RhoC humano de tipo silvestre, es decir, la versión no mutada de origen natural de la proteína se identifica como la SEQ ID NO: 1. Se describen fragmentos peptídicos inmunológicamente activos de RhoC. La presente divulgación también incluye composiciones de vacuna que comprenden RhoC, fragmentos peptídicos de RhoC, donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos u homólogos funcionales de RhoC que comprenden una identidad de secuencia de al menos un 92 % con la SEQ ID NO: 1.
Un homólogo funcional puede definirse como RhoC que difiere en secuencia del RhoC de tipo silvestre, tal como RhoC humano de tipo silvestre, pero es todavía capaz de inducir una respuesta inmune para cánceres que expresan RhoC de tipo silvestre. Un homólogo funcional puede ser una versión mutada o una variante alternativa de corte y empalme del RhoC de tipo silvestre. En otro aspecto, los homólogos funcionales de RhoC se definen como se describe a continuación en el presente documento. Un homólogo funcional puede ser, pero no se limita a, una versión recombinante de RhoC con una o más mutaciones y/o una o más deleciones de secuencia y/o adiciones introducidas *ex vivo.*

Un homólogo funcional de RhoC puede ser cualquier proteína que muestra al menos alguna identidad de secuencia

con la SEQ ID NO. 7 y tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune a los cánceres que expresan RhoC de tipo silvestre.

Por consiguiente, en un aspecto de la divulgación, se prefiere que los homólogos funcionales de RhoC comprendan una secuencia con una alta identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, donde ninguno de los residuos específicos de RhoC Q123, R140, S141, S152, L157, E165, G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o P192, que se marcan en "caracteres en negrita" en la Figura 1, está sustituido.

Además, en aspectos menos preferidos de la divulgación, se prefiere que los homólogos funcionales de RhoC comprendan una secuencia con una alta identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, donde ninguno de los residuos aminoacídicos que son L81, M82, C83, F84, S85, I86, D87, S88, P89, D90, S91, L92, E93, N94, I95, K98, W99, T100, P101, E102, V103, K104, H105, F106, C107, P108, N109, P111, 1112, 1113, V115, G116, N117, K118, K119, T127, R129, E142, E143, D146, N149, F154, D155, G166, V167, R168, E169, V170, F171, E172, M173, A174, T175, R176, A177, L179, Q180, R182, K185, G189, C190, específicos para RhoA y RhoC, que están marcados con "*" en la Figura 1, está sustituido.

Por lo tanto, en un aspecto, se prefiere que los homólogos funcionales de RhoC tengan una secuencia con una alta identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, donde los residuos aminoacídicos específicos de RhoC Q123, R140, S141, S152, L157, E165, G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o P192, no están sustituidos o están sustituidos únicamente por sustitución conservativa, más preferiblemente sustituidos solamente por un aminoácido con un alto nivel de similitud como se define en el presente documento a continuación. Incluso más preferiblemente, estos residuos no están sustituidos en absoluto

Además, en aspectos menos preferidos de la divulgación, se prefiere que los homólogos funcionales de RhoC comprendan una secuencia con una alta identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, donde ninguno de los residuos aminoacídicos específicos de RhoA y RhoC L81, M82, C83, F84, S85, I86, D87, S88, P89, D90, S91, L92, E93, N94, I95, K98, W99, T100, P101, E102, V103, K104, H105, F106, C107, P108, N109, P111, I112, I113, V115, G116, N117, K118, K119, T127, R129, E142, E143, D146, N149, F154, D155, G166, V167, R168, E169, V170, F171, E172, M173, A174, T175, R176, A177, L179, Q180, R182, K185, G189, C190, que están marcados con "*" en la Figura 1, está sin sustituir o sustituido únicamente por sustitución conservativa, más preferiblemente sustituido únicamente un aminoácido con un alto nivel de similitud como se define en el presente documento a continuación. Incluso más preferiblemente, estos residuos no están sustituidos en absoluto

Un experto en la técnica sabrá cómo realizar y evaluar sustituciones de aminoácidos "conservativas", mediante las cuales un aminoácido se sustituye por otro con una o más características químicas y/o físicas compartidas. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos tienen menos probabilidades de afectar a la funcionalidad de la proteína. Los aminoácidos pueden agruparse según características compartidas. Una sustitución conservativa de aminoácidos es una sustitución de un aminoácido dentro de un grupo predeterminado de aminoácidos por otro aminoácido dentro del mismo grupo, donde los aminoácidos dentro de grupos predeterminados presentan características similares o sustancialmente similares.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de los residuos que tienen unas cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene unas cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene unas cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene unas cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene unas cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene unas cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene unas cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos preferidos para las sustituciones conservativas de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

Dentro del significado de la expresión "sustitución conservativa de aminoácidos" como se aplica en el presente documento, un aminoácido puede sustituirse por otro dentro de los grupos de aminoácidos indicados en el presente documento a continuación:

Niveles inferiores de similitud:

Polaridad:

i) Aminoácidos que tienen cadenas laterales polares (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, y Cys,)
ii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, y Met)

Hidrofilicidad o hidrofobicidad:

iii) Aminoácidos hidrófobos (Ala, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val)
iv) Aminoácidos hidrófilos (Arg, Ser, Thr, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys)

Cargas:

v) Aminoácido neutros (Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)
vi) Aminoácidos básicos (Arg, His, Lys)
vii) Aminoácidos ácidos ((asp, Glu)

Alto nivel de similitud:

viii) Aminoácidos ácidos y sus amidas (Gln, Asn, Glu, Asp)
ix) Aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (Gly, Ala Val, Leu, Ile)
x) Aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr, Trp)
xi) Aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (Lys, Arg, His)
xii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxi (Ser, Thr)
xiii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre (Cys, Met),

Los grupos preferidos para las sustituciones conservativas de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

Por consiguiente, una variante o un fragmento de la misma de acuerdo con la divulgación puede comprender, dentro de la misma variante de la secuencia o fragmentos de la misma, o entre diferentes variantes de la secuencia o fragmentos de la misma, al menos una sustitución, tal como una pluralidad de sustituciones introducidas independientemente entre sí.

Resulta evidente a partir del esquema anterior que la misma variante o fragmento de la misma puede comprender más de una sustitución conservativa de aminoácidos de más de un grupo de aminoácidos conservativos como se ha definido anteriormente en el presente documento.

Aparte de los veinte aminoácidos estándar y dos aminoácidos especiales, seleno-cisteína y pirrolisina, hay un gran número de "aminoácidos no estándar" que no se incorporan en la proteína in vivo. Los ejemplos de aminoácidos no estándares incluyen la taurina que contiene azufre y los neurotransmisores GABA y dopamina. Otros ejemplos son la lantionina, ácido 2-aminoboisóbutico y la deshidroalanina. Otros amino no estándar son ornitina y citrulina.

Los aminoácidos no estándar se forman normalmente mediante modificaciones a aminoácidos estándar. Por ejemplo, puede formarse taurina mediante la descarboxilación de la cisteína, mientras que la dopamina se sintetiza a partir de la tirosina y la hidroxiprolina se produce mediante una modificación postraduccional de la prolina (común en el colágeno). Los ejemplos de aminoácidos no naturales son los enumerados, por ejemplo, en 37 C.F.R. Sección 1.822(b)(4).

Ambos residuos aminoacídicos estándar y no estándar descritos en el presente documento pueden estar en la forma isomérica "D" o "L".

Se contempla que un equivalente funcional de acuerdo con la divulgación puede comprender cualquier aminoácido, incluyendo aminoácidos no estándar. En un aspecto preferido, un equivalente funcional comprende únicamente aminoácidos estándar.

Los aminoácidos estándar y/o no estándar pueden estar unidos mediante enlaces peptídicos o por enlaces no peptídicos, sin embargo están unidos en general sólo por enlaces peptídicos. El término péptido también incluye modificaciones postraduccionales introducidas por reacciones químicas o catalizadas por enzimas, como se conoce en la técnica. Tales modificaciones postraduccionales pueden introducirse antes del reparto, si se desea. Los aminoácidos como se especifican en el presente documento estarán preferiblemente en la forma L-estereoisómera. Pueden emplearse análogos de aminoácidos en lugar de los 20 aminoácidos naturales. Se conocen varios análogos

de este tipo, incluyendo fluorofenilalanina, norleucina, ácido azetidin-2-carboxílico, S-aminoetil cisteína, 4-metil triptófano y similares.

Las variantes adecuadas serán al menos un 70 % y por consiguiente, las variantes tienen preferiblemente, al menos un 75 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80% de identidad de secuencia, tal como al menos un 85 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 90 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 91 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 91% de identidad de secuencia, tal como al menos un 92 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 93 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 94 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 96 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 97% de identidad de secuencia, tal como al menos un 98 % de identidad de secuencia, por ejemplo, un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia predeterminada de RhoC humano.

La identidad de secuencia se puede calcular usando una serie de algoritmos bien conocidos y aplicando una serie de penalizaciones de huecos diferentes. La identidad de secuencia se calcula en relación con la SEQ ID NO: 1. Cualquier herramienta de alineación de secuencia, tal como, pero sin limitarse a FASTA, BLAST o LALIGN, puede usarse para buscar homólogos y calcular la identidad de secuencia. Además, cuando sea apropiado, cualquier matriz de sustitución comúnmente conocida, tal como, pero sin limitarse a, matrices PAM, BLOSSUM o PSSM, se puede aplicar con el algoritmo de búsqueda. Por ejemplo, se puede aplicar una PSSM (matriz de puntuación específica de posición) a través del programa PSI-BLAST. Además, las alineaciones de secuencia pueden realizarse usando una serie de penalidades para la apertura y extensión de huecos. Por ejemplo, el algoritmo BLAST puede usarse con una penalización de apertura de hueco en el intervalo de 5-12, y una penalización de extensión de hueco en el intervalo de 1-2.

Los equivalentes funcionales pueden comprender además modificaciones químicas tales como ubiquitinación, marcaje (por ejemplo, con radionucleidos, diversas enzimas, etc.), pegilación (derivatización con polietilenglicol) o mediante inserción (o sustitución por síntesis química) de aminoácidos (aminoácidos) tales como ornitina, que normalmente no aparecen en proteínas humanas, sin embargo, se prefiere que el equivalente funcional no contenga modificaciones químicas.

Además de los compuestos peptidílicos descritos en el presente documento, se pueden formular compuestos estéricamente similares para imitar las porciones clave de la estructura peptídica y dichos compuestos también pueden usarse de la misma manera que los péptidos de la divulgación.

Esto puede conseguirse mediante técnicas de modelado y diseño químico conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la esterificación y otras alquilaciones se pueden emplear para modificar el extremo amino de, por ejemplo, una estructura de péptido de di-arginina, para imitar una estructura de tetra péptido. Se entenderá que todas estas construcciones estéricamente similares están dentro del alcance de la presente divulgación.

Los péptidos con alquilaciones N-terminales y esterificaciones C-terminales se incluyen también dentro de la presente divulgación. Los equivalentes funcionales también comprenden conjugados glicosilados y covalentes o agregados formados con las mismas moléculas, incluyendo dímeros o restos químicos no relacionados. Tales equivalentes funcionales se preparan por enlace de funcionalidades a grupos que se encuentran en el fragmento que incluye uno o ambos de los extremos N y C, por medios conocidos en la técnica.

Un homólogo funcional puede ser un mutante de deleción de RhoC que se identifica por la SEQ ID NO: 1 que comparte al menos un 70 % y, por consiguiente, un homólogo funcional tiene preferiblemente al menos un 75 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 80 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 85 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 90 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 91 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 91% de identidad de secuencia, tal como al menos un 92 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 93 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 94 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 96 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 97 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 98 % de identidad de secuencia, por ejemplo, un 99 % de identidad de secuencia.

MHC

Existen dos tipos de moléculas MHC; moléculas MHC de clase I y moléculas MHC de clase II. Las moléculas MHC de clase I son reconocidas por los linfocitos T CD8, que son las principales células efectoras de la respuesta inmune

adaptativa. Las moléculas MHC de clase II se expresan principalmente en la superficie de las células que presentan antígeno (APC), las cuales más importantes parece ser las células dendríticas. Las APC estimulan los linfocitos T sin tratar, así como otras células en el sistema inmune. Estimulan tanto los linfocitos T CD8 como los linfocitos T CD4.

En un aspecto, se proporcionan fragmentos peptídicos restringido a la Clase I de MHC novedosos que consisten en 8-10 aminoácidos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos de la SEQ ID NO 1, que se caracterizan por tener al menos una de varias características, una de las cuales es la capacidad de unirse a la molécula HLA de Clase I a la que se restringe a una afinidad según se mide por la cantidad del péptido que es capaz de la recuperación media máxima de la molécula HLA de Clase I (valor C_{50}) que es como mucho 50 µM como se determina por el ensayo de unión de ensamblaje como se describe en el presente documento. Este ensayo de ensamblaje puede realizarse como se ha descrito anteriormente (documento WO 2005/049073, Ejemplo 1.2), y se basa en la estabilización de la molécula HLA después de la carga del péptido a la línea celular T2 deficiente del transportador peptídico. Posteriormente, las cadenas pesadas HLA estables plegadas correctamente se inmunoprecipitan utilizando anticuerpos dependientes de la conformación y se cuantifica la unión peptídica. Los péptidos de este aspecto comprenden (o más preferiblemente consisten en) como mucho 200, preferiblemente como mucho 100, más preferiblemente como mucho 50, aún más preferiblemente como mucho 25, incluso más preferiblemente como mucho 20, aún incluso más preferiblemente como mucho 15, tal como a lo sumo 10, por ejemplo, en el intervalo de 8 a 10 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos de la SEQ ID NO 1.

Este ensayo proporciona un medio sencillo de cribado de los péptidos candidatos para determinar su capacidad para unirse a una molécula alelo de HLA en la afinidad anterior. En aspectos preferidos, el fragmento peptídico de la divulgación en uno que tiene un valor C_{50}, que es como mucho de 30 µM, tal como un valor C_{50}, que es como mucho de 20 µM, incluyendo valores C_{50} de como mucho 10 µM, como mucho 5 µM y como mucho 2 µM.

En otro aspecto preferido, se proporcionan fragmentos peptídicos MHC de Clase II novedosos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos de la SEQ ID NO 1 (también denominados como "péptidos"), que están caracterizados por tener al menos una de varias características descritas en el presente documento a continuación. Los péptidos de este aspecto comprenden (o más preferiblemente consisten en) entre 4 y 120, preferiblemente entre 8 y 100, más preferiblemente entre 10 y 75, aún más preferiblemente entre 12 y 60, incluso más preferiblemente entre 15 y 40, tal como entre 18 y 25 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos de la SEQ ID NO 1.

Por lo tanto, se proporcionan fragmentos peptídicos restringidos a la Clase I de MHC novedosos de 8-10 aminoácidos o fragmentos peptídicos MHC de Clase II novedosos de 18-25 aminoácidos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional de los mismos, donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos de la SEQ ID NO 1 (en conjunto denominados en el presente documento como "péptidos") que están caracterizados por tener al menos una de varias características descritas en el presente documento a continuación, una de las cuales es la capacidad de unirse a la molécula HLA de Clase I o Clase II a la que se restringe.

En aspectos particulares, se proporcionan fragmentos peptídicos, que son un péptido restringido a la Clase I de MHC o un péptido restringido a la Clase II de MHC que tiene al menos una de las siguientes características:

(i) capaz de provocar células productoras de INF-γ en una población PBL de un paciente de cáncer a una frecuencia de al menos 1 por 10^4 PBL según se determina por un ensayo ELISPOT, y/o
(ii) capaz de detectar *in situ* en un tejido tumoral de CTL que son reactivos con el péptido de epítopo.
(iii) capaz de inducir el crecimiento de linfocitos T específicos de RhoC in vitro.

Los péptidos más preferidos de acuerdo con la presente divulgación son péptidos capaces de elevar una repuesta de linfocitos T específica según se determina por un ensayo ELISPOT, por ejemplo, el ensayo ELISPOT descrito en el Ejemplo 1 en el presente documento a continuación, y en detalle en el documento WO 2005/049073 Ejemplo 1.4. Algunos péptidos aunque no se unen a MHC de clase I o de clase II con alta afinidad todavía pueden dar lugar a una respuesta de los linfocitos T según se determina por ELISPOT. Otros péptidos capaces de unirse a MHC de clase I o de clase II con alta afinidad también dan lugar a una respuesta de los linfocitos T según se determina por ELISPOT. Ambos tipos de péptidos son péptidos preferidos de acuerdo con la descripción.

Por lo tanto, los péptidos preferidos de acuerdo con la presente divulgación son péptidos capaces de elevar una respuesta de linfocitos T específica según se mide por un ensayo ELISPOT, donde se miden más de 50 puntos

específicos de péptidos por 10^8 células, más preferiblemente por 10^7, incluso más preferiblemente por 10^6, aún más preferiblemente por 10^5 células, tal como por 10^4 células.

Los péptidos más preferidos de acuerdo con la presente divulgación son péptidos que con capaces de provocar una respuesta inmune celular en un paciente de cáncer.

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema de HLA representa el sistema de histocompatibilidad mayor (MHC) humano. En general, los sistemas MHC controlan una gama de características: antígenos de trasplante, respuestas inmunes dependientes del timo, ciertos factores de complemento y predisposición para ciertas enfermedades. Más específicamente, el MHC codifica tres tipos diferentes de moléculas, es decir, moléculas de Clase I, II y III, que determinan las características más generales del MHC. De estas moléculas, las moléculas de Clase I son las denominadas moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C que se presentan en la superficie de la mayoría de las células nucleadas y los trombocitos.

Los péptidos de la presente divulgación están caracterizados por su capacidad para unirse a (estando restringidos por) una molécula HLA de MHC de clase I particular. Por lo tanto, en una realización, el péptido es uno que está restringido por una molécula HLA-A de MHC de Clase I, incluyendo HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A9, HLA-A10, HLA-A11, HLA-Aw19, HLA-A23(9), HLA-A24(9), HLA-A25(10), HLA-A26(10),, HLA-A28, HLA-A29(w19), HLA-A30(w19), HLA-A31(w19), HLA-A32(w19), HLA-Aw33(w19), HLA-Aw34(10), HLA-Aw36, HLA-Aw43, HLA-Aw66(10), HLA-Aw68(28), HLA-A69(28). También se utilizan designaciones más sencillas en toda la bibliografía, donde sólo se utiliza la designación numérica primaria, por ejemplo, HLA-A19 o HLA-A24 en lugar de HLA-Aw19 y HLA-A24 (49), respectivamente. En aspectos específicos, el péptido de la divulgación se restringe a una especie HLA de MHC de Clase I seleccionada del grupo que consiste en HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 y HLA-A24. En un aspecto específico, el péptido de la divulgación se restringe a una especie HLA de MHC de Clase I HLA-A2 o HLA-A3.

En aspectos útiles adicionales, el péptido de la divulgación es un péptido, que está restringido por una molécula HLA-B de MHC de Clase I, incluyendo cualquiera de los siguientes: HLA-B5, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B12, HLA-B13, HLA-B14, HLA-B15, HLA-B16, HLA-B17, HLA-B18, HLA-B21, HLA-Bw22, HLA-B27, HLA-B35, HLA-B37, HLA-B38, HLA-B39, HLA-B40, HLA-Bw41, HLA-Bw42, HLA-B44, HLA-B45, HLA-Bw46 y HLA-Bw47. En realizaciones específicas de la invención, la especie HLA-B de MHC de Clase I a la que el péptido de la invención es capaz de unirse se selecciona de entre HLA-B7, HLA-B35, HLA-B44, HLA-B8, HLA-B15, HLA-B27 y HLA-B51.

En aspectos útiles adicionales, el péptido de la divulgación es un péptido, que está restringido por una molécula HLA-C de MHC de Clase I, incluyendo, pero sin limitación a, cualquiera de los siguientes: HLA-Cw1, HLA-Cw2, HLA-Cw3, HLA-Cw4, HLA-Cw5, HLA-Cw6, HLA-Cw7 y HLA-Cw1.

En aspectos útiles adicionales, el péptido de la divulgación es un péptido, que está restringido por una molécula HLA de MHC de Clase II, incluyendo, pero sin limitación a, cualquiera de los siguientes: HLA-DPA-1, HLA-DPB-1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-DRB y todos los alelos en estos grupos y HLA-DM, HLA-DO.

La selección de péptidos que potencialmente tienen la capacidad de unirse a una molécula HLA particular puede hacerse mediante la alineación de secuencias conocidas que se unen a una molécula HLA particular dada para revelar así el predominio de unos pocos aminoácidos relacionados en posiciones particulares en los péptidos. Dichos residuos de aminoácidos predominantes se denominan también en el presente documento "residuos de anclaje" o "motivos de residuos de anclaje". Siguiendo tal procedimiento relativamente sencillo basado en datos de secuencia conocidos que se pueden encontrar en bases de datos accesibles, los péptidos pueden derivarse de RhoC, que se unen probablemente a la molécula HLA particular. Los ejemplos representativos de dichos análisis para una serie de moléculas HLA se dan en la tabla a continuación:

Alelo HLA	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 5	Posición 6	Posición 7	C-terminal
HLA-A1		T,S	D,E			L	Y
HLA-A2		L, M			V		L,V
HLA-A3		L,V,M	F,Y				K, Y, F
HLA-A11		V,I,F,Y	M,L,F,Y, I				K, R
HLA-A23		I,Y					W,I
HLA-A24		Y		I,V	F		I,L,F

HLA-A25		M,A,T	I				W
HLA-A26	E,D	V,T,I,L,F			I,L,V		Y,F
HLA-A28	E,D	V,A,L					A,R
HLA-A29		E					Y,L
HLA-A30		Y,L,F,V					Y
HLA-A31			L,M,F,Y				R
HLA-A32		I,L					W
HLA-A33		Y,I,L,V					R
HLA-A34		V,L					R
HLA-A66	E,D	T,V					R,K
HLA-A68	E,D	T,V					R,K
HLA-A69		V,T,A					V,L
HLA-A74		T					V,L
HLA-B5		A,P	F,Y				I,L
HLA-B7	*	P					L, F
HLA-B8			K	K,R			L
HLA-B14		R,K					L,V
HLA-B15 (B62)		Q,L,K,P, H,V,I,M, S,T					F,Y,W
HLA-B17							L,V
HLA-B27		R					Y, K,F,L
HLA-B35		P					I,L,M,Y
HLA-B37		D,E					I,L,M
HLA-B38		H	D,E				F,L
HLA-B39		R,H					L, F
HLA-B40 (B60,61)		E	F,I,V				L,V,A,W, M,T,R
HLA-B42		L, P					Y,L
HLA-B44		E					F,Y,W
HLA-B46		M,I,L,V					Y,F
HLA-B48		Q,K					L
HLA-B51		A,P,G					F,Y,I,V
HLA-B52		Q	F,Y				I,V
HLA-B53		P					W,F,L
HLA-B54		P					
HLA-B55		P					A,V
HLA-B56		P					A,V
HLA-B57		A,T,S					F,W,Y
HLA-B58		A,T,S					F,W,Y
HLA-B67		P					L
HLA-B73		R					P
HLA-Cw1		A,L					L
HLA-Cw2		A,L					F,Y
HLA-Cw3		A,L					L,M
HLA-Cw4		Y,P,F					L,M,F,Y
HLA-Cw6							L,I,V,Y
HLA-Cw6		Y					L,Y,F
HLA-Cw8		Y					L,I,
HLA-Cw16		A,L					L,V

* En un aspecto

no hay ningún residuo de anclaje específico para esta posición, sin embargo, en un aspecto preferido, el residuo de anclaje es R o A.

Por lo tanto, como un ejemplo, los nanopéptidos que tienen potencialmente la capacidad de unirse a HLA-A3 tendrán una o más de las siguientes secuencias: Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-K, Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Y; Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-F o Xaa-V-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-K (Xaa que indica cualquier residuo aminoacídico).

De una manera similar, pueden diseñarse secuencias que tienen potencialmente la capacidad de unirse a cualquier otra molécula HLA.

Se apreciará que el experto en la técnica será capaz de identificar "motivos de residuo de anclaje" adicionales para una molécula HLA dada.

El fragmento peptídico inmunogénicamente activo puede consistir en una secuencia consecutiva en el intervalo de 2 a 100, tal como de 5 a 75, por ejemplo, de 8 a 50, preferiblemente en el intervalo de 9 a 25 aminoácidos de dicho RhoC de la SEQ ID no 1 o dicho homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO 1.

Los péptidos de la divulgación comprenden (o más preferiblemente consisten en) como mucho 200, preferiblemente como mucho 100, más preferiblemente como mucho 60, aún más preferiblemente como mucho 25, incluso más preferiblemente como mucho 20, aún incluso más preferiblemente como mucho 15, tal como a lo sumo 10, por ejemplo, en el intervalo de 8 a 10 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido como mucho tres aminoácidos de la SEQ ID NO 1.

En algunos aspectos, los péptidos de la divulgación comprenden la secuencia RXGLQVRKNK, donde X se selecciona del grupo que consiste en alanina y leucina, y donde dicho fragmento peptídico es como mucho 200, preferiblemente como mucho 100, más preferiblemente como mucho 60, aún más preferiblemente como mucho 25, incluso más preferiblemente como mucho 20, aún incluso más preferiblemente como mucho 15, tal como a lo sumo 10, por ejemplo, en el intervalo de 8 a 10 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido como mucho tres aminoácidos de la SEQ ID NO 1.

Otros péptidos comprenden (o más preferiblemente consisten en) entre 4 y 120, preferiblemente entre 8 y 100, más preferiblemente entre 10 y 75, aún más preferiblemente entre 12 y 60, incluso más preferiblemente entre 15 y 40, tal como entre 18 y 25 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID 1.

En algunos aspectos, los péptidos de la divulgación comprenden la secuencia RXGLQVRKNK, donde X se selecciona del grupo que consiste en alanina y leucina, y donde dicho fragmento peptídico es entre 4 y 120, preferiblemente entre 8 y 100, más preferiblemente entre 10 y 75, aún más preferiblemente entre 12 y 60, incluso más preferiblemente entre 15 y 40, tal como entre 18 y 25 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID 1.

Otros péptidos comprenden (o más preferiblemente consisten en) entre 10 y 150, preferiblemente entre 12 y 120, más preferiblemente entre 15 y 75, aún más preferiblemente entre 20 y 70, incluso más preferiblemente entre 22 y 65, tal como entre 26 y 60 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID 1.

En algunos aspectos, los péptidos de la divulgación comprenden la secuencia RXGLQVRKNK, donde X se selecciona del grupo que consiste en alanina y leucina, y donde dicho fragmento peptídico es entre 10 y 150, preferiblemente entre 12 y 120, más preferiblemente entre 15 y 75, aún más preferiblemente entre 20 y 70, incluso más preferiblemente entre 22 y 65, tal como entre 26 y 60 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID 1.

En aspectos específicos, los péptidos de la divulgación comprenden la secuencia RXGLQVRKNK, donde X se selecciona del grupo que consiste en alanina y leucina, y donde dicho fragmento peptídico es como mucho 200, preferiblemente como mucho 100, más preferiblemente es como mucho 60 aminoácidos de longitud.

En algunos aspectos de la presente divulgación se proporcionan péptidos derivados de RhoC de más de 8 a 10 aminoácidos. Los péptidos de más de 8 a 10 aminoácidos se procesan por el proteasoma a una longitud más corta para la unión a moléculas HLA. Por lo tanto, al administrar un péptido mayor de 8 a 10 aminoácidos, se procesa el péptido más largo en una serie de péptidos más cortos en el citosol por el proteasoma. En un aspecto específico, el péptido más largo puede comprender los 20 péptidos más C-terminales de RhoC ATRAGLQVRKNKRRRGCPIL (SEQ ID NO: 4). Por lo tanto, el péptido RhoC C-terminal puede procesarse en nona - y/o decapéptidos por el proteasoma.

Una ventaja de usar un péptido más largo que puede ser procesado por el proteasoma en una diversidad de

péptidos más cortos diferentes es que más clases de HLA pueden ser dirigidas con un péptido que un péptido de 8 a 10 aminoácidos que está restringido a una clase de HLA particular.

En otros aspectos de la divulgación, se proporcionan los péptidos procesados posibles derivados del péptido C-terminal de RhoC.

En aspectos específicos, los nonapéptidos de la divulgación son un péptido derivado de RhoC C-terminal que tiene una secuencia seleccionada de entre las siguientes: ATRAGLQVR (SEQ ID NO: 11), TRAGLQVRK (SEQ ID NO: 12), RAGLQVRKN (SEQ ID NO: 13), AGLQVRKNK (SEQ ID NO: 14), GLQVRKNKR (SEQ ID NO: 15), LQVRKNKRR (SEQ ID NO: 16), QVRKNKRRR (SEQ ID NO: 17), VRKNKRRRG (SEQ ID NO: 18), RKNKRRRGC (SEQ ID NO: 19), KNKRRRGCP (SEQ ID NO: 20), NKRRRGCPI (SEQ ID NO: 21), y KRRRGCPIL (SEQ ID NO: 22), donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos, por ejemplo, se ha sustituido como mucho un aminoácido. Preferiblemente no se ha sustituido ningún aminoácido.

En aspectos específicos, los decapéptidos de la divulgación son un péptido derivado de RhoC C-terminal que tiene una secuencia seleccionada de entre las siguientes: ATRAGLQVRK (SEQ ID NO: 23), TRAGLQVRKN (SEQ ID NO: 24), RAGLQVRKNK (SEQ ID NO: 25), AGLQVRKNKR (SEQ ID NO: 26), GLQVRKNKRR (SEQ ID NO: 27), LQVRKNKRRR (SEQ ID NO: 28), QVRKNKRRRG (SEQ ID NO: 29), VRKNKRRRGC (SEQ ID NO: 30), RKNKRRRGCP (SEQ ID NO: 31), KNKRRRGCPI (SEQ ID NO: 32) y NKRRRGCPIL (SEQ ID NO: 33), donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos, por ejemplo, se ha sustituido como mucho un aminoácido. Preferiblemente no se ha sustituido ningún aminoácido.

En aspectos preferidos, el fragmento peptídico inmunogénicamente activo de la divulgación se selecciona de entre una secuencia de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo), donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos, que es diferente de las secuencias de RhoA de la SEQ ID NO 2 y RhoB de la SEQ ID NO 3.

Por lo tanto, en un aspecto, se prefieren secuencias RhoC que difieren de RhoB. Son más preferidas las secuencias RhoC C-terminales que difieren tanto de RhoA como de RhoB. De manera adecuada, los péptidos se diferenciarán de las secuencias de RhoA de SEQ ID NO 2 y RhoB de SEQ ID NO 3 por siete aminoácidos, por ejemplo, por seis aminoácidos, tales como por cinco aminoácidos, por ejemplo por cuatro aminoácidos, tales como por tres aminoácidos, por ejemplo por dos aminoácidos, tal como por al menos un aminoácido.

Preferiblemente, el fragmento peptídico inmunogénicamente activo de la divulgación es diferente de las secuencias de RhoA de la SEQ ID NO 2 y RhoB de la SEQ ID NO 3 en al menos un aminoácido. Por lo tanto, los péptidos preferidos de la divulgación pueden contener al menos uno de los residuos aminoacídicos I43, Q123, R140, S141, S152, L157, E165, G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o I192 de RhoC de la SEQ ID no 1.

Los péptidos menos preferibles se diferenciarán de RhoB de la SEQ ID NO 3 por siete aminoácidos, por ejemplo, por seis aminoácidos, tales como por cinco aminoácidos, por ejemplo por cuatro aminoácidos, tales como por tres aminoácidos, por ejemplo por dos aminoácidos, tal como por al menos un aminoácido. Por lo tanto, el fragmento peptídico inmunogénicamente activo de la divulgación contiene al menos uno de los residuos aminoacídicos L81, M82, C83, F84, S85, I86, D87, S88, P89, D90, S91, L92, E93, N94, I95, K98, W99, T100, P101, E102, V103, K104, H105, F106, C107, P108, N109, P111, I112, 1113, V115, G116, N117, K118, K119, T127, R129, E142, E143, D146, N149, F154, D155, G166, V167, R168, E169, V170, F171, E172, M173, A174, T175, R176, A177, L179, Q180, R182, K185, G189, C190.

Por consiguiente, en un aspecto específico, el fragmento peptídico inmunogénicamente activo de la divulgación consiste en 50 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 45 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 40 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 35 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 30 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 25 residuos aminoácidicos, tal como 18 a 25 aminoácidos consecutivos de RhoC de la SEQ ID no 1 o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido como mucho tres aminoácidos y el fragmento peptídico contiene al menos uno de los residuos aminoacídicos específicos de RhoC 143, Q123, R140, S141, S152, L157, E165, G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o 1192 de RhoC de la SEQ ID no 1.

Por consiguiente, en otro aspecto específico, el fragmento peptídico inmunogénicamente activo de la divulgación consiste en como mucho 20 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 19 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 18 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 17 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 16

residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 15 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 14 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 13 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 12 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 11 residuos aminoácidicos, tal como 8 a 10 aminoácidos consecutivos de RhoC de la SEQ ID no 1 o un homólogo funcional de los mismos, donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos, donde el fragmento peptídico contiene al menos uno de los residuos aminoacídicos específicos de RhoC I43, Q123, R140, S141, S152, L157, E165, G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o I192 o RhoC de la SEQ ID no 1.

Por consiguiente, en otro aspecto específico, el fragmento peptídico inmunogénicamente activo de la divulgación consiste en 100 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 90 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 80 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 70 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 65 residuos aminoácidicos, tal como 26 a 60 aminoácidos consecutivos de RhoC de la SEQ ID no 1 o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido como mucho tres aminoácidos y el fragmento peptídico contiene al menos uno de los residuos aminoacídicos específicos de RhoC I43, Q123, R140, S141, S152, L157, E165, G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o I192 de RhoC de la SEQ ID no 1.

Por consiguiente, en algunos aspectos, los péptidos de la divulgación son decapéptidos seleccionados del grupo que comprende los siguientes: YVPTVFENYI (SEQ ID NO 34), VPTVFENYIA (SEQ ID NO 35), PTVFENYIAD (SEQ ID NO 36), TVFENYIADI (SEQ ID NO 37), VFENYIADIE (SEQ ID NO 38), FENYIADIEV (SEQ ID NO 39), ENYIADIEVD (SEQ ID NO 40), NYIADIEVDG (SEQ ID NO 41), YIADIEVDGK (SEQ ID NO 42), IADIEVDGKQ (SEQ ID NO 43), LVGNKKDLRQ (SEQ ID NO 44), VGNKKDLRQD (SEQ ID NO 45), GNKKDLRQDE (SEQ ID NO 46), NKKDLRQDEH (SEQ ID NO 47), KKDLRQDEHT (SEQ ID NO 48), DKLRQDEHTR (SEQ ID NO 170), KLRQDEHTRR (SEQ ID NO 50), LRQDEHTRRE (SEQ ID NO 51), RQDEHTRREL (SEQ ID NO 171), QDEHTRRELA (SEQ ID NO 172), LAKMKQEPVR (SEQ ID NO 54), AKMKQEPVRS (SEQ ID NO 55), KMKQEPVRSE (SEQ ID NO 56), MKQEPVRSEE (SEQ ID NO 57), KQEPVRSEEG (SEQ ID NO 58), QEPVRSEEGR (SEQ ID NO 59), EPVRSEEGRD (SEQ ID NO 60), PVRSEEGRDM (SEQ ID NO 61), VRSEEGRDMA (SEQ ID NO 62), RSEEGRDMAN (SEQ ID NO 63), SEEGRDMANR (SEQ ID NO 64), EGRDMANRIS (SEQ ID NO 65), GRDMANRISA (SEQ ID NO 66), RDMANRISAF(SEQ ID NO 67), DMANRISAFG (SEQ ID NO 68), MANRISAFGY (SEQ ID NO 69), ANRISAFGYL (SEQ ID NO 173), NRISAFGYLE (SEQ ID NO 71), RISAFGYLEC (SEQ ID NO 174), ISAFGYLECS (SEQ ID NO 73), SAFGYLECSA (SEQ ID NO 175), AFGYLECSAK (SEQ ID NO 75), FGYLECSAKT (SEQ ID NO 76), GYLECSAKTK (SEQ ID NO 77), YLECSAKTKE (SEQ ID NO 78), LECSAKTKEG (SEQ ID NO 79), ECSAKTKEGV (SEQ ID NO 80), CSAKTKEGVR (SEQ ID NO 81), SAKTKEGVRE (SEQ ID NO 82), AKTKEGVREV (SEQ ID NO 176), KTKEGVREVF (SEQ ID NO 157), TKEGVREVFE (SEQ ID NO 89), KEGVREVFEM (SEQ ID NO 86), EGVREVFEMA (SEQ ID NO 177), EVFEMATRAG SEQ ID NO 88), VFEMATRAGL (SEQ ID NO 89), FEMATRAGLQ (SEQ ID NO 90), EMATRAGLQV (SEQ ID NO 91), MATRAGLQVR (SEQ ID NO 92), ATRAGLQVRK (SEQ ID NO 93), TRAGLQVRKN (SEQ ID NO 94), RAGLQVRKNK (SEQ ID NO 10), AGLQVRKNKR (SEQ ID NO 96), GLQVRKNKRR (SEQ ID NO 97), LQVRKNKRRR (SEQ ID NO 98), QVRKNKRRRG (SEQ ID NO 99), VRKNKRRRGC (SEQ ID NO 100), RKNKRRRGCP (SEQ ID NO 101), KNKRRRGCPI (SEQ ID NO 102), NKRRRGCPIL (SEQ ID NO 103) o un homólogo funcional de los mismos, donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos. Preferiblemente no se ha sustituido ningún aminoácido.

Por consiguiente, en algunos aspectos, los péptidos de la divulgación son nonapéptidos seleccionados del grupo que comprende los siguientes: VPTVFENYI (SEQ ID NO 104), PTVFENYIA (SEQ ID NO 105), TVFENYIAD (SEQ ID NO 106), VFENYIADI (SEQ ID NO 107), FENYIADIE (SEQ ID NO 108), ENYIADIEV (SEQ ID NO 109), NYIADIEVD (SEQ ID NO 110), YIADIEVDG (SEQ ID NO 111), IADIEVDGK (SEQ ID NO 112), VGNKKDLRQ (SEQ ID NO 113), GNKKDLRQD (SEQ ID NO 114), NKKDLRQDE (SEQ ID NO 115), KKDLRQDEH (SEQ ID NO 116), KDLRQDEHT (SEQ ID NO 117), KLRQDEHTR (SEQ ID NO 118), LRQDEHTRR (SEQ ID NO 119), RQDEHTRRE (SEQ ID NO 120), QDEHTRREL (SEQ ID NO 121), AKMKQEPVR (SEQ ID NO 122), KMKQEPVRS (SEQ ID NO 123), MKQEPVRSE (SEQ ID NO 124), KQEPVRSEE (SEQ ID NO 125), QEPVRSEEG (SEQ ID NO 126), EPVRSEEGR (SEQ ID NO 127), PVRSEEGRD (SEQ ID NO 128), VRSEEGRDM (SEQ ID NO 129), RSEEGRDMA (SEQ ID NO 130), SEEGRDMAN (SEQ ID NO 131), GRDMANRIS (SEQ ID NO 132), RDMANRISA (SEQ ID NO 133), DMANRISAF (SEQ ID NO 134), MANRISAFG (SEQ ID NO 135), ANRISAFGY (SEQ ID NO 136), NRISAFGYL (SEQ ID NO 137), RISAFGYLE (SEQ ID NO 138), ISAFGYLEC (SEQ ID NO 139), SAFGYLECS (SEQ ID NO 140), AFGYLECSA (SEQ ID NO 141), FGYLECSAK (SEQ ID NO 142), GYLECSAKT (SEQ ID NO 144), YLECSAKTKE (SEQ ID NO 145), LECSAKTKEG (SEQ ID NO 146), ECSAKTKEGV (SEQ ID NO 147), CSAKTKEGVR (SEQ ID NO 148), SAKTKEGVRE (SEQ ID NO 149), KTKEGVREV (SEQ ID NO 150), KEGVREVFE (SEQ ID NO 152), EGVREVFEM (SEQ ID NO 153), VFEMATRAG (SEQ ID NO 154), FEMATRAGL (SEQ ID NO 155), MATRAGLQV (SEQ ID NO 157), ATRAGLQVR (SEQ ID NO 158), TRAGLQVRK (SEQ ID NO 159), RAGLQVRKN (SEQ ID NO 160), AGLQVRKNK (SEQ ID NO 161), GLQVRKNKR (SEQ ID NO 162), LQVRKNKRR (SEQ ID NO 163), QVRKNKRRR (SEQ ID NO 164), VRKNKRRRG (SEQ ID NO 165), RKNKRRRGC (SEQ ID NO 166), KNKRRRGCP

(SEQ ID NO 167), NKRRRGCPI (SEQ ID NO 168), KRRRGCPIL (SEQ ID NO 169) o un homólogo funcional de los mismos, donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos. Preferiblemente no se ha sustituido ningún aminoácido.

En un aspecto específico, los péptidos de la divulgación se seleccionan de entre los siguientes VYVPTVFENYIADIEVDGKQV (SEQ ID NO: 5), ILVGNKKLRQDEHTRRLAK (SEQ ID NO: 6) y ELAKMKQEPVRSEEGRDMANR (SEQ ID NO: 7), o un homólogo funcional de los mismos, donde se han sustituido como mucho tres aminoácidos, se han sustituido tal como a lo sumo dos aminoácidos, por ejemplo, se han sustituido, por ejemplo, como mucho un aminoácido. Preferiblemente no se ha sustituido ningún aminoácido. La parte C-terminal de la secuencia de RhoC de la SEQ ID NO 1 es mucho más diferente de las secuencias de RhoA de la SEQ ID NO 2 y RhoB de la SEQ ID NO 3. En aspectos preferidos de la divulgación, los péptidos pueden seleccionarse de la parte C-terminal de RhoC de la SEQ ID NO 1.

Otros péptidos comprenden (o más preferiblemente consisten en) entre 4 y 120, preferiblemente entre 8 y 100, más preferiblemente entre 10 y 75, aún más preferiblemente entre 12 y 60, incluso más preferiblemente entre 15 y 40, tal como entre 18 y 25 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO 1, donde se han sustituido, eliminado o añadido como mucho dos aminoácidos de RhoC de la SEQ ID no 1.

Otros péptidos comprenden (o más preferiblemente consisten en) entre 4 y 120, preferiblemente entre 8 y 100, más preferiblemente entre 10 y 75, aún más preferiblemente entre 12 y 60, incluso más preferiblemente entre 15 y 40, tal como entre 18 y 25 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido, eliminado o añadido como mucho tres aminoácidos.

Otros péptidos comprenden (o más preferiblemente consisten en) entre 10 y 150, preferiblemente entre 12 y 120, más preferiblemente entre 15 y 75, aún más preferiblemente entre 20 y 70, incluso más preferiblemente entre 22 y 65, tal como entre 26 y 60 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO 1, donde se han sustituido, eliminado o añadido como mucho dos aminoácidos de RhoC de la SEQ ID no 1.

Otros péptidos comprenden (o más preferiblemente consisten en) entre 10 y 150, preferiblemente entre 12 y 120, más preferiblemente entre 15 y 75, aún más preferiblemente entre 20 y 70, incluso más preferiblemente entre 22 y 65, tal como entre 26 y 60 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido, eliminado o añadido como mucho tres aminoácidos.

En aspectos preferidos de la divulgación, el péptido comprende la secuencia RXGLQVRKNK, donde X se selecciona del grupo que consiste en alanina y leucina, y donde dicho fragmento peptídico tiene como mucho 60 aminoácidos de longitud.

En un aspecto específico, los péptidos de la divulgación se seleccionan del C-terminal de RhoC, seleccionado así de entre los siguientes EEGRDMANRISAFGYKECSAKTKEGVREVFEMATRAGLQVRKNKRRRGCPIL (SEQ ID NO: 8) o ATRAGLQVRKNKRRRGCPIL (SEQ ID NO: 4) o RAGLQVRKNK (SEQ ID NO: 10). En otro aspecto preferido, el péptido es RLGLQVRKNK (SEQ ID NO: 9) que es un péptido artificial, donde la alanina de RAGLQVRKNK (SEQ ID NO: 10) se ha sustituido con leucina.

En un aspecto de la divulgación, los péptidos RhoC comprenden variantes peptídicas. Como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a péptidos que son homólogos a la proteína básica, que es RhoC adecuadamente humana, pero que difiere de la secuencia de bases a partir de la cual se derivan ya que uno o más aminoácidos dentro de la secuencia están sustituidos por otros aminoácidos. Adecuadamente, las variantes tendrán al menos seis sustituciones aminoacídicas, por ejemplo, como mucho cinco sustituciones aminoacídicas, tales como a lo sumo cuatro sustituciones aminoacídicas, por ejemplo, como mucho tres sustituciones aminoacídicas, tales como como mucho dos sustituciones aminoacídicas, por ejemplo, a lo sumo una sustitución aminoacídica.

Por lo tanto, en aspectos útiles, los péptidos de la divulgación incluyen péptidos, cuyas secuencias comprenden, para cada uno de los alelos HLA específicos enumerados en la tabla, cualquiera de los residuos de aminoácidos indicados en la tabla.

Por lo tanto, los péptidos de la divulgación pueden ser cualquiera de los péptidos que se han mencionado anteriormente que comprenden secuencias contiguas de RhoC, donde en el intervalo de 1 a 10, preferiblemente en

el intervalo de 1 a 5, más preferiblemente en el intervalo de 1 a 3, incluso más preferiblemente en el intervalo de 1 a 2, aún más preferiblemente 1 aminoácido se ha intercambiado por otro aminoácido, preferiblemente de manera que el péptido comprenda uno o más, preferiblemente todos los residuos de anclaje, de un péptido específico de HLA-A dado según se ha indicado en la tabla anterior.

Un ejemplo no limitante de cómo preparar péptidos de RhoC que comprenden residuos de anclaje de un péptido específico de HLA-A dado se describe en el ejemplo 1 en la sección "Péptidos de unión a HLA-A3 de RhoC". Por lo tanto, en un aspecto de la divulgación, el péptido puede ser cualquier péptido que comprenda como mucho 200, preferiblemente como mucho 100, más preferiblemente como mucho 50, aún más preferiblemente como mucho 25, incluso más preferiblemente como mucho 20, aún más preferiblemente como mucho 15, incluso más preferiblemente como mucho 10 aminoácidos y que comprenda (o más preferiblemente que consista en) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en RAGLQVRKNK (SEQ ID NO: 10) o RLGLQVRKNK (SEQ ID NO: 11).

Por lo tanto, un enfoque para identificar péptidos cortos de la divulgación incluye las siguientes etapas: seleccionar una molécula HLA particular, por ejemplo, una que aparece a alta velocidad en una población dad, realizar un análisis de alineación como se ha descrito anteriormente para identificar "motivos de residuo de anclaje" en la proteína del gen Rho, aislar o construir péptidos de un tamaño adecuado que comprendan uno o más de los residuos de anclaje identificados y ensayar los péptidos resultantes para determinar la capacidad de los péptidos para provocar células de producción de INF-γ en una población PBL de un paciente con cáncer a una frecuencia de al menos 1 por 10^4 PBL según se determina mediante un ensayo ELISPOT como se describe en el presente documento en el Ejemplo 1 y en detalle en el documento WO 2005/049073, y/o (iii) la capacidad de los péptidos para detectar *in situ* en un tejido tumoral CTL que son reactivos ensayándose los péptidos de epítopo.

El péptido de la divulgación, como se ha mencionado anteriormente, se obtiene a partir de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un fragmento del mismo. La proteína a partir de la cual puede obtenerse el péptido puede ser cualquier RhoC de cualquier especie animal en la que se expresa la proteína. En realizaciones preferidas, la proteína de partida es de una especie de mamífero que incluye una especie de roedor, conejo y primate, tal como seres humanos. Basándose en la secuencia de la proteína seleccionada, el péptido de la invención se obtiene por cualquier tratamiento químico o enzimático apropiado del material de partida de proteína que da como resultado un péptido de un tamaño adecuado como se ha indicado anteriormente, o puede sintetizarse mediante cualquier procedimiento de síntesis peptídica convencional que resultan conocidos para el experto en la técnica.

El péptido de la divulgación puede tener una secuencia que es una secuencia nativa del RhoC a partir de la cual se deriva. Sin embargo, los péptidos que tienen una afinidad más alta a cualquier molécula HLA dada pueden obtenerse a partir de tal secuencia nativa modificando la secuencia sustituyendo, eliminando o añadiendo al menos un residuo de aminoácido, por ejemplo, en base al procedimiento descrito anteriormente, por el que se identifican los motivos de residuos de anclaje con respecto a la molécula HLA dada.

Una característica significativa del péptido de la divulgación es su capacidad para reconocer o provocar linfocitos T respondedores productores de INF-γ, es decir, linfocitos T (CTL) que reconocen específicamente el péptido particular en una población PBL o células tumorales de un paciente con cáncer (células diana). Esta actividad se determina fácilmente sometiendo PBL o las células tumorales de un paciente a un ensayo ELISPOT como se describe en el Ejemplo 1 y en detalle en el documento WO 2005/049073 y el ejemplo 1. Antes del ensayo, puede ser ventajoso estimular la población de PBL o las células tumorales a ensayar poniendo en contacto las células con el péptido a ensayar. Preferiblemente, el péptido es capaz de provocar o reconocer linfocitos T productores de INF-γ a una frecuencia de al menos 1 por 10^4 PBL según se determinar por un ensayo ELISPOT como se usa en el presente documento. Más preferiblemente, la frecuencia es de al menos 5 por 10^4PBL, más preferiblemente al menos 10 por 10^4 PBL, tal como a lo sumo 50 o 100 por 10^4 PBL.

El ensayo ELISPOT representa una fuerte herramienta para controlar las respuestas de linfocitos T específicas del péptido RhoC. Una implicación principal de los hallazgos en el presente documento es que los péptidos de la divulgación pueden expresarse y complejarse con moléculas HLA en células cancerosas. Esto hace que estas células cancerosas sean susceptibles a la destrucción por CTL y enfatiza la utilidad potencial de la inmunización de RhoC para controlar el crecimiento de la metástasis. La presencia de respuestas a CTL espontáneas en PBL de pacientes de melanoma a epítopos peptídicos derivados de RhoC restringidos por HLA como se describe en el Ejemplo 1 muestra el potencial inmunoterapéutico de péptidos inmunógenos de RhoC.

En un aspecto, el péptido de la divulgación es capaz de provocar células productoras de INF-γ en una población PBL de un paciente que tiene una enfermedad de cáncer donde se expresa RhoC de la SEQ ID no 1 o un homólogo

funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO 1.

La afección clínica puede ser un cáncer. El término "cáncer" .como se usa en el presente documento, .pretende incluir cualquier enfermedad de cáncer, neoplásica y preneoplásica. Dicho cáncer puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en; carcinoma de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangeosarcoma, sarcoma linfangeoendotelial, sinovioma, mesotelioma, sarcoma de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistandeocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioblastomas, neurinomas, craniofaringiomas, schwannomas, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurinoma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemias y linfomas, leucemia linfocítica aguda y policitemia vera mielocítica aguda, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de cadena pesada, leucemias no linfocíticas agudas, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, cáncer del recto, cánceres urinarios, cánceres uterinos, cáncer oral, cánceres de piel, cáncer de estómago, tumores cerebrales, cáncer de hígado, cáncer de laringe, cáncer de esófago, tumores de mama, leucemia linfoide aguda infantil (ALL), ALL del timo, ALL de linfocitos B, leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocitoide, leucemia megacariocitoide aguda, linfoma de Burkitt, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, y leucemia de linfocitos T, carcinoma de pulmón de células no pequeñas pequeñas y grandes, leucemia granulocítica aguda, tumores de células germinales, cáncer endometrial, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, leucemia linfoide crónica, leucemia de células pilosas y cáncer de tiroides.

La composición de vacuna puede ser para el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo de: Melanoma, cáncer de ovario o cáncer de pulmón.

En un aspecto muy preferido, la enfermedad del cáncer es cáncer metastásico, por lo tanto preferiblemente la afección clínica es cualquiera de los cánceres mencionados anteriormente, que es metastásico, incluso más preferiblemente la afección clínica se selecciona del grupo de: Melanoma metastásico, cáncer de ovario metastásico o cáncer de pulmón metastásico.

Además de su capacidad para provocar respuestas inmunes en poblaciones de PBL, también se contempla que los péptidos de la divulgación son capaces de provocar respuestas inmunitarias citolíticas *in situ*, es decir, en tejidos de tumores sólidos. Esto puede demostrarse, por ejemplo, proporcionando complejos HLA-péptido, por ejemplo, multimerizándose y proporcionándose con un marcador detectable, y utilizando tales complejos para las tinciones inmunohistoquímicas para detectar en un tejido tumoral CTL que son reactivos con el péptido de epítopo de la divulgación.

Por consiguiente, otra característica significativa adicional del péptido de la divulgación es que es capaz detectar *in situ* un tejido tumoral de CTL que son reactivos con el péptido de epítopo.

También se contempla que los péptidos de la divulgación, además de su capacidad para unirse a moléculas HLA que dan como resultado la presentación de complejos de HLA y péptidos sobre superficies celulares, cuyos complejos a su vez actúan como epítopos o dianas para linfocitos T citolíticos, pueden provocar otros tipos de respuestas inmunes, tales como respuestas a linfocitos B que dan como resultado la producción de anticuerpos contra los complejos y/o una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). El último tipo de respuesta inmunitaria se define como enrojecimiento y endurecimiento palpable en el sitio de inyección del péptido de la divulgación.

La composición de vacuna de la divulgación puede comprender cualquiera de los péptidos que se han mencionado anteriormente. La composición de vacuna de la divulgación comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 2 a 100, tal como de 5 a 75, por ejemplo, de 8 a 50, preferiblemente en el intervalo de 9 a 25 aminoácidos de dicho RhoC de la SEQ ID no 1 o dicho homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO 1. En un aspecto preferido, la composición de vacuna comprende una secuencia de RhoC de la SEQ ID NO 1 que es diferente de las secuencias de RhoB de la SEQ ID No 3 en al menos un aminoácido. En un aspecto incluso más preferido, la composición de vacuna comprende una secuencia de RhoC de la SEQ ID NO 1 que es diferente de las secuencias de RhoA de la SEQ ID NO 2 o RhoB de la SEQ ID NO 3 en al menos un aminoácido.

En un aspecto, la composición de vacuna de la divulgación puede comprender un fragmento peptídico que consiste en como mucho 50 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 45 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 40 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 35 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 30 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 25 residuos aminoácidicos, tal como 15 a 20 residuos aminoacídicos.

En otro aspecto, la composición de vacuna de la divulgación puede comprender un fragmento peptídico que consiste en como mucho 20 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 19 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 18 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 17 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 16 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 15 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 14 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 13 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 12 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 11 residuos aminoácidicos, tal como 8 a 10 residuos aminoacídicos.

En otro aspecto, la composición de vacuna de la divulgación puede comprender un fragmento peptídico que consiste en como mucho 100 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 90 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 80 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 70 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 65 residuos aminoácidicos, tal como 26 a 60 residuos aminoacídicos.

En algunos aspectos, la composición de vacuna puede comprender un fragmento peptídico en el intervalo de 8 a 60 aminoácidos, preferiblemente en el intervalo de 8 a 20 aminoácidos, donde se han sustituido como mucho, tres, tal como a lo sumo dos aminoácidos, por ejemplo, como mucho un aminoácido. La sustitución puede ser semi-conservativa o, preferiblemente, la sustitución es conservativa.

Dado que existe la diferencia de secuencia más larga entre RhoA, RhoB y RhoC en el extremo C-terminal de las proteínas, en aspectos preferidos, la composición de vacuna de la divulgación consiste en una secuencia seleccionada entre los 100 aminoácidos más C-terminales, por ejemplo, los 75 aminoácidos más C-terminales, tales como, los 60 aminoácidos más C-terminales de RhoC de SEQ ID nº 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos 70 % de identidad con la SEQ ID NO 1.

En aspectos específicos, la composición de vacuna puede comprender un péptido derivado de RhoC C-terminal que tiene una secuencia seleccionada de entre las siguientes: ATRAGLQVR (SEQ ID NO: 11), TRAGLQVRK (SEQ ID NO: 12), RAGLQVRKN (SEQ ID NO: 13), AGLQVRKNK (SEQ ID NO: 14), GLQVRKNKR (SEQ ID NO: 15), LQVRKNKRR (SEQ ID NO: 16), QVRKNKRRR (SEQ ID NO: 17), VRKNKRRRG (SEQ ID NO: 18), RKNKRRRGC (SEQ ID NO: 19), KNKRRRGCP (SEQ ID NO: 20), NKRRRGCPI (SEQ ID NO: 21), y KRRRGCPIL (SEQ ID NO: 22), donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos, por ejemplo, se ha sustituido como mucho un aminoácido. Preferiblemente no se ha sustituido ningún aminoácido.

En aspectos específicos, Z la composición de vacuna puede comprender un péptido derivado de RhoC C-terminal que tiene una secuencia seleccionada de entre las siguientes: ATRAGLQVRK (SEQ ID NO: 23), TRAGLQVRKN (SEQ ID NO: 24), RAGLQVRKNK (SEQ ID NO: 25), AGLQVRKNKR (SEQ ID NO: 26), GLQVRKNKRR (SEQ ID NO: 27), LQVRKNKRRR (SEQ ID NO: 28), QVRKNKRRRG (SEQ ID NO: 29), VRKNKRRRGC (SEQ ID NO: 30), RKNKRRRGCP (SEQ ID NO: 31), KNKRRRGCPI (SEQ ID NO: 32) y NKRRRGCPIL (SEQ ID NO: 33), donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos, por ejemplo, se ha sustituido como mucho un aminoácido. Preferiblemente no se ha sustituido ningún aminoácido.

En otros aspectos específicos, la composición de vacuna puede comprender un péptido seleccionado del grupo que comprende los siguientes: YVPTVFENYI (SEQ ID NO 34), VPTVFENYIA (SEQ ID NO 35), PTVFENYIAD (SEQ ID NO 36), TVFENYIADI (SEQ ID NO 37), VFENYIADIE (SEQ ID NO 38), FENYIADIEV (SEQ ID NO 39), ENYIADIEVD (SEQ ID NO 40), NYIADIEVDG (SEQ ID NO 41), YIADIEVDGK (SEQ ID NO 42), IADIEVDGKQ (SEQ ID NO 43), LVGNKKDLRQ (SEQ ID NO 44), VGNKKDLRQD (SEQ ID NO 45), GNKKDLRQDE (SEQ ID NO 46), NKKDLRQDEH (SEQ ID NO 47), KKDLRQDEHT (SEQ ID NO 48), DKLRQDEHTR (SEQ ID NO 170), KLRQDEHTRR (SEQ ID NO 50), LRQDEHTRRE (SEQ ID NO 51), RQDEHTRREL (SEQ ID NO 171), QDEHTRRELA (SEQ ID NO 172), LAKMKQEPVR (SEQ ID NO 54), AKMKQEPVRS (SEQ ID NO 55), KMKQEPVRSE (SEQ ID NO 56), MKQEPVRSEE (SEQ ID NO 57), KQEPVRSEEG (SEQ ID NO 58), QEPVRSEEGR (SEQ ID NO 59), EPVRSEEGRD (SEQ ID NO 60), PVRSEEGRDM (SEQ ID NO 61), VRSEEGRDMA (SEQ ID NO 62), RSEEGRDMAN (SEQ ID NO 63), SEEGRDMANR (SEQ ID NO 64), EGRDMANRIS (SEQ ID NO 65), GRDMANRISA (SEQ ID NO 66), RDMANRISAF(SEQ ID NO 67), DMANRISAFG (SEQ ID NO 68), MANRISAFGY (SEQ ID NO 69), ANRISAFGYL (SEQ ID NO 173), NRISAFGYLE (SEQ ID NO 71), RISAFGYLEC (SEQ ID NO 174),

ISAFGYLECS (SEQ ID NO 73), SAFGYLECSA (SEQ ID NO 175), AFGYLECSAK (SEQ ID NO 75), FGYLECSAKT (SEQ ID NO 76), GYLECSAKTK (SEQ ID NO 77), YLECSAKTKE (SEQ ID NO 78), LECSAKTKEG (SEQ ID NO 79), ECSAKTKEGV (SEQ ID NO 80), CSAKTKEGVR (SEQ ID NO 81), SAKTKEGVRE (SEQ ID NO 82), AKTKEGVREV (SEQ ID NO 176), KTKEGVREVF (SEQ ID NO 157), TKEGVREVFE (SEQ ID NO 89), KEGVREVFEM (SEQ ID NO 86) , EGVREVFEMA (SEQ ID NO 177), EVFEMATRAG SEQ ID NO 88), VFEMATRAGL (SEQ ID NO 89), FEMATRAGLQ (SEQ ID NO 90), EMATRAGLQV (SEQ ID NO 91), MATRAGLQVR (SEQ ID NO 92), ATRAGLQVRK (SEQ ID NO 93), TRAGLQVRKN (SEQ ID NO 94), RAGLQVRKNK (SEQ ID NO 10), AGLQVRKNKR (SEQ ID NO 96), GLQVRKNKRR (SEQ ID NO 97), LQVRKNKRRR (SEQ ID NO 98), QVRKNKRRRG (SEQ ID NO 99), VRKNKRRRGC (SEQ ID NO 100), RKNKRRRGCP (SEQ ID NO 101), KNKRRRGCPI (SEQ ID NO 102), NKRRRGCPIL (SEQ ID NO 103) o un homólogo funcional de los mismos, donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos. Preferiblemente no se ha sustituido ningún aminoácido.

En otros aspectos específicos, la composición de vacuna puede comprender un péptido seleccionado del grupo que comprende los siguientes: VPTVFENYI (SEQ ID NO 104), PTVFENYIA (SEQ ID NO 105), TVFENYIAD (SEQ ID NO 106), VFENYIADI (SEQ ID NO 107), FENYIADIE (SEQ ID NO 108), ENYIADIEV (SEQ ID NO 109), NYIADIEVD (SEQ ID NO 110), YIADIEVDG (SEQ ID NO 111), IADIEVDGK (SEQ ID NO 112), VGNKKDLRQ (SEQ ID NO 113), GNKKDLRQD (SEQ ID NO 114), NKKDLRQDE (SEQ ID NO 115), KKDLRQDEH (SEQ ID NO 116), KDLRQDEHT (SEQ ID NO 117), KLRQDEHTR (SEQ ID NO 118), LRQDEHTRR (SEQ ID NO 119), RQDEHTRRE (SEQ ID NO 120), QDEHTRREL (SEQ ID NO 121), AKMKQEPVR (SEQ ID NO 122), KMKQEPVRS (SEQ ID NO 123), MKQEPVRSE (SEQ ID NO 124), KQEPVRSEE (SEQ ID NO 125), QEPVRSEEG (SEQ ID NO 126), EPVRSEEGR (SEQ ID NO 127), PVRSEEGRD (SEQ ID NO 128), VRSEEGRDM (SEQ ID NO 129), RSEEGRDMA (SEQ ID NO 130), SEEGRDMAN (SEQ ID NO 131), GRDMANRIS (SEQ ID NO 132), RDMANRISA (SEQ ID NO 133), DMANRISAF (SEQ ID NO 134), MANRISAFG (SEQ ID NO 135), ANRISAFGY (SEQ ID NO 136), NRISAFGYL (SEQ ID NO 137), RISAFGYLE (SEQ ID NO 138), ISAFGYLEC (SEQ ID NO 139), SAFGYLECS (SEQ ID NO 140), AFGYLECSA (SEQ ID NO 141), FGYLECSAK (SEQ ID NO 142), GYLECSAKT (SEQ ID NO 144), YLECSAKTKE (SEQ ID NO 145), LECSAKTKEG (SEQ ID NO 146), ECSAKTKEGV (SEQ ID NO 147) , CSAKTKEGVR (SEQ ID NO 148), SAKTKEGVRE (SEQ ID NO 149), KTKEGVREV (SEQ ID NO 150), KEGVREVFE (SEQ ID NO 152), EGVREVFEM (SEQ ID NO 153), VFEMATRAG (SEQ ID NO 154), FEMATRAGL (SEQ ID NO 155), MATRAGLQV (SEQ ID NO 157), ATRAGLQVR (SEQ ID NO 158), TRAGLQVRK (SEQ ID NO 159), RAGLQVRKN (SEQ ID NO 160), AGLQVRKNK (SEQ ID NO 161), GLQVRKNKR (SEQ ID NO 162), LQVRKNKRR (SEQ ID NO 163), QVRKNKRRR (SEQ ID NO 164), VRKNKRRRG (SEQ ID NO 165), RKNKRRRGC (SEQ ID NO 166), KNKRRRGCP (SEQ ID NO 167), NKRRRGCPI (SEQ ID NO 168), KRRRGCPIL (SEQ ID NO 169) o un homólogo funcional de los mismos, donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos. Preferiblemente no se ha sustituido ningún aminoácido.

En aspectos específicos, la composición de vacuna puede comprender un péptido que comprende la secuencia RXGLQVRKNK, donde X se selecciona del grupo que consiste en alanina y leucina, y donde dicho fragmento peptídico tiene entre 10 y 150, preferiblemente entre 12 y 120, más preferiblemente entre 15 y 75, aún más preferiblemente entre 20 y 70, incluso más preferiblemente entre 22 y 65, tal como entre 26 y 60 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID 1.

En aspectos específicos, la composición de vacuna puede comprender un péptido que comprende la secuencia RXGLQVRKNK, donde X se selecciona del grupo que consiste en alanina y leucina, y donde dicho fragmento peptídico es como mucho 200, preferiblemente como mucho 100, más preferiblemente es como mucho 60 aminoácidos de longitud.

En otros aspectos específicos, la composición de vacuna puede comprender un péptido que comprende la secuencia RXGLQVRKNK, donde X se selecciona del grupo que consiste en alanina y leucina, y donde dicho fragmento peptídico es entre 4 y 120, preferiblemente entre 8 y 100, más preferiblemente entre 10 y 75, aún más preferiblemente entre 12 y 60, incluso más preferiblemente entre 15 y 40, tal como entre 18 y 25 aminoácidos contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID 1.

En otros aspectos específicos, la composición de vacuna puede comprender un péptido que comprende la secuencia RXGLQVRKNK, donde X se selecciona del grupo que consiste en alanina y leucina, y donde dicho fragmento peptídico es como mucho 200, preferiblemente como mucho 100, más preferiblemente como mucho 60, aún más preferiblemente como mucho 25, incluso más preferiblemente como mucho 20, aún incluso más preferiblemente como mucho 15, tal como a lo sumo 10, por ejemplo, en el intervalo de 8 a 10 aminoácidos

contiguos de RhoC de la SEQ ID NO 1 o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido como mucho tres aminoácidos de la SEQ ID NO 1.

En aspectos muy específicos, la composición de vacuna puede comprender un péptido seleccionado del grupo que comprende los siguientes: VYVPTVFENYIADIEVDGKQV (SEQ ID NO: 5), ILVGNKKLRQDEHTRRLAK (SEQ ID NO: 6) y ELAKMKQEPVRSEEGRDMANR (SEQ ID NO: 7), o un homólogo funcional del mismo, donde se han sustituido como mucho tres aminoácidos, se han sustituido tal como a lo sumo dos aminoácidos, por ejemplo, se ha sustituido como mucho un aminoácido. Preferiblemente no se ha sustituido ningún aminoácido.

En otro aspecto muy específico, la composición de vacuna puede comprender un péptido del extremo C-terminal de RhoC, seleccionado así de entre los siguientesEEGRDMANRISAFGYKECSAKTKEGVREVFEMATRAGLQVRKNKRRRGCPIL (SEQ ID NO: 8) o ATRAGLQVRKNKRRRGCPIL (SEQ ID NO: 4) o RAGLQVRKNK (SEQ ID NO: 10). En otra realización preferida, el péptido es RLGLQVRKNK (SEQ ID NO: 9) que es un péptido artificial, donde la alanina de RAGLQVRKNK (SEQ ID NO: 10) se ha sustituido con leucina.

Se contempla que la composición de vacuna de la divulgación es capaz de provocar una respuesta inmune contra un cáncer que expresa RhoC de la SEQ ID no 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO 1, cuando se administra a un individuo que padece un cáncer que expresa RhoC. En un aspecto preferido, la cáncer es un cáncer metastásico. La composición de vacuna de la divulgación es capaz de provocar la producción en un paciente vacunado de linfocitos T efectores que tienen un efecto citotóxico contra las células cancerosas y/o inducir la infiltración de linfocitos T específicos de antígeno en el estroma tumoral en un sujeto.

La composición de vacuna de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un ácido nucleico que codifica una proteína que pertenece a RhoC o un fragmento peptídico inmunológicamente activo del mismo. Por lo tanto, dicho ácido nucleico puede codificar cualquiera de las proteínas y fragmentos peptídicos que se han mencionado anteriormente. El ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN, ARN, LNA, HNA, PNA, preferiblemente el ácido nucleico es ADN o ARN.

Los ácidos nucleicos de la divulgación pueden comprenderse dentro de cualquier vector adecuado, tal como, un vector de expresión. Numerosos vectores están disponibles y el experto en la técnica será capaz de seleccionar un vector útil para el propósito específico. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o cromosoma artificial. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una diversidad de procedimientos, por ejemplo, se puede insertar ADN en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados usando técnicas bien conocidas en la técnica. Aparte de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación, el vector puede comprender además una o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. El vector también puede comprender secuencias adicionales. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación estándar que se conocen por un experto en la técnica. El vector es preferiblemente un vector de expresión, que comprende el ácido nucleico unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico reguladora dirigiendo la expresión del mismo en una célula adecuada. Dentro del alcance de la presente divulgación, dicha secuencia de ácido nucleico reguladora debe ser en general capaz de dirigir la expresión en una célula de mamífero, preferiblemente una célula humana, más preferiblemente en una célula que presenta antígeno.

En un aspecto de realización preferido, el vector es un vector vírico.

El vector también puede ser un vector bacteriano, tal como un vector bacteriano atenuado. Se pueden usar vectores bacterianos atenuados para inducir respuestas inmunológicas de la mucosa duraderas en los sitios de infección y persistencia. Pueden usarse diferentes bacterias recombinantes como vectores, por ejemplo, el vector bacteriano se puede seleccionar del grupo que consiste en *Salmonella*, Lactococcus], y Listeria. En general, se pudo demostrar la inducción de inmunidad al antígeno heterólogo HPV16 L1 o E7, con fuerte inducción de CTL y regresión tumoral en ratones.

Además, el vector puede comprender también ácidos nucleicos que codifican un polipéptido estimulador de linfocitos T.

Se describe un kit de piezas que comprende

i) cualquiera de las composiciones de vacuna descritas en el presente documento y/o
ii) cualquiera de las proteínas pertenecientes a la familia del gen rho descritas en el presente documento, y/o
iii) cualquiera de los fragmentos peptídicos de las proteínas de ii) descritas en el presente documento, y/o
iv) cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de ii) o los péptidos de iii)
y un agente anti-cáncer adicional.

Los componentes del kit de piezas están comprendidos preferiblemente en composiciones individuales, sin embargo, también se describe que los componentes del kit de piezas están comprendidos dentro de la misma composición. Los componentes del kit de piezas se pueden administrar así simultánea o secuencialmente en cualquier orden.

El agente anti-cáncer puede ser un agente utilizado en quimioterapia o terapia génica, sustancias inmunoestimuladoras o anticuerpos. Las sustancias inmunoestimuladoras pueden ser, por ejemplo, citocinas, tales como citocinas seleccionadas del grupo que consiste en GM-CSF, IFN de tipo I, interleucina 12 e interleucina 15. El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo inmunoestimulador tal como los anticuerpos anti-CD40 o anti-CTLA-4. La sustancia inmunoestimuladora puede ser también una sustancia capaz de agotar las células inhibidoras inmunitarias (por ejemplo, linfocitos T reguladores) o factores, dicha sustancia puede ser, por ejemplo, E3 ubiquitina ligasas. Las E3 ubiquitina ligasas (las proteínas HECT, RING y U-box) han surgido como reguladores moleculares clave de la función celular inmunitaria, y cada una puede estar implicada en la regulación de las respuestas inmunes durante la infección dirigiéndose a moléculas inhibidoras específicas para la destrucción proteolítica. Varias proteínas HECT y RING E3 también se han vinculado a la inducción y el mantenimiento de la auto-tolerancia inmunitaria: Cada una de c-Cbl, Cbl-b, GRAIL, Itch y Nedd4 regula negativamente la producción y proliferación del factor de crecimiento de linfocitos T.

Es evidente que los hallazgos de la presente divulgación proporcionan la base para aplicaciones terapéuticas, así como también aplicaciones de diagnóstico de la proteína o el fragmento peptídico de la invención.

Se describe el cultivo de linfocitos T específicos de RhoC *in vitro* y la transferencia adoptiva de éstas a los pacientes. La transferencia adoptiva significa que el médico transfiere directamente a un paciente los componentes reales del sistema inmunológico que ya son capaces de producir una respuesta inmune específica.

Se describen linfocitos T específicos de RhoC, que pueden ser útiles, por ejemplo, para la transferencia adoptiva. Los linfocitos T aislados que comprenden receptores de linfocitos T capaces de unirse específicamente a complejos péptido RhoC/MHC de clase I o péptido RhoC/MHC de clase II pueden transferirse adoptivamente a los pacientes, siendo dichos linfocitos T preferiblemente linfocitos T que se han expandido *in vitro,* donde el péptido RhoC puede ser cualquiera de los péptidos RhoC mencionados anteriormente en el presente documento. Los métodos de expansión de linfocitos T *in vitro* se conocen bien por el experto en la técnica. Se describen métodos de tratamiento que comprenden la administración de linfocitos T que comprenden receptores de linfocitos T capaces de unirse específicamente a un complejo de péptido RhoC restringido por MHC a un individuo, tal como un ser humano que padece una enfermedad de cáncer, donde el péptido derivado de RhoC puede ser cualquiera de los péptidos RhoC mencionados anteriormente en el presente documento. Se describe el uso de linfocitos T que comprende receptores de linfocitos T capaces de unirse específicamente a RhoC o fragmentos peptídicos de los mismos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de cáncer. La transferencia autóloga de linfocitos T puede realizarse esencialmente como se describe en Walter et al., (1995).

En otro aspecto más, dichos linfocitos T podrían irradiarse antes de la transferencia adoptiva para controlar la proliferación en el paciente. Es posible diseñar la especificidad de los linfocitos T por transferencia génica TCR. Esto permite la transferencia de linfocitos T que llevan la especificidad del péptido RhoC en los pacientes. En general, el uso de linfocitos T para la inmunoterapia adoptiva es atractivo porque permite la expansión de los linfocitos T en un ambiente libre de virus o tumores, y el análisis de la función de los linfocitos T antes de la infusión. La aplicación de linfocitos T modificados con genes TCR (tal como linfocitos T transformados con una construcción de expresión que dirige la expresión de un TCR heterólogo) en la transferencia adoptiva tiene varias ventajas en comparación con la transferencia de líneas de linfocitos T. (i) la generación de linfocitos T redirigidos es generalmente aplicable. (ii) Se pueden seleccionar o crear TCR de alta afinidad o de afinidad muy alta para usarse para diseñar los linfocitos T. (iii) Se pueden generar linfocitos T de alta avidez utilizando TCR optimizados con codones o murinizados que permiten una mejor expresión superficial de los TCR estabilizados. La ingeniería genética de la especificidad de linfocitos T por transferencia génica del receptor de linfocitos T (TCR) se puede realizar esencialmente como se describe en Morgan et al., (2006).

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una composición de vacuna que comprende la proteína o el fragmento peptídico de la divulgación, en particular, una composición farmacéutica que, cuando se administra a un paciente con cáncer metastásico, es capaz de provocar una respuesta inmune contra la enfermedad de cáncer, que incluye provocar la producción en el paciente vacunado de linfocitos T efectos que tienen un efecto citotóxico contra las células cancerosas.

Como es bien sabido que las diferentes moléculas HLA son de prevalencia diferente en las poblaciones humanas principales, existe un requisito de identificación de epítopos peptídicos restringidos a varias moléculas HLA de clase I para extender la cohorte de pacientes que puede tratarse de acuerdo con los métodos de la presente divulgación. La caracterización de múltiples epítopos RhoC con diferentes elementos de restricción de HLA amplía el potencial clínico de este antígeno diana de dos maneras importantes: (i) Aumenta el número de pacientes aptos para la inmunoterapia basada en péptidos derivados de RhoC. El antígeno HLA-A2 se expresa en aproximadamente el 50 % de la población caucásica y asiática, los antígenos HLA-A1 y HLA-A3 se expresan en aproximadamente el 25 % de los caucásicos y el 5 % de los asiáticos, mientras que el antígeno HLA-A11 se expresa en aproximadamente el 15 % de los caucásicos y el 30 % de los asiáticos. A pesar de que estos números no se pueden sumar debido a la co-expresión, una combinación de péptidos restringidos por una multiplicidad de estos incluirá ciertamente la mayoría de los pacientes de cáncer, (ii) El direccionamiento colectivo de varios elementos de restricción en cada paciente es probable que disminuya el riesgo de escape inmune por pérdida del alelo HLA. La pérdida de un único alelo HLA es un componente significativo de las alteraciones del MHC descritas para las células cancerosas, mientras que la pérdida total de la expresión de Clase I es un evento poco frecuente. Por lo tanto, con la identificación de los epítopos RhoC restringidos a diferentes alelos HLA; será posible dirigir más de una molécula HLA simultáneamente en pacientes con solapamiento alélico. Además, con el procesamiento celular del péptido RhoC C-terminal más largo por el proteasoma, será posible dirigir más de una molécula HLA simultáneamente en pacientes con solapamiento alélico.

La divulgación también se refiere a vacunas multi-epítopo altamente inmunógenas. Preferiblemente, dichas vacunas deben estar diseñadas de manera que faciliten la administración simultánea de los péptidos derivados de RhoC más adecuados opcionalmente en combinación con otros péptidos y/o adyuvantes adecuados como se describe en lo sucesivo en el presente documento. La presente divulgación incluye tales vacunas multiepítopo que comprenden péptidos derivados de RhoC opcionalmente en combinación con otras proteínas o fragmentos peptídicos que no pertenecen ni se derivan de RhoC y/o adyuvantes como se describe en lo sucesivo en el presente documento. Un factor importante que impulsa el desarrollo de vacunas que tienen una composición más compleja es el deseo de dirigir múltiples antígenos tumorales, por ejemplo, mediante el diseño de vacunas que comprenden o codifican una colección de epítopos de CTL y células T_h cuidadosamente seleccionados. Por lo tanto, la divulgación en un aspecto se refiere a composiciones de vacuna que comprenden epítopos RhoC restringidos tanto por la Clase I como la Clase II.

Por lo tanto, los péptidos de la presente divulgación comprenden tanto péptidos en una forma corta "preparada para MHC" (restringida a la clase I), como en una forma mayor que requiere procesamiento por el proteasoma (restringida a la clase II).

Dado que los péptidos de la divulgación son moléculas relativamente pequeñas, puede ser necesario en dichas composiciones combinar los péptidos con diversos materiales tales como adyuvantes, para producir vacunas, composiciones inmunógenas, etc. Los adyuvantes, ampliamente definidos, son sustancias que promueven respuestas inmunes. Se proporciona un análisis general de adyuvantes en Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (2ª edición, 1986) en las páginas 61-63. Goding señala, sin embargo, que cuando el antígeno de interés es de bajo peso molecular, o es poco inmunógeno, se recomienda el acoplamiento a un vehículo inmunógeno. Los ejemplos de dichas moléculas vehículo incluyen hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica bovina, ovoalbúmina e inmunoglobulina de aves. También se ha sugerido que varios extractos de saponina son útiles como adyuvantes en composiciones inmunógenas. Se ha propuesto utilizar el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), una citocina bien conocida, como adyuvante (documento WO 97/28816).

Las composiciones de vacuna de acuerdo con la divulgación comprenden preferiblemente un adyuvante y/o un vehículo. A continuación en el presente documento se dan ejemplos de adyuvantes y vehículos útiles. Por lo tanto, la proteína que pertenece a la familia de proteínas del gen Rho o su fragmento peptídico presente en la composición puede asociarse con un vehículo tal como, por ejemplo, una proteína o una célula que presenta antígeno, tal como, por ejemplo, una célula dendrítica (DC) capaz de presentar a la familia de proteínas del gen Rho o su fragmento peptídico a un linfocito T.

Los adyuvantes son cualquier sustancia cuya mezcla en la composición de vacuna aumenta o modifica de otro modo la respuesta inmune al RhoC o fragmento peptídico del mismo. Los vehículos son estructuras de andamio, por ejemplo, un polipéptido o un polisacárido, a los que el RhoC o fragmento peptídico del mismo es capaz de asociarse.

Los adyuvantes pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en: $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH_4(SO_4)$, sílice, alumbre, $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$, caolín, carbono, hidróxido de aluminio, dipéptidos de muramilo, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-DMP), N-acetil-nornuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11687, también denominado como nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'2'-dipalmitoil-sn-glicerol-3-hidroxyfosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, también denominado como MTP-PE), RIBI (MPL+TDM+CWS) en una emulsión al 2 % de esqualeno/Tween-80.RTM., lipopolisacáridos y sus diversos derivados, incluyendo lípido A, adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvantes incompletos de Freund, adyuvante 65 de Merck, polinucleótidos (por ejemplo, poli IC y poli AU ácidos), cera D de Mycobacterium, tuberculosis, sustancias que se encuentran en Corynebacterium parvum, Bordetella pertussis, y miembros del género Brucella, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN (véanse los documentos US 58767 y 5.554.372), derivados del Lípido A, derivados de coleratoxina, derivados de HSP, derivados de LPS, matrices peptídicas sintéticas o GMDP, Interleucina 1, Interleucina 2, Montanide ISA-51 y QS-21. Los adyuvantes preferidos a utilizar con la divulgación incluyen adyuvantes basados en aceite/tensioactivo tales como adyuvantes de Montanide (disponibles en Seppic, Bélgica), preferiblemente Montanide ISA-51. Otros adyuvantes preferidos son adyuvantes a base de ADN bacteriano, tal como adyuvantes que incluyen secuencias oligonucleotídicas CpG. Aún otros adyuvantes preferidos son adyuvantes a base de dsRNA vírico, tal como poli I:C. Las imidazoquininas son otro ejemplo de adyuvantes preferidos. Los adyuvantes más preferidos son adyuvantes adecuados para uso humano. Los liposomas son en general adyuvantes no útiles para la presente divulgación y preferiblemente, las composiciones de vacuna de la divulgación, por lo tanto, no comprenden liposomas.

Los adyuvantes de Montanide (todos disponibles en Seppic, Bélgica), pueden seleccionarse del grupo que consiste en Montanide ISA-51, Montanide ISA-50, Montanide ISA-70, Montanide ISA-206, Montanide ISA-25, Montanide ISA-720, Montanide ISA-708, Montanide ISA-763A, Montanide ISA-207, Montanide ISA-264, Montanide ISA-27, Montanide ISA-35, Montanide ISA 51 F, Montanide ISA 016D y Montanide IMS, preferiblemente del grupo que consiste en Montanide ISA-51, Montanide IMS y Montanide ISA-720, más preferiblemente del grupo que consiste en Montanide ISA-51. Montanide ISA-51 (Seppic, Inc.) es un adyuvante a base de aceite/tensioactivo en el que se combinan diferentes tensioactivos con un aceite mineral no metabolizable, un aceite metabolizable, o una mezcla de los dos. Se preparan para su uso como una emulsión con una solución acuosa que comprende RhoC o un fragmento peptídico del mismo. El tensioactivo es oleato de mannida. QS-21 (Antigenics; Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA) es una saponina hidrosoluble altamente purificada que se manipula como una solución acuosa. Los adyuvantes QS-21 y Montanide ISA-51 pueden proporcionarse en viales estériles de un solo uso.

La citocina GM-CSF bien conocida es otro adyuvante preferido de la presente divulgación. GM-CSF se ha usado como adyuvante durante una década y puede ser preferiblemente GM-CSF como se describe en el documento WO 97/28816.

Se proporciona un análisis general de adyuvantes en Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (2ª Edición, 1986) en las páginas 61-63. Goding señala, sin embargo, que cuando el antígeno de interés es de bajo peso molecular, o es poco inmunógeno, se recomienda el acoplamiento a un vehículo inmunógeno. Los ejemplos de dichas moléculas vehículo incluyen hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica bovina, ovoalbúmina e inmunoglobulina de aves. También se ha sugerido que varios extractos de saponina son útiles como adyuvantes en composiciones inmunógenas. Recientemente, se ha propuesto utilizar el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), una citocina bien conocida, como un adyuvante (documento WO 97/28816).

Las funcionalidades deseables de los adyuvantes que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación se enumeran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Modos de acción del adyuvante

Acción	Tipo de adyuvante	Beneficio
1. Inmunomodulación	Generalmente pequeñas moléculas o proteínas que modifican la red de citocinas	Regulación ascendente de la respuesta inmune. Selección de Th1 o Th2
2. Presentación	Generalmente moléculas o complejos anfipáticos que	Aumento de la respuesta de los anticuerpos neutralizantes.

	interactúan con el inmunógeno en su conformación nativa	Mayor duración de la respuesta
3. Inducción de CTL	• Partículas que pueden unirse o encerrar el inmunógeno y que pueden fusionarse con o interrumpir las membranas celulares	Procesamiento citosólico de la proteína que produce péptidos restringidos de clase 1 correctos
	• emulsiones de agua/aceite para la unión directa del péptido al MHC-1 de superficie celular	Proceso sencillo si se conoce el péptido o péptidos promiscuos
4. Direccionamiento	• Adyuvantes particulados que se unen al inmunógeno. Adyuvantes que saturan las células de Kupffer	Uso eficiente de adyuvante e inmunógeno
	• Adyuvantes de carbohidratos que dirigen receptores de lectina sobre macrófagos y DC.	Como anteriormente. También puede determinar el tipo de respuesta si el direccionamiento es selectivo
5. Generación de depósitos	• emulsión de agua/aceite a largo plazo	Eficiencia potencial de vacunas monodosis
	Microsferas o nanoesferas a largo plazo	
Fuente: Cox, J.C., y Coulter, A.R. (1997). Vaccine 15, 248-56.		

Una composición de vacuna de acuerdo con la presente divulgación puede comprender más de un adyuvante diferente. Además, la divulgación incluye una composición terapéutica que comprende además cualquier sustancia adyuvante que incluye cualquiera de las anteriores o combinaciones de las mismas. También se contempla que RHoC o fragmentos peptídicos del mismo, y el adyuvante pueden administrarse por separado en cualquier secuencia apropiada.

Un vehículo puede estar presente independientemente de un adyuvante. La función de un vehículo puede ser, por ejemplo, aumentar el peso molecular de, en particular, fragmentos peptídicos con el fin de aumentar su actividad o inmunogenicidad, conferir estabilidad, aumentar la actividad biológica, o aumentar la semivida en suero. Además, un vehículo puede ayudar a presentar la proteína que pertenece a la familia del gen rho o fragmentos peptídicos del mismo, a los linfocitos T. El vehículo puede ser cualquier vehículo adecuado conocido por el experto en la técnica, por ejemplo, una proteína o una célula que presenta antígeno. Una proteína portadora puede ser, pero no se limita a, hemocianina de lapa californiana, proteínas séricas, tales como transferrina, albúmina de sérica bovina, albúmina serica humana, tiroglobulina u ovalbúmina, inmunoglobulinas u hormonas, tales como insulina o ácido palmítico. Para la inmunización de seres humanos, el vehículo debe ser un vehículo fisiológicamente aceptable que sea aceptable para los seres humanos y seguro. Sin embargo, el toxoide del tétanos y/o el toxoide de la difteria son vehículos adecuados en un aspecto de la divulgación.

Como alternativa, el vehículo puede ser dextranos, por ejemplo, sepharose.

Por consiguiente, la divulgación incluye una composición terapéutica que comprende además una sustancia adyuvante que incluye cualquiera de las anteriores y combinaciones de las mismas. También se contempla que el antígeno, es decir, el péptido de la divulgación y el adyuvante, pueden administrarse simultáneamente o por separado en una secuencia apropiada.

La elección del antígeno en la composición de vacuna de la divulgación dependerá de los parámetros determinables por el experto en la técnica. Como se ha mencionado, cada uno de los diferentes péptidos de la divulgación está presente en las superficies celulares mediante una molécula HLA particular. Como tal, si se tipifica un sujeto a tratar con respecto al fenotipo HLA, se selecciona un péptido/péptidos que se sabe que se unen a esa molécula HLA particular.

Como alternativa, el antígeno de interés se selecciona basándose en la prevalencia de los diversos fenotipos de HLA en una población dada. Como ejemplo, HLA-A2 es el fenotipo más prevalente en la población caucásica, y por lo tanto, una composición que contiene un péptido que se une a HLA-A2 estará activa en una gran proporción de esa población.

Sin embargo, la composición de la divulgación puede contener también una combinación de dos o más péptidos derivados de RhoC, interaccionando cada uno específicamente con una molécula HLA diferente para cubrir una mayor proporción de la población diana. Por lo tanto, como ejemplos, la composición farmacéutica puede contener una combinación de un péptido restringido por una molécula HLA-A y un péptido restringido por una molécula HLA-B, por ejemplo, incluyendo las moléculas HLA-A y HLA-B que corresponden a la prevalencia de los fenotipos HLA en la población diana, tales como, por ejemplo, HLA-A2 y HLA-B35. Adicionalmente, la composición puede comprender un péptido restringido por una molécula HLA-C.

La cantidad del péptido inmunógeno de la divulgación en la composición farmacéutica puede variar, dependiendo de la aplicación particular. Sin embargo, una única dosis de la composición peptídica está preferiblemente en cualquier lugar entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 5000 µg, más preferiblemente entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 2500 µg, tal como aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1000 µg. Los modos de administración incluyen administración intradérmica, subcutánea e intravenosa, implante en forma de una formulación de liberación en el tiempo, etc. Todas y cada una de las formas de administración conocidas en la técnica se incluyen en el presente documento. También se incluyen todas y cada una de las formas de dosificación convencionales que se conocen en la técnica como apropiadas para formular la composición peptídica inmunógena inyectable, tales como formas liofilizadas y soluciones, suspensiones o formas de emulsión que contienen, si es necesario, vehículos, diluyentes, adyuvantes, componentes tampón, etc., farmacéuticamente aceptables convencionales.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar y administrar usando cualquier protocolo convencional conocido por un experto en la técnica. En el ejemplo 2 se da un ejemplo no limitante de preparación de una composición de vacuna de acuerdo con la divulgación, así como un ejemplo no limitante de administración de tal vacuna. Se apreciará por el experto en la técnica que el protocolo puede adaptarse fácilmente a cualquiera de las composiciones de vacuna descritas en el presente documento.

En un aspecto adicional de la divulgación, la composición farmacéutica de la divulgación es útil para tratar a un paciente de cáncer, donde, durante el avance del cáncer en ese paciente, las células cancerosas han desarrollado una susceptibilidad reducida a un fármaco anticanceroso quimioterapéuticamente activo y/o radioterapia.

Adicionalmente, la composición de acuerdo con la presente divulgación puede proporcionarse como una vacuna multiepítopo que comprende epítopos restringidos a la clase I y epítopos restringidos a la clase II como se ha definido anteriormente en el presente documento.

El efecto inmunoprotector de la composición de la divulgación se puede determinar usando varios enfoques, por ejemplo, como se ha descrito en el documento WO 97/28816, anteriormente. Una respuesta inmune satisfactoria puede determinarse también por la aparición de reacciones DTH después de la inmunización y/o la detección de anticuerpos que reconocen específicamente el péptido o péptidos de la composición de vacuna.

En aspectos preferidos, la composición farmacéutica de la divulgación es una composición de vacuna. La composición farmacéutica puede ser, por lo tanto, una composición inmunógena o una vacuna capaz de provocar una respuesta inmune a una enfermedad de cáncer. Como se usa en el presente documento, la expresión "composición inmunógena o vacuna" se refiere a una composición que provoca al menos un tipo de respuesta inmune dirigida contra células cancerosas. Por lo tanto, tal respuesta inmune puede ser cualquiera de los tipos mencionados anteriormente: Una respuesta CTL donde se generan CTL que son capaces de reconocer el complejo HLA/péptido presentado en las superficies celulares que da como resultado la lisis celular, es decir, la vacuna provoca la producción en el sujeto vacunado de linfocitos T efectores que tienen un efecto citotóxico contra las células cancerosas; una respuesta de linfocitos B que da lugar a la producción de anticuerpos anti-cáncer; y/o un tipo DTH de respuesta inmune.

En aspectos útiles, se induce una respuesta inmunógena dirigida contra una enfermedad de cáncer administrando el péptido de la divulgación cargando moléculas de MHC de clase I o de clase II en células que presentan antígeno (APC) del paciente, aislando PBL del paciente e incubando las células con el péptido antes de inyectar las células de nuevo en el paciente o aislando APC precursoras del paciente y diferenciando las células en APC profesionales usando citocinas y antígenos antes de inyectar las células de nuevo en el paciente.

Se proporcionan composiciones de vacuna que comprenden células que presentan antígenos que comprenden RhoC o un fragmento peptídico inmunológicamente activo del mismo o un ácido nucleico que codifica dicha proteína o dicho fragmento peptídico inmunológicamente activo. La célula que presenta antígeno puede ser cualquier célula

capaz de presentar un antígeno a un linfocito T. Las células que presentan antígeno preferidas son las células dendríticas. Las células dendríticas (DC) pueden prepararse y usarse en un procedimiento terapéutico de acuerdo con cualquier protocolo adecuado, por ejemplo, como se describe más adelante en el presente documento. Se apreciará por el experto en la técnica que el protocolo puede adoptarse para su uso con pacientes con diferentes tipos de HLA y diferentes enfermedades.

Las células dendríticas (DC) pueden pulsarse con 50 µg/ml de péptido HLA-restringido (sintetizado a calidad GMP) durante 1 h a 37 ºC y se administran 5 x 10^6 células por vía subcutánea el día 1 y 14, posteriormente cada 4 semanas, leucaféresis adicional después de 5 vacunaciones. La generación de DC para uso clínico y control de calidad se puede realizar esencialmente como se describe en Nicolette et al., (2007).

Por lo tanto, un método para tratar pacientes de cáncer es uno donde el péptido se administra presentando el péptido a las células que presentan antígeno del paciente (APC) *ex vivo* seguido de la inyección de las APC tratadas de este modo de nuevo al paciente. Hay al menos dos maneras alternativas de realizar esto. Una alternativa es aislar las APC del paciente de cáncer e incubar (cargar) las moléculas del MHC de clase I con el péptido. La carga de las moléculas de MHC de clase I significa incubar las APC con el péptido de manera que las APC con moléculas de MHC de clase I específicas para el péptido se unan al péptido y, por lo tanto, puedan presentarlo a los linfocitos T. Posteriormente, las APC se inyectan de nuevo en el paciente. Otra forma alternativa se basa en los recientes descubrimientos realizados en el campo de la biología celular dendrítica. En este caso, los monocitos (que son precursores de células dendríticas) se aíslan del paciente y se diferencian in vitro en APC profesionales (o células dendríticas) mediante el uso de citocinas y antígenos. Posteriormente, las DC generadas in vitro se pulsan con el péptido y se inyectan en el paciente.

A partir de la descripción anterior, el experto observará fácilmente que las proteínas y/o péptidos de la divulgación son útiles como herramientas de diagnóstico del cáncer. Por lo tanto, los péptidos de la divulgación proporcionan la base para desarrollar procedimientos de diagnóstico y pronóstico ampliamente aplicables con respecto a enfermedades cancerosas. Por lo tanto, en otros aspectos útiles, la composición de la divulgación es una composición para el diagnóstico *ex vivo* o *in situ* de la presencia en un paciente de cáncer, por ejemplo, en base a la detección de linfocitos T reactivos RhoC entre PBL o en el tejido tumoral.

Por consiguiente, en aspectos adicionales, se proporciona un kit de diagnóstico para el diagnóstico *ex vivo* o *in situ* de la presencia en un paciente de cáncer de linfocitos T reactivos de RhoC entre PBL o en tejido tumoral que comprende uno o más péptidos de la divulgación y un método para detectar en un paciente de cáncer la presencia de dichos linfocitos T reactivos, comprendiendo el método poner en contacto un tejido tumoral o una muestra de sangre con un complejo de un péptido de la divulgación y una molécula HLA de Clase I o Clase II o un fragmento de dicha molécula y detectar la unión del complejo al tejido o las células sanguíneas.

Otro enfoque útil de diagnóstico o pronóstico se basa en la generación de anticuerpos en una especie animal heteróloga, por ejemplo, anticuerpos murinos dirigidos contra un péptido derivado de RhoC humano de la divulgación, que puede usarse entonces, por ejemplo, para diagnosticar la presencia de células cancerosas que presentan el péptido. Para tales propósitos de inmunización, la cantidad de péptido puede ser menor que la utilizada en el curso de la terapia *in vivo*, tal como la mencionada anteriormente. En general, una dosis preferida puede variar de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 750 µg de péptido. También es posible producir anticuerpos monoclonales basados en la inmunización con un péptido de la divulgación. Por consiguiente, se describe una molécula, en particular un anticuerpo monoclonal o policlonal que incluye un fragmento de la misma, que es capaz de unirse específicamente a un péptido de la divulgación y a una molécula que es capaz de bloquear tal unión, por ejemplo, un anticuerpo contra el anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra un péptido de la divulgación. Se describen receptores de linfocitos T aislados capaces de unirse específicamente a un péptido o una proteína de la divulgación, así como a ácidos nucleicos aislados que codifican los mismos. Dichos receptores de linfocitos T pueden clonarse, por ejemplo, a partir de linfocitos T específicos de proteínas o péptidos usando técnicas estándar bien conocidas por el experto en la técnica.

Se describen linfocitos T aislados que comprenden receptores de linfocitos T capaces de unirse específicamente a RhoC y/o fragmentos peptídicos de los mismos descritos en el presente documento. Los linfocitos T aislados pueden ser linfocitos T CD8 o linfocitos T CD4. Los linfocitos T aislados son preferiblemente linfocitos T que se han expandido *in vitro*. Los métodos de expansión de linfocitos T *in vitro* se conocen bien por el experto en la técnica. Dichos linfocitos T pueden ser útiles, en particular, en el tratamiento del cáncer mediante transferencia adaptativa o transferencia de células autólogas. Por lo tanto, se describen composiciones farmacéuticas que comprenden linfocitos T, así como métodos de tratamiento que comprenden la administración de linfocitos T que comprenden

receptores de linfocitos T capaces de unirse específicamente a RhoC o fragmentos peptídicos de los mismos a un individuo que lo necesite tal como un ser humano que padece cáncer metastásico. Se describe el uso de linfocitos T que comprende receptores de linfocitos T capaces de unirse específicamente a RhoC o fragmentos peptídicos de los mismos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer metastásico. La transferencia de células autólogas puede realizarse esencialmente como se describe en Walter et al., (1995).

En un aspecto, la divulgación proporciona un complejo de un péptido de la divulgación y una molécula HLA de Clase I o Clase II o un fragmento de dicha molécula, que es útil como un reactivo de diagnóstico tal como se ha descrito anteriormente. Dicho complejo puede ser monomérico o multimérico.

La presente divulgación proporciona los medios para tratar, prevenir, aliviar o curar una afección clínica caracterizada por una proliferación anormal de células, preferiblemente un cáncer, más preferiblemente una enfermedad de cáncer metastático que comprende administrar a un paciente que padece la enfermedad una cantidad eficaz de una composición como se define en el presente documento, una molécula que es capaz de unirse específicamente a un péptido, que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de linfocitos T o el kit de piezas descrito en el presente documento. Por consiguiente, es un aspecto adicional de la divulgación proporcionar un método para tratar una enfermedad de cáncer metastásico asociada con la expresión de un RhoC de la SEQ ID NO 1.

En un aspecto de la divulgación, la composición de vacuna es capaz de provocar una respuesta clínica en un sujeto. En un aspecto, la respuesta clínica puede caracterizarse por una enfermedad estable, en un aspecto preferido, la respuesta clínica puede caracterizarse por una respuesta parcial, o preferiblemente, la respuesta clínica puede caracterizarse por la remisión completa de una enfermedad de cáncer. La respuesta clínica puede determinarse como se describe más adelante en el presente documento.

La enfermedad puede ser, por ejemplo, una enfermedad de cáncer seleccionada del grupo que consiste en; carcinoma de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangeosarcoma, sarcoma linfangeoendotelial, sinovioma, mesotelioma, sarcoma de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistandeocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioblastomas, neurinomas, craniofaringiomas, schwannomas, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurinoma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemias y linfomas, leucemia linfocítica aguda y policitemia vera mielocítica aguda, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de cadena pesada, leucemias no linfocíticas agudas, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, cáncer del recto, cánceres urinarios, cánceres uterinos, cáncer oral, cánceres de piel, cáncer de estómago, tumores cerebrales, cáncer de hígado, cáncer de laringe, cáncer de esófago, tumores de mama, leucemia linfoide aguda infantil (ALL), ALL del timo, ALL de linfocitos B, leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocitoide, leucemia megacariocitoide aguda, linfoma de Burkitt, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, y leucemia de linfocitos T, carcinoma de pulmón de células no pequeñas pequeñas y grandes, leucemia granulocítica aguda, tumores de células germinales, cáncer endometrial, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, leucemia linfoide crónica, leucemia de células pilosas y cáncer de tiroides, donde dicha enfermedad de cáncer es preferiblemente metastásico.

En un aspecto preferido, la composición de vacuna de acuerdo con la divulgación es capaz de provocar una respuesta clínica en el sujeto, donde la respuesta clínica puede caracterizarse por una enfermedad estable, en un aspecto preferido, la respuesta clínica puede caracterizarse por una respuesta parcial o, preferiblemente, la respuesta clínica puede caracterizarse por una remisión completa de un cáncer seleccionado del grupo de; melanoma, cáncer de ovario o cáncer de pulmón, más preferiblemente melanoma metastásico, cáncer de ovario o cáncer de pulmón.

En otro aspecto de la divulgación, la composición de vacuna es capaz de provocar una respuesta clínica en un sujeto, donde la respuesta clínica está caracterizada por un descenso en la suma del diámetro más largo de la mayor lesión diana. El descenso puede determinarse como se describe en el presente documento a continuación.

Todas las lesiones medibles hasta un máximo de cinco lesiones por órgano y 10 lesiones en total, representativas de todos los órganos implicados, deben ser identificadas como lesiones diana y registradas y medidas al inicio.

• Las lesiones diana deben seleccionarse en base a su tamaño (lesiones con el diámetro más largo) y su idoneidad para mediciones repetidas precisas (ya sea por técnicas de imagen o clínicamente).
• Se calculará una suma del diámetro más largo (LD) para todas las lesiones diana y se indicará como la suma del valor inicial LD. La suma del valor inicial LD se utilizará como referencia mediante la cual caracterizar el tumor objetivo.
• Todas las otras lesiones (o sitios de enfermedad) deben identificarse como lesiones no diana y también deben registrarse al inicio. No se requieren mediciones de estas lesiones, pero la presencia o ausencia de cada una de ellas debe observarse durante el seguimiento.

Evaluación de lesiones diana

• *Respuesta completa (CR)*: Desaparición de todas las lesiones diana
• *Respuesta parcial (PR)*: Al menos un 30 % de disminución en la suma del LD de las lesiones diana, tomando como referencia la suma del valor inicial LD
• *Enfermedad progresiva (PD)*: Aumento de al menos un 20 % en la suma del LD de lesiones diana, tomando como referencia la menor suma de LD registrada desde el inicio del tratamiento o la aparición de una o más lesiones nuevas
• *Enfermedad estable (SD)*: No hay suficiente contracción para calificar para PR ni aumento suficiente para calificar PD, tomando como referencia la suma más pequeña LD desde que el tratamiento comenzó

Evaluación de lesiones no diana

• *Respuesta completa (CR)*: Desaparición de todas las lesiones no diana y normalización del nivel del marcador tumoral
• *Respuesta incompleta/Enfermedad estable (SD)*: Persistencia de una o más lesiones no diana y/o mantenimiento del nivel de marcador tumoral por encima de los límites normales
• *Enfermedad progresiva (PD):* Aspecto de una o más lesiones nuevas y/o progresión inequívoca de lesiones no diana existentes

En algunos casos será apropiado combinar el método de tratamiento de la invención con un tratamiento de cáncer convencional adicional tal como quimioterapia, radiotermia, tratamiento con sustancias inmunoestimulantes, terapia génica, tratamiento con anticuerpos y tratamiento usando células dendríticas. Dado que la expresión elevada de RhoC en las células tumorales está correlacionada con la resistencia a fármacos, la combinación de una inmunoterapia basada en RhoC como se desvela por la presente divulgación con quimioterapia citotóxica podría ser un enfoque eficaz para tratar el cáncer.

Se describen métodos de control de la inmunización, comprendiendo dicho método las etapas de

i) proporcionar una muestra de sangre de un individuo
ii) proporcionar RhoC o un fragmento peptídico del mismo, donde dicha proteína o péptido puede ser cualquiera de las proteínas o péptidos que se describen en el presente documento
iii) determinar si dicha muestra de sangre comprende anticuerpos o linfocitos T que comprenden receptores de linfocitos T que se unen específicamente a la proteína o el péptido
iv) determinar así si una respuesta inmune a dicha proteína o péptido se ha elevado en dicho individuo.

El individuo es preferiblemente un ser humano, por ejemplo, un ser humano que ha sido inmunizado con RhoC o un fragmento peptídico del mismo o un ácido nucleico que codifica dicha proteína o péptido.

Descripción de los dibujos

Figura 1. Alineación de RhoC, RhoA y RhoB. Alineaciones de secuencia de RhoC humano, RhoA humano y RhoB humano.
Figura 2. Afinidad de unión de Rho1 y Rho1 L2. La estabilización de Rho1 y Rho1 L2 se analizó por ensayo de ensamblaje. Las bandas de cadena pesada de MHC de clase I se cuantificaron en un Phosphorimager. La cantidad de cadena pesada HLA-A3 estabilizada está directamente relacionada con la afinidad de unión del péptido añadido. La unión del péptido de control positivo restringido por HLA-A3 Influenza $NP_{265-273}$ se comparó con el péptido Rho1

L2 y el péptido nativo Rho1.

Figura 2. Respuestas de linfocitos T restringidos a HLA-A3 contra Rho1 L2 según se midió por IFN-γ ELISPOT. El número medio de manchas de IFN-γ específicas del péptido formadas en respuesta a Rho1L2 entre 5 x 10^5 PBMC estimulados *in vitro* de cinco donantes sanos HLA-A3$^+$ (HD), PBL de 10 pacientes de carcinoma de células renales (RCC), y 10 pacientes de melanoma (MM). Las mediciones se hicieron por triplicado. El número de manchas específicas de antígeno se calculó restando el número medio de manchas de los pocillos de control del número medio de manchas en los pocillos positivos; con el fin de evitar que las réplicas con una variación estándar elevada se acepten como resultados positivos, todas las réplicas se analizaron mediante la prueba t de Student para muestras no emparejadas, los resultados con un valor de $p < 0,05$ se consideraron positivos.

Figura 3. Especificidad de antígeno de linfocitos T y reactividad cruzada Citotoxicidad por ensayo de liberación de ^{51}de un cultivo en masa estimulado con DC autólogas cargadas con Rho1 L2/PBL autólogo. Lisis específica de células T2-A3 sin péptido o pulsada con Rho1 L2 o Rho1. Relación E:T = 60:1, las mediciones se hicieron por duplicado. a) Especificidad de un clon de linfocitos T (clon 9) ensayado por ensayo de liberación de ^{51}Cr. Lisis de células T2-A3 sin péptido, pulsada con Rho1 L2, Rho1 o con el anticuerpo específico de HLA de clase I W6/32 o anticuerpo específico de HLA-A3 GAP A3 a diferentes relaciones E:T (9:1; 3:1; 1:1; 0,3:1).

Figura 4. Capacidad funcional de los linfocitos T específicos de RhoC

a) Citotoxicidad de un cultivo en masa estimulado con DC autóloga cargadas con Rho1 L2/PBL autólogo. Lisis específica de la línea celular de melanoma de HLA-A3$^+$ FM3 con y sin la adición del anticuerpo específico de HLA de clase I W6/32.

b) Lisis por un clon específico de Rho1 L2 de la línea celular de melanoma de HLA-A3$^+$ FM3, lisis celular con adición de células T2-A3 no marcadas pulsada con Rho1 L2 o sin péptido (relación inhibidor-diana = 20:1), y lisis celular de la línea celular de melanoma de HLA-A3$^+$ FM9 y la línea celular de melanoma de HLA-A3- FM82. Las mediciones se hicieron por duplicado para todas las relaciones E:T.

c) Lisis por un clon específico de Rho1 L2 de la línea celular de cáncer de mama de HLA-A3$^+$ BT-20, línea celular de cáncer de colon HT-29 y línea celular de cáncer de cabeza y cuello CRL-2095. Las mediciones se hicieron por duplicado para todas las relaciones E:T.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Respuestas inmunes contra RhoC

1. Pacientes

Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica (PBL) de pacientes con cáncer de HLA-A3$^+$ o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de controles sanos del University Hospital Herlev, Dinamarca. Las células se crioconservaron en FCS con DMSO al 10 %. La tipificación de tejidos se realizó en el Department of Clinical Immunology, The State Hospital, Copenhagen, Dinamarca. El consentimiento informado se obtuvo de los pacientes antes de cualquiera de estas medidas.

2. Ensayo de ensamblaje para la unión peptídica a moléculas de MHC de clase I

La afinidad de unión de los péptidos sintéticos (Genscript, Scotch Plains, Estados Unidos) a las moléculas HLA-A3 se midió por medio del ensayo de ensamblaje según se describe (13). El ensayo se basa en la estabilización de la molécula de clase I después de la carga de diferentes concentraciones de péptido a la línea celular T2-A3 deficiente en TAP. En resumen, se incubaron células T2-A3 en RPMI 1640 libre de metionina (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) con FCS dializado al 10 %. Posteriormente, las células se marcaron metabólicamente con 50 µCi ^{35}S-metionina (Amersham, Birkeroed, Dinamarca). Después de la incubación, las células se lisaron en tampón de lisis en presencia de inhibidores de proteasa (100 µg/ml de yodoacetamida, 200 µg/ml de bloque de PEFA y 2 µg de pepstatina (Roche diagnostics, Hvidovre, Dinamarca)) y con péptido en concentraciones variables (4-0,04 µM). Los núcleos celulares se eliminaron por ultracentrifugación. El sobrenadante de las células T2-A3 se calentó durante 5 minutos a 45 ºC con el fin de reducir las señales de fondo desestabilizando preferiblemente el HLA-A3 vacío. Las muestras se depuraron previamente mediante la adición de Pansorbina (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) y se dejaron en rotación durante una noche. Las moléculas HLA plegadas de forma estable se inmunoprecipitaron usando el mAb dependiente de conformación específico de HLA de Clase I W6/32. Se añadieron perlas de A-Sepharose para recoger los complejos de MHC plegados y se separaron mediante electroforesis en gel de enfoque isoeléctrico. Las cadenas pesadas de MHC se cuantificaron usando el programa ImageGauge Phosphorimager (FUJI Photo Film). La intensidad de la banda está directamente relacionada con la cantidad de complejo MHC de clase I unido a péptido recuperado durante el ensayo. Posteriormente, el grado de estabilización de HLA-A3 está

directamente relacionado con la afinidad de unión del péptido añadido. El valor C_{50} se calculó para cada péptido como la concentración de péptido suficiente para la estabilización máxima media.

3. Estimulación Ag de PBL

Para extender la sensibilidad del ensayo ELISPOT, se estimularon PBL una vez antes del análisis. El día 0, los PBL se descongelaron y se sembraron en placas de 24 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en medio X-Vivo (Cambrex Bio Science Copenhague, Vallensbaek Strand, Dinamarca) con suero humano inactivado por calor al 5 % en presencia de 10 µM de péptido (GenScript, Scotch Plains, Estados Unidos). Al día siguiente se añadieron 20 U/ml de IL-2 (PeproTech, Londres, Reino Unido) a los cultivos. Las células cultivadas se ensayaron para determinar la reactividad en el ELISPOT el día 8.

4. Interferón-gamma (ensayo ELISPOT INF-gamma)

El ensayo ELISPOT se usó para cuantificar células efectoras de liberación de INF-γ específicas de epítopo de péptido como se ha descrito previamente (documento WO 2005/049073, Ejemplo 1.2). En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (MultiScreen MAIP N45, Millipore, Hedehusene, Dinamarca) con anticuerpo anti-IFN-γ (1-D1K, Mabtech, Nacka, Suecia). Los pocillos se lavaron, se bloquearon con medio X-vivo antes de añadir 10^4 células estimuladoras T2-A3 (con o sin péptido 10 µM, Rho1 L2: RLGLQVRKNK; Rho1: RAGLQVRKNK (GenScript, Scotch Plains, Estados Unidos)) y células efectoras a diferentes concentraciones. Las placas se incubaron durante una noche. Al día siguiente, el el medio se desechó y los pocillos se lavaron antes de la adición de anticuerpo secundario biotinilado (7-B6-1-Biotina, Mabtech, Nacka, Suecia). Las placas se incubaron durante 2 horas, se lavaron y se añadió a cada pocillo conjugado de Avidina-enzima (AP-Avidina, Calbiochem, Life Technologies, Inc., Roskilde, Dinamarca). Las placas se incubaron a TA durante 1 h antes de añadir a cada pocillo el sustrato enzimático NBT/BCIP (Gibco Life Technology, Taastrup, Dinamarca) y se incubaron a TA durante 5-10 min. La reacción se terminó con agua corriente tras la emergencia de manchas de color púrpura oscuro. Las manchas se contaron usando el Analizador ImmunoSpot® Serie 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, Estados Unidos) y la frecuencia de CTL específica de péptido se pudo calcular a partir del número de células formadoras de manchas. El número de manchas específicas de antígeno se calculó restando el número medio de manchas de los pocillos de control del número medio de manchas en los pocillos positivos; las respuestas con un valor de $p < 0,05$ (prueba t de Student para muestras no emparejadas) se consideraron como positivas. La definición es con respecto al proyecto de pruebas entre laboratorios CIMT Monitoring Panel (www.c-imt.org).

5. Células dendríticas (DC)

Se generaron DC a partir de PBMC por adherencia en placas de cultivo a 37 ºC durante 60 min en RPMI-1640 enriquecido con suero AB humano al 10 %. Los monocitos adherentes se cultivaron en RPMI-1640 complementado con suero AB humano al 10 % en presencia de IL-4 (1000 U/ml) y GM-CSF (800 U/ml) durante 6 días. Las DC se maduraron mediante la adición de IL-1β (2 ng/ml), IL-6 (1000 U/ml), TNF-α (10 ng/ml) y PGE_2 (1 µg/ml). Al día siguiente, las DC maduras resultantes se pulsaron con péptido 10 µM durante 2 horas a 37 ºC, se irradiaron (20 Gy) y se usaron 1 x 10^5 DC/ml para la estimulación de 1 x 10^6PBUml en presencia de 40 U/ml de IL-2. Se añadió IL-2 cada 3-4 días.

6. Establecimiento de cultivos y clones de linfocitos T específicos de antígenos

PBL de un paciente de melanoma (MM) fueron estimulados con DC cargadas con Rho1L2 irradiadas (20 Gy) autólogas (relación PBL:DC = 3 x 10^6: 3 x 10^5). Al día siguiente se añadieron 120 U/ml de IL-2 (PeproTech, Londres, Reino Unido). La estimulación de los cultivos se realizó cada 10 días con DC autólogas irradiadas cargadas con Rho1 L2 (2 x) seguido de PBL autólogos irradiados cargados con Rho1 L2 (3 x). Se añadieron ciento veinte U/ml de IL-2 (PeproTech, Londres, Reino Unido) después de cada estimulación. Después de un mes, se ensayaron los cultivos de cultivo para determinar la especificidad de Rho1 L2.

PBL de un cultivo específico se clonaron limitando la dilución en presencia de una mezcla de clonación que contenía 10^6/ml de linfocitos irradiados (20 Gy) de tres donantes sanos en X-vivo con suero humano inactivado por calor al 5 %, tampón HEPES 25 mM (GibcoBRL, Paisley, Reino Unido), y 120 U/ml de IL-2 (PeproTech, Londres, Reino Unido). Las placas se incubaron a 37 ºC/CO_2 al 5 %. Cada 3-4 días se añadieron 50 µl de medio fresco que contenía IL-2 a una concentración final de 120 U/ml. Los clones en crecimiento se expandieron utilizando células de mezcla de clonación (5 x 10^4 células/pocillo) e IL-2. Después de la expansión, los clones se ensayaron para determinar la especificidad y el potencial citotóxico en un ensayo de liberación ^{51}Cr estándar.

7. Ensayo de citotoxicidad

Los ensayos de liberación de ^{51}Cr convencionales para la citotoxicidad mediada por CTL se realizaron como se describe en otro lugar (Andersen et al., (1999) J Immunol 163: 3812-3818). Las células diana eran células T2-A3, la línea celular de cáncer de mama de HLA-A3$^+$ BT-20, la línea celular de cáncer de colon de HLA-A3$^+$ HT-29, la línea celular de cáncer de cabeza y cuello de HLA-A3$^+$ CRL-2095 (todas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC)), la línea celular de melanoma de HLA-A3$^+$ FM9, la línea celular de melanoma de HLA-A3-FM82, y la línea celular de melanoma de HLA-A3$^+$ FM3 (Kirkin et al., (1995) Cancer Immunol Immunother 41: 71-81), con o sin mAb específico de HLA añadido W6/32 (Barnstable et al., (1978) Cell 14: 9-20) (2 µg/100 µl)(Schmidt et al., (2003) Blood 102: 571-576) o el anticuerpo específico de HLA-A3 GAPA3 (Sire et al., (1988) 140: 2422-2430).

Resultados

Péptidos de unión a HLA-A3 de RhoC

RhoC difiere principalmente de RhoA y RhoB en la parte C-terminal de la secuencia. Por lo tanto, esta región de 20 aminoácidos se analizó para determinar los epítopos HLA putativos utilizando los residuos de anclaje específicos de HLA principales como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se identificó un posible péptido restringido a HLA-A3 Rho1 (RAGLQVRKNK). Sin embargo, como la alanina es un mal aminoácido de anclaje en la posición 2, se esperaba únicamente que este péptido se uniera a HLA-A3 con baja afinidad. Como muchos de los epítopos de linfocitos T establecidos presentados por células cancerosas tales como los antígenos de melanoma gp100 y MART-1 tienen afinidades de unión relativamente bajas a las respectivas moléculas HLA de clase I, es una práctica común generar péptidos heterocíticos a partir de dichos epítopos de baja afinidad por sustitución de aminoácidos en posiciones específicas, es decir, las posiciones de anclaje, que son cruciales para la unión del péptido a la molécula HLA (Pardoll DM (1998) Nat Med 4: 525-531; Scheibenbogen C., et al, (2002) Int J Cancer 98: 409-414). En consecuencia, se incluyó un homólogo modificado Rho1 L2 (R*L*GLQVRKNK) en estos estudios, en la que la posición 2 se modificó de Alanina a Leucina. Los dos péptidos se sintetizaron y se examinaron para determinar la unión a HLA-A3 por comparación con el epítopo de control positivo de alta afinidad HLA-A3 de Influenza $NP_{265-273}$ (ILRGSVAHK) mediante el ensayo de ensamblaje (Figura 2). La concentración peptídica requerida para la recuperación máxima media de moléculas MHC de clase I (valor C_{50}) era de 0,3 µM para la Influenza $NP_{265-273}$ (Figura 2). El péptido Rho1 L2 modificado se unió con afinidad intermedia (C_{50} = 4), mientras que el péptido nativo Rho1 se unió únicamente muy débilmente a HLA-A3 (C_{50} > 40).

Respuestas de linfocitos T espontáneas a RhoC

Se analizaron los PBL de pacientes de HLA-A3$^+$ MM y de carcinoma de células renales (RCC) para determinar la presencia de respuestas de linfocitos T específicas contra el péptido Rho1L2 modificado (R*L*GLQVRKNK) por medio del ensayo de secreción ELISPOT IFN-γ. Como se representa en la Figura 3, las respuestas de linfocitos T específicas estaban presentes entre PBL de 3 de 10 pacientes de MM. No se detectaron respuestas ni en pacientes de RCC ni en controles sanos (HD) contra Rho1L2 o Rho1.

Especificidad del antígeno de linfocitos T y reactividad cruzada de Rho 1/Rho 1 L2

Habiendo identificado los pacientes que reciben respuestas contra el péptido Rho1 L2, se utilizó PBL de estos pacientes con cáncer para generar cultivos en masa de CTL contra este peptido *in vitro*. Posteriormente, se estimuló *in vitro* PBL de al paciente con DC autólogas pulsadas con Rho1 L2. Después de cuatro reestimulaciones *in vitro*, se ensayó la especificidad del péptido en ensayos estándar de liberación de ^{51}Cr usando células T2-A3 sin péptido o cargadas con Rho1 o Rho1 L2 como células diana (Figura 4a). Este ensayo reveló que los cultivos en masa lisaron ambas células T2-A3 pulsadas con Rho1 L2 y Rho1 eficientemente, mientras que no se observó citotoxicidad contra las células T2-A3 no pulsadas.

A continuación, los clones CTL se establecieron a partir de estos cultivos de linfocitos T específicos por dilución limitante. Después de una etapa de expansión corta, la especificidad de los clones en crecimiento se analizó en ensayos de liberación estándar de ^{51}Cr. Los datos presentados describen los resultados obtenidos para un clon en crecimiento (clon 9(*)). Este clon lisó de manera eficaz las células T2-A3 lisadas tanto con el Rho1 L2 modificado como con el péptido Rho1 nativo, subrayando que los linfocitos T específicos de Rho1 L2 reaccionan de forma cruzada con el péptido análogo nativo (Figura 4b). Para examinar la restricción a HLA del clon 9, se ensayó el efecto de bloquear la clase I de HLA mediante la adición del mAb W6/32 específico de HLA y el mAb GAP A3 específico de

HLA-A3. La lisis podría estar completamente bloqueada por la incubación de las células diana con ambos anticuerpos (Figura 4b).

Capacidad de los linfocitos T específicos de RhoC para matar las células tumorales

En primer lugar, se examinó la capacidad de los cultivos en masa específicos de Rho1 L2/Rho1 para matar células de melanoma. Con este fin, las células de melanoma HLA-$A3^+$ FM3 se mataron con alta eficacia en una materia restringida a HLA, ya que la lisis podría bloquearse completamente mediante la incubación de células diana FM3 con W6/32 (Figura 5a).

Asimismo, el clon 9 generado a partir del cultivo en masa específico fue capaz de matar las células de melanoma FM3 (Figura 5b). La adición de células T2-A3 frías (no marcadas) pulsadas con el péptido Rho1 L2 suprimió completamente la muerte de las células de melanoma FM3 (Figura 5b). Además, el clon CTL específico de RhoC fue capaz de lisar la línea celular de cáncer de melanoma de HLA-$A3^+$ + FM9. Como un control adicional, se utilizó la línea celular de melanoma de HLA-$A3^-$ FM82 como células diana. No se observó citotoxicidad frente a esta línea celular.

Dado que la expresión de RhoC en cáncer metastásico se ha descrito en cánceres de diferentes orígenes, se examinó además la capacidad de clon CTL específico de RhoC para matar otras células cancerosas distintas del melanoma. Posteriormente, se usaron como células diana la línea celular de cáncer de mama de HLA-$A3^+$ BT-20, la línea celular de cáncer de cabeza y cuello de HLA-$A3^+$ CRL-2095, y la línea celular de colon de HLA-$A3^+$ HT-29. El clon CTL específico de RhoC lisó todas las líneas celulares de HLA-$A3^+$, aunque la línea celular de colon HT-29 únicamente en una extensión limitada.

Ejemplo 2: Ejemplo no limitante de preparación de una composición de vacuna y ejemplo no limitante de administración de vacuna

Vacuna peptídica

Los péptidos RhoC pueden, por ejemplo, en la unidad de núcleo biomolecular UVA con un extremo NH_2 de amida libre y un extremo COOH de ácido libre. Cada uno se proporciona como un péptido liofilizado, que luego se reconstituye en agua estéril y se diluye con una solución de Ringer de lactato (LR, Baxter Healthcare, Deerfield, IL) como un tampón para una concentración final de Ringer lactato al 67-80 % en agua. Estas soluciones se filtran entonces de forma estéril, se colocan en viales de vidrio de borosilicato y se someten a una serie de estudios de garantía de calidad que incluyen la confirmación de identidad, esterilidad, seguridad general y pureza, de acuerdo con las directrices de la FDA, según se define en IND 6453.

En circunstancias prácticas, los pacientes recibirán una vacuna que comprende aproximadamente 100 µg de un péptido restringido por HLA de clase I o un péptido restringido por HLA de clase II o una combinación de ambos. Los pacientes son vacunados, por ejemplo, con aproximadamente 100 µg del péptido HLA de clase I en un adyuvante en solitario, o se vacunan con 100 µg del péptido HLA de clase II en un adyuvante en solitario o se vacunan con, por ejemplo, aproximadamente 100 µg del péptido restringido a HLA de clase I más 190 µg del péptido restringido a la de clase II. La dosis más alta del péptido Clase II en la combinación se calcula para proporcionar cantidades equimolares de los epítopos auxiliar y citotóxico. Adicionalmente, los pacientes pueden vacunarse con un péptido más largo que comprende las secuencias aminoacídicas de ambos péptidos.

Los péptidos anteriores, en una solución acuosa de 1 ml, se pueden administrar en forma de una solución/suspensión con aproximadamente 100 µg de QS-21, o como una emulsión con aproximadamente 1 ml de adyuvante Montanide ISA-51.

Los pacientes se inmunizan, por ejemplo, el día 0 y los meses 1, 2, 3, 6, 9 y 12, con los péptidos más adyuvante, para un total de siete inmunizaciones. Con raras excepciones, las vacunas se administran al mismo brazo con cada vacuna. Los péptidos se administran preferiblemente por vía s.c.

Lista de referencias

Abecassis et al., RhoA induces MMP-9 expression at CD44 lamellipodial focal complexes and promotes HMEC-1 cell invasion. Exp Cell Res. 2003 Dec 10;291 (2):363-76
Allal, C., et al., RhoA prenylation is required for promotion of cell growth and transformation and cytoskeleton

organization but not for induction of serum response element transcription J. Biol. Chem. 2000, 275:31001
Andersen MH., Bonfill JE., Neisig A., Arsequell G., Sondergaard I., Valencia G et al., (1999) "Phosphorylated peptides can be transported by TAP molecules, presented by MHC molecules and recognized by phosphopeptide-specific CTL" J Immunol 163:3812-3818
Barnstable CJ., Bodmer WF., Brown G., Galfre G., Milstein C., Williams AF., et al., (1978) "Production of monoclonal antibodies to group-A erythrocytes" Cell 14: 9-20
Bishop, A. L., Hall, A., Rho GTPases and their effector proteins, Biochem. J. 2000, 348 (Pt. 2):241
Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. Nature. 2000 Aug 3;406(6795):532-5
Horiuchi A, Imai T, Wang C, Ohira S, Feng Y, Nikaido T, Konishi I. Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. Lab Invest. 2003 Jun;83(6):861-70
Kirkin AF., Reichert Petersen T., Olsen AC., Li L., Straten P., Zeuten J., et al., (1995) "Generation of human-melanoma specific T lymphocyte clones defining novel cytolytic target with panels of newly established melanoma cell lines " Cancer Immunol Immunother 41:71-81
Kleer CG, van Golen KL, Zhang Y, Wu ZF, Rubin MA, Merajver SD. Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. Am J Pathol. 2002 Feb;160(2):579-84
Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science 2006; 314(5796):126-129.
Nicolette CA, Healey D, Tcherepanova I, Whelton P, Monesmith T, Coombs L, Finke LH, Whiteside T, Miesowicz F. Dendritic cells for active immunotherapy: optimizing design and manufacture in order to develop commercially and clinically viable products. Vaccine. 2007 Sep 27;25 Suppl 2:B47-60. Epub 2007 Jun 21
Pardoll DM (1998) "Cancer vaccines" Nat Med 4: 525-531
Scheibenbogen C., Sun Y., Keilholz U., Song M., Stevanovic S., Asemissen AM., et al, (2002) "Identification of known and novel immunogenic T-cell epitopes from tumor antigens recognized by peripheral blood T cels from patients responding to IL-based treatment" Int J Cancer 98: 409-414
Schmidt SM, Schag K., Muller MR., Weck MM., Appel S., Kanz L., et al., (2003) "Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells" Blood 102: 571-576)
Shao, F., Dixon, J. E., YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. Adv. Exp. Med. Biol. 2003, 529:79
Sire J., Chimini G., Boretto J., Toubert A., Kahnperles B., Layet C., et al., (1988) "Hybrid genes between Hla-A2 and Hla-A3 constructed by invivo recombination allow mapping of Hla-A2 and Hla-A3140: 2422-2430
Stamatakis, K., et al., Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation. A novel determinant in the complex regulation of RhoB expression by the mevalonate pathway. J. Biol. Chem 2002, 277:49389
Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. N Engl J Med 1995; %19;333(16):1038-1044.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Rhovac ApS
<120> Inmunoterapia basada en RhoC
<130> P1746 DK00
<160> 177
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1

<211> 193
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

```
Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly Ala Cys
1               5                  10                  15

Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe Pro Glu
            20                  25                  30

Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Ile Ala Asp Ile Glu Val
        35                  40                  45

Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
    50                  55                  60

Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile
65                  70                  75                  80

Leu Met Cys Phe Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro
                85                  90                  95

Glu Lys Trp Thr Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile
            100                 105                 110

Ile Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Gln Asp Glu His Thr Arg
        115                 120                 125

Arg Glu Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Arg Ser Glu Glu Gly
    130                 135                 140

Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Leu Glu Cys Ser
145                 150                 155                 160

Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala Thr Arg
                165                 170                 175

Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro Ile
            180                 185                 190

Leu
```

<210> 2
<211> 193
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

```
Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly Ala Cys
1               5                  10                  15

Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe Pro Glu
            20                  25                  30

Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val
        35                  40                  45

Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
    50                  55                  60

Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile
65                  70                  75                  80

Leu Met Cys Phe Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro
                85                  90                  95

Glu Lys Trp Thr Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile
            100                 105                 110

Ile Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Asn Asp Glu His Thr Arg
        115                 120                 125

Arg Glu Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Lys Pro Glu Glu Gly
    130                 135                 140

Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Gly Ala Phe Gly Tyr Met Glu Cys Ser
145                 150                 155                 160

Ala Lys Thr Lys Asp Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala Thr Arg
                165                 170                 175

Ala Ala Leu Gln Ala Arg Arg Gly Lys Lys Lys Ser Gly Cys Leu Val
            180                 185                 190

Leu
```

<210> 3
<211> 196
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

```
Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Val Val Gly Asp Gly Ala Cys
1               5                  10                  15

Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Glu Phe Pro Glu
            20                  25                  30

Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val
        35                  40                  45

Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
    50                  55                  60

Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile
65                  70                  75                  80

Leu Met Cys Phe Ser Val Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro
                85                  90                  95

Glu Lys Trp Val Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile
            100                 105                 110

Ile Leu Val Ala Asn Lys Lys Asp Leu Arg Ser Asp Glu His Val Arg
        115                 120                 125

Thr Glu Leu Ala Arg Met Lys Gln Glu Pro Val Arg Thr Asp Asp Gly
    130                 135                 140

Arg Ala Met Ala Val Arg Ile Gln Ala Tyr Asp Tyr Leu Glu Cys Ser
145                 150                 155                 160

Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Thr Ala Thr Arg
                165                 170                 175

Ala Ala Leu Gln Lys Arg Tyr Gly Ser Gln Asn Gly Cys Ile Asn Cys
            180                 185                 190

                        Cys Lys Val Leu
                        195
```

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

```
Ala Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly
1               5                  10                  15

Cys Pro Ile Leu
            20
```

<210> 5
<211> 21

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

```
Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Ile Ala Asp Ile Glu Val
1               5                   10                  15

Asp Gly Lys Gln Val
            20
```

<210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

```
Ile Leu Val Gly Asn Lys Lys Leu Arg Gln Asp Glu His Thr Arg Arg
1               5                   10                  15

Leu Ala Lys
```

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

```
 Glu Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Arg Ser Glu Glu Gly Arg
 1               5                   10                  15

                          Asp Met Ala Asn Arg
                                      20
```

<210> 8
<211> 52
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

```
Glu Glu Gly Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Lys
1               5                   10                  15

Glu Cys Ser Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met
            20                  25                  30

Ala Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly
        35                  40                  45

Cys Pro Ile Leu
    50
```

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Sustitución de A a L de la secuencia de RhoC humano RAGLQVRKNK
<400> 9

```
                        Arg Leu Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys
                        1               5                   10
```

<210> 10
<211> 10
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 10

Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys
1 5 10

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11

Ala Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12

Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13

Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14

Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15

Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16

Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17

Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18

Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 19

Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20

Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21

Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro Ile
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 22

Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro Ile Leu
1 5

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23

Ala Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24

Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn
1 5 10

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25

Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 26

Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg
1 5 10

<210> 27

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 27

Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 28

Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 29

Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 30

Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys
1 5 10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 31

Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro
1 5 10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32

Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro Ile
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 33

Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro Ile Leu
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 34

Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Ile
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Ile Ala
1 5 10

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 36

Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Ile Ala Asp
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 37

Thr Val Phe Glu Asn Tyr Ile Ala Asp Ile
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 38

Val Phe Glu Asn Tyr Ile Ala Asp Ile Glu
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 39

Phe Glu Asn Tyr Ile Ala Asp Ile Glu Val
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 40

Glu Asn Tyr Ile Ala Asp Ile Glu Val Asp
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 41

Asn Tyr Ile Ala Asp Ile Glu Val Asp Gly
1 5 10

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 42

Tyr Ile Ala Asp Ile Glu Val Asp Gly Lys
1 5 10

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 43

Ile Ala Asp Ile Glu Val Asp Gly Lys Gln
1 5 10

<210> 44

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 44

Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Gln
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 45

Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Gln Asp
1 5 10

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 46

Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Gln Asp Glu
1 5 10

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 47

Asn Lys Lys Asp Leu Arg Gln Asp Glu His
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 48

Lys Lys Asp Leu Arg Gln Asp Glu His Thr
1 5 10

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 49

Lys Leu Arg Gln Asp Glu His Thr Arg
1 5

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 50

Lys Leu Arg Gln Asp Glu His Thr Arg Arg
1 5 10

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 51

Leu Arg Gln Asp Glu His Thr Arg Arg Glu
1 5 10

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 52

Gln Asp Glu His Thr Arg Arg Glu Leu
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 53

Asp Glu His Thr Arg Arg Glu Leu Ala
1 5

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 54

Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Arg
1 5 10

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 55

Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Arg Ser
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 56

Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Arg Ser Glu
1 5 10

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 57

Met Lys Gln Glu Pro Val Arg Ser Glu Glu
1 5 10

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 58

Lys Gln Glu Pro Val Arg Ser Glu Glu Gly
1 5 10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 59

Gln Glu Pro Val Arg Ser Glu Glu Gly Arg
1 5 10

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 60

Glu Pro Val Arg Ser Glu Glu Gly Arg Asp
1 5 10

<210> 61
<211> 10

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 61

Pro Val Arg Ser Glu Glu Gly Arg Asp Met
1 5 10

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 62

Val Arg Ser Glu Glu Gly Arg Asp Met Ala
1 5 10

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 63

Arg Ser Glu Glu Gly Arg Asp Met Ala Asn
1 5 10

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 64

Ser Glu Glu Gly Arg Asp Met Ala Asn Arg
1 5 10

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 65

Glu Gly Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Ser
1 5 10

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 66

Gly Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Ser Ala
1 5 10

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 67

Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Ser Ala Phe
1 5 10

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 68

Asp Met Ala Asn Arg Ile Ser Ala Phe Gly
1 5 10

<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 69

Met Ala Asn Arg Ile Ser Ala Phe Gly Tyr
1 5 10

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 70

Asn Arg Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Leu
1 5

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 71

Asn Arg Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Leu Glu
1 5 10

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 72

Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Leu Glu Cys

1 5

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 73

Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Leu Glu Cys Ser
1 5 10

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 74

Ala Phe Gly Tyr Leu Glu Cys Ser Ala
1 5

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 75

Ala Phe Gly Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Lys
1 5 10

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 76

Phe Gly Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Lys Thr
1 5 10

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 77

Gly Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Lys Thr Lys
1 5 10

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 78

Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Lys Thr Lys Glu
1 5 10

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 79

Leu Glu Cys Ser Ala Lys Thr Lys Glu Gly
1 5 10

<210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 80

Glu Cys Ser Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val
1 5 10

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 81

Cys Ser Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg
1 5 10

<210> 82
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 82

Ser Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu
1 5 10

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 83

Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 84

Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val Phe
1 5

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 85

Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val Phe Glu
1 5 10

<210> 86
<211> 10
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 86

Lys Glu Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met
1 5 10

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 87

Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala
1 5

<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 88

Glu Val Phe Glu Met Ala Thr Arg Ala Gly
1 5 10

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 89

Val Phe Glu Met Ala Thr Arg Ala Gly Leu
1 5 10

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 90

Phe Glu Met Ala Thr Arg Ala Gly Leu Gln
1 5 10

<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 91

Glu Met Ala Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val
1 5 10

<210> 92
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 92

Met Ala Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg
1 5 10

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 93

Ala Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys
1 5 10

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 94

Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn
1 5 10

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 95

Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys
1 5 10

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 96

Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg
1 5 10

<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 97

Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg
1 5 10

<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 98

Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 99

Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 100

Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys
1 5 10

<210> 101
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 101

Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro
1 5 10

<210> 102
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 102

Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro Ile
1 5 10

<210> 103

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 103

Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro Ile Leu
1 5 10

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 104

Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Ile
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 105

Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Ile Ala
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 106

Thr Val Phe Glu Asn Tyr Ile Ala Asp
1 5

<210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 107

Val Phe Glu Asn Tyr Ile Ala Asp Ile
1 5

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 108

Phe Glu Asn Tyr Ile Ala Asp Ile Glu
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 109

Glu Asn Tyr Ile Ala Asp Ile Glu Val
1 5

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 110

Asn Tyr Ile Ala Asp Ile Glu Val Asp
1 5

<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 111

Tyr Ile Ala Asp Ile Glu Val Asp Gly
1 5

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 112

Ile Ala Asp Ile Glu Val Asp Gly Lys
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 113

Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Gln
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 114

Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Gln Asp
1 5

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 115

Asn Lys Lys Asp Leu Arg Gln Asp Glu
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 116

Lys Lys Asp Leu Arg Gln Asp Glu His
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 117

Lys Asp Leu Arg Gln Asp Glu His Thr
1 5

<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 118

Lys Leu Arg Gln Asp Glu His Thr Arg
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 119

Leu Arg Gln Asp Glu His Thr Arg Arg
1 5

<210> 120

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 120

Arg Gln Asp Glu His Thr Arg Arg Glu
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 121

Gln Asp Glu His Thr Arg Arg Glu Leu
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 122

Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Arg
1 5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 123

Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Arg Ser
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 124

Met Lys Gln Glu Pro Val Arg Ser Glu
1 5

<210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 125

Lys Gln Glu Pro Val Arg Ser Glu Glu
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 126

Gln Glu Pro Val Arg Ser Glu Glu Gly
1 5

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 127

Glu Pro Val Arg Ser Glu Glu Gly Arg
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 128

Pro Val Arg Ser Glu Glu Gly Arg Asp
1 5

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 129

Val Arg Ser Glu Glu Gly Arg Asp Met
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 130

Arg Ser Glu Glu Gly Arg Asp Met Ala
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 131

Ser Glu Glu Gly Arg Asp Met Ala Asn
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 132

Gly Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Ser
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 133

Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Ser Ala
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 134

Asp Met Ala Asn Arg Ile Ser Ala Phe
1 5

<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 135

Met Ala Asn Arg Ile Ser Ala Phe Gly
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 136

Ala Asn Arg Ile Ser Ala Phe Gly Tyr
1 5

<210> 137
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 137

Asn Arg Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Leu
1 5

<210> 138
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 138

Arg Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Leu Glu
1 5

<210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 139

Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Leu Glu Cys
1 5

<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 140

Ser Ala Phe Gly Tyr Leu Glu Cys Ser
1 5

<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 141

Ala Phe Gly Tyr Leu Glu Cys Ser Ala
1 5

<210> 142
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 142

Phe Gly Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Lys
1 5

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 143

Gly Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Lys Thr
1 5

<210> 144
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 144

Gly Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Lys Thr Lys
1 5 10

<210> 145

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 145

Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Lys Thr Lys Glu
1 5 10

<210> 146
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 146

Leu Glu Cys Ser Ala Lys Thr Lys Glu Gly
1 5 10

<210> 147
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 147

Glu Cys Ser Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val
1 5 10

<210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 148

Cys Ser Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg
1 5 10

<210> 149
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 149

Ser Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu
1 5 10

<210> 150
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 150

Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val
1 5

<210> 151
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 151

Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val Phe
1 5 10

<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 152

Lys Glu Gly Val Arg Glu Val Phe Glu
1 5

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 153

Glu Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met
1 5

<210> 154
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 154

Val Phe Glu Met Ala Thr Arg Ala Gly
1 5

<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 155

Phe Glu Met Ala Thr Arg Ala Gly Leu
1 5

<210> 156
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 156

Phe Glu Met Ala Thr Arg Ala Gly Leu Gln
1 5 10

<210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 157

Met Ala Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val
1 5

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 158

Ala Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg
1 5

<210> 159
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 159

Thr Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys
1 5

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 160

Arg Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn
1 5

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 161

Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys
1 5

<210> 162

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 162

Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg
1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 163

Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 164

Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg
1 5

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 165

Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 166

Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys
1 5

<210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 167

Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro
1 5

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 168

Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro Ile
1 5

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 169

Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro Ile Leu
1 5

<210> 170
<211> 10
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 170

Asp Lys Leu Arg Gln Asp Glu His Thr Arg
1 5 10

<210> 171
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 171

Arg Gln Asp Glu His Thr Arg Arg Glu Leu
1 5 10

<210> 172
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 172

Gln Asp Glu His Thr Arg Arg Glu Leu Ala
1 5 10

<210> 173
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 173

Ala Asn Arg Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Leu
1 5 10

<210> 174
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 174

Arg Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Leu Glu Cys
1 5 10

<210> 175
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 175

Ser Ala Phe Gly Tyr Leu Glu Cys Ser Ala
1 5 10

<210> 176
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 176

Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val
1 5 10

<210> 177
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 177

Glu Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna capaz de provocar una respuesta inmune contra un cáncer metastásico que expresa RhoC de la SEQ ID no 1 cuando se administra a un individuo que padece un cáncer metastásico que expresa RhoC, comprendiendo dicha composición de vacuna

a) RhoC de la SEQ ID no 1 o un homólogo funcional del mismo que tiene al menos un 92 % de identidad con la SEQ ID NO 1 o un fragmento peptídico inmunogénicamente activo que comprende una secuencia consecutiva de dicho RhoC de la SEQ ID no. 1 o un ácido nucleico que codifica dicho RhoC o dicho fragmento peptídico; donde el fragmento peptídico comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 8 a 60 aminoácidos de RhoC de la SEQ ID no 1, donde se han sustituido como mucho tres aminoácidos de la SEQ ID no. 1, y que es diferente de las secuencias de RhoA de la SEQ ID NO 2 y RhoB de la SEQ ID NO 3 por al menos un aminoácido, y

b) un adyuvante para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer metastásico que expresa RhoC.

2. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, donde el fragmento peptídico comprende una secuencia consecutiva en el intervalo de 8 a 50 aminoácidos de RhoC de la SEQ ID no 1.

3. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho fragmento peptídico inmunogénicamente activo consiste en una secuencia consecutiva en el intervalo de 8 a 50, preferiblemente en el intervalo de 9 a 25 aminoácidos de dicho RhoC de la SEQ ID no 1 donde se han sustituido como mucho dos aminoácidos.

4. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el fragmento peptídico consiste en como mucho 60 residuos aminoácidicos, tal como 50 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 45 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 40 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 35 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 30 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 25 residuos aminoácidicos, tal como 15 a 20 residuos aminoacídicos.

5. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el fragmento peptídico consiste en como mucho 20 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 19 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 18 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 17 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 16 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 15 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 14 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 13 residuos aminoácidicos, tal como a lo sumo 12 residuos aminoácidicos, por ejemplo, como mucho 11 residuos aminoácidicos, tal como 8 a 10 residuos aminoacídicos.

6. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el fragmento peptídico consiste en una secuencia consecutiva de RhoC de la SEQ ID NO 1 en el intervalo de 8 a 60 aminoácidos, preferiblemente en el intervalo de 8 a 20 aminoácidos, donde se ha sustituido como mucho uno aminoácido, preferiblemente la sustitución es conservativa.

7. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la vacuna provoca la producción en un paciente vacunado de linfocitos T efectores que tiene un efecto citotóxico contra las células cancerosas.

8. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición de vacuna es capaz de provocar una respuesta clínica en un sujeto, donde la respuesta clínica está **caracterizada por** una enfermedad estable, una respuesta parcial o una remisión completa.

9. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un fragmento de proteína o peptídico inmunógeno seleccionado de un fragmento de proteína o peptídico, que no es RhoC.

10. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en adyuvantes a base de ADN bacteriano, adyuvantes a base de aceite/tensioactivo, adyuvantes a base de dsRNA vírico e imidazoquinilinas.

11. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la

composición de vacuna comprende células que presentan antígeno que comprenden el fragmento peptídico inmunogénicamente activo o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento peptídico inmunogénicamente activo.

12. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, donde el ácido nucleico está comprendido dentro de un vector.

13. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 12, donde el vector comprende además ácidos nucleicos que codifican un polipéptido estimulador de linfocitos T.

14. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el fragmento peptídico contiene al menos uno de los residuos aminoacídicos 143, Q123, R140, S141, S152, L157, E165, G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o 1192 de RhoC de la SEQ ID NO 1.

15. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el fragmento peptídico contiene al menos uno de los 20 residuos aminoacídicos específicos de RhoC más C-terminales G178, V181, K183, N184, R186, R187, R188, P191 o I192 de RhoC de la SEQ ID no 1.

16. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 15, donde el fragmento peptídico consiste en los 20 residuos aminoacídicos más C-terminales de RhoC de la SEQ ID NO. 1, siendo dichos 20 residuos aminoacídicos más C-terminales de RhoC ATRAGLQVRKNKRRRGCPIL (SEQ ID NO. 4).

17. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la secuencia RXGLQVRKNK, donde X se selecciona del grupo que consiste en alanina y leucina, y donde dicho fragmento peptídico tiene como mucho 60 aminoácidos de longitud.

18. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el fragmento peptídico es capaz de provocar una respuesta inmune celular en un paciente de cáncer.

19. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el fragmento peptídico es un péptido restringido a la Clase I de MHC o un péptido restringido a la Clase II de MHC que tiene al menos una de las siguientes características:

(i) capaz de provocar células productoras de INF-γ en una población PBL de un paciente de cáncer a una frecuencia de al menos 1 por 10_4 PBL según se determina por un ensayo ELISPOT, y/o
(ii) capaz de detectar *in situ* en un tejido tumoral de CTL que son reactivos con el péptido de epítopo.
(iii) capaz de inducir el crecimiento de linfocitos T específicos de RhoC in vitro.

20. Un kit de piezas que comprende la composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un agente anti-cáncer adicional para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer metastásico que expresa RhoC.

21. El kit de piezas de acuerdo con la reivindicación 20, donde el agente anti-cáncer adicional se selecciona del grupo que consiste en agentes usados en quimioterapia, agentes usados en terapia génica, sustancias inmunoestimuladoras, citocinas y anticuerpos.

22. El kit de piezas de acuerdo con la reivindicación 21, donde
la citocina se selecciona del grupo que consiste en GM-CSF, IFN de tipo I, interleucina 12 e interleucina 15;
el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-CD40 y anti-CTLA-4; o
la sustancia de inmunoestimulación es una E3 ubiquitina ligasa.

Fig. 1

```
CLUSTAL W (1,83) múltiple alineamiento de secuencias


P61586|RHOA_HUMAN      MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDT 60
P08134|RHOC_HUMAN      MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYIADIEVDGKQVELALWDT 60
P62745|RHOB_HUMAN      MAAIRKKLVVVGDGACGKTCLLIVFSKDEFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDT 60
                       *********:******************:*************:*****************

P61586|RHOA_HUMAN      AGQEDYDRLRPLSYPDTDVILMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKKD 120
P08134|RHOC_HUMAN      AGQEDYDRLRPLSYPDTDVILMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKKD 120
P62745|RHOB_HUMAN      AGQEDYDRLRPLSYPDTDVILMCFSVDSPDSLENIPEKWVPEVKHFCPNVPIILVANKKD 120
                       *************************:*************.***************.****

P61586|RHOA_HUMAN      LRNDEHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQ 180
P08134|RHOC_HUMAN      LRQDEHTRRELAKMKQEPVRSEEGRDMANRISAFGYLECSAKTKEGVREVFEMATRAGLQ 180
P62745|RHOB_HUMAN      LRSDEHVRTELARMKQEPVRTDDGRAMAVRIQAYDYLECSAKTKEGVREVFETATRAALQ 180
                       **.***.* ***:******:.::** ** ** *:.*:*******:******* ****.**

P61586|RHOA_HUMAN      ARRGKKK---SGCLVL 193
P08134|RHOC_HUMAN      VRKNKRR---RGCPIL 193
P62745|RHOB_HUMAN      KRYGSQNGCINCCKVL 196
                        * ..:.     * :*
```

Fig. 2

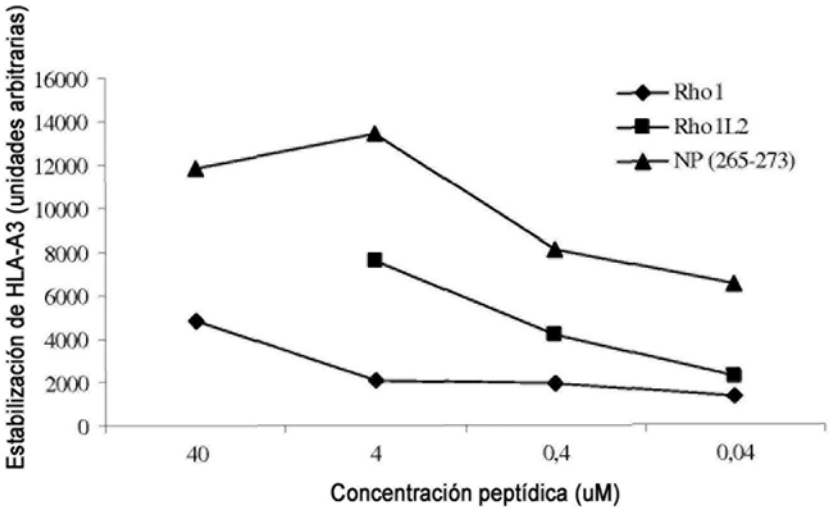

Estabilización de HLA-A3 (unidades arbitrarias)
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
40
4
0,4
0,04
Concentración peptídica (uM)
Rho1
Rho1L2
NP (265-273)

Fig. 3

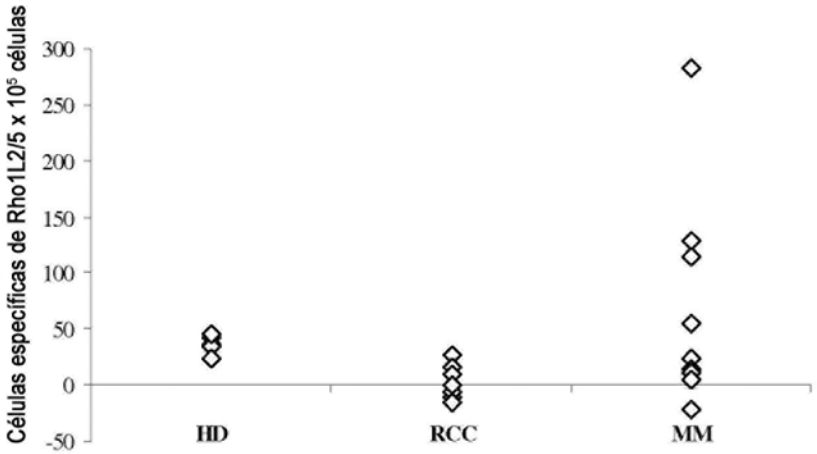

Células específicas de Rho1L2/5 x 10⁵ células
300
250
200
150
100
50
0
-50
HD
RCC
MM

Fig. 4

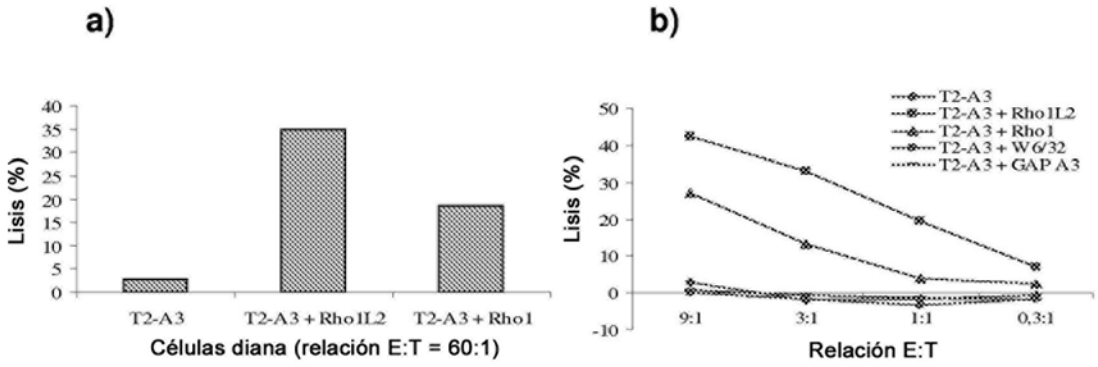
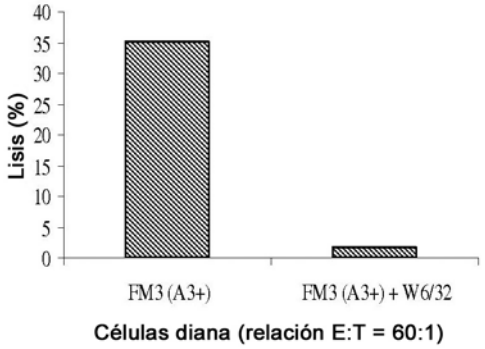
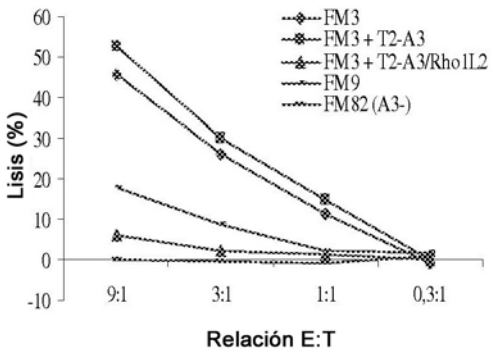

a)
b)
Lisis (%)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
T2-A3
T2-A3 + Rho1L2
T2-A3 + Rho1
Células diana (relación E:T = 60:1)
Lisis (%)
50
40
30
20
10
0
-10
9:1
3:1
1:1
0,3:1
Relación E:T
T2-A3
T2-A3 + Rho1L2
T2-A3 + Rho1
T2-A3 + W6/32
T2-A3 + GAP A3

Fig. 5

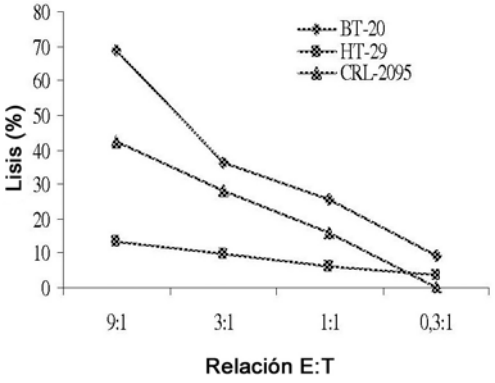
a)


Lisis (%)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
FM3 (A3+)
FM3 (A3+) + W6/32
Células diana (relación E:T = 60:1)

b)


Lisis (%)
60
50
40
30
20
10
0
-10
9:1
3:1
1:1
0,3:1
Relación E:T
FM3
FM3 + T2-A3
FM3 + T2-A3/Rho1L2
FM9
FM82 (A3-)

c)


Lisis (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
9:1
3:1
1:1
0,3:1
Relación E:T
BT-20
HT-29
CRL-2095