

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 123**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2008 PCT/JP2008/060381**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2009 WO09025116**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2008 E 08765194 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2192179**

54 Título: **Péptido CDH3 y agente medicinal que comprende el mismo**

30 Prioridad:

20.08.2007 JP 2007213999

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

11.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NISHIMURA, YASUHARU;
IMAI, KATSUNORI;
TSUNODA, TAKUYA y
NAKAMURA, YUSUKE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 632 123 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptido CDH3 y agente medicinal que comprende el mismo

Campo técnico

La presente invención se refiere a un péptido de los siguientes (A) o (B):

- 5 (A) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2;
- (B) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, en que uno o dos aminoácido(s) están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos, y en donde el péptido tiene actividad para inducir una célula T citotóxica (asesina).

10 La descripción se refiere, en general, a nuevos péptidos útiles como vacunas contra cánceres que expresan altamente P-cadherina (CDH3) tales como el cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon y cáncer de pulmón, y a agentes farmacéuticos que incluyen el péptido para el tratamiento y la prevención del cáncer.

Antecedentes de la Técnica

15 El cáncer de páncreas representa aproximadamente el 2 a 3% de todos los tumores malignos. Cada año, alrededor de 200.000 personas en todo el mundo mueren de cáncer de páncreas, y su número de muertes es el quinto más grande de los tumores malignos. En Japón, alrededor de 20.000 personas mueren anualmente. Los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de páncreas incluyen diabetes, pancreatitis crónica, tabaquismo, y similares, y también se ha informado que los antecedentes familiares son uno de los factores de riesgo. Se han hecho varios intentos de un diagnóstico precoz, incluyendo la mejora del diagnóstico por imagen; sin embargo, la mayoría de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas cuando muestran resistencia a la quimioterapia. Por lo tanto, su tasa de supervivencia a cinco años es de aproximadamente 9,7%, y sólo alrededor del 13%, incluso en los casos quirúrgicamente eliminados. El cáncer de páncreas resulta en el pronóstico más desfavorable entre los cánceres del sistema digestivo.

20 Debido a esta dificultad en el diagnóstico, hay un aumento gradual en la incidencia de cáncer de páncreas como causa de muerte por cáncer, especialmente en los países desarrollados. Aunque se están llevando a cabo tratamientos multidisciplinarios, principalmente la resección quirúrgica, y otros tratamientos tales como la radioterapia y la quimioterapia, éstos no han mejorado drásticamente los efectos terapéuticos, y se necesitan con urgencia nuevas estrategias terapéuticas.

30 El carcinoma colangiocelular supone aproximadamente el 10% de cáncer de hígado primario, y es el segundo cáncer más común tras el carcinoma hepatocelular. Muestra características clínicas pobres y, en muchos casos, el cáncer se detecta en fases avanzadas que acompañan a metástasis de ganglios linfáticos, metástasis intrahepática y similares. La tasa de supervivencia a cinco años es de aproximadamente 20% y es de un 35% en los casos quirúrgicamente eliminados, pero es muy pequeña, sólo del 7,4%, en los casos no eliminados quirúrgicamente.

35 Aunque la resección quirúrgica es la única terapia que se puede esperar que conduzca a una supervivencia a largo plazo, muchos pacientes ya no pueden ser operados en el momento de la detección (tasa de cirugía: 66%, tasa de resección no curativa: 20%). Tanto la sensibilidad a los fármacos anticancerígenos como la radiosensibilidad de los pacientes son bajas, y se ha deseado el establecimiento de una terapia para casos no operables, incluyendo los casos de resección no curativos.

40 En comparación con los países occidentales, la tasa de morbilidad del cáncer gástrico es alta en los países asiáticos tales como Japón y China. Una detección temprana de cáncer gástrico ha sido posible por la propagación de pruebas médicas, y el progreso de instrumentos endoscópicos del digestivo y técnicas de inspección, por lo tanto, disminuyendo por lo tanto el número de pacientes. Sin embargo, el cáncer gástrico sigue siendo la segunda causa principal de muerte en las neoplasias malignas entre los japoneses, y su tasa de causa de muerte sigue siendo alta.

45 El cáncer de colon es el segundo cáncer más común en los países occidentales y es la tercera causa más común de muerte en las neoplasias malignas en Japón. El cáncer gástrico y el cáncer de colon son tratados principalmente por resección quirúrgica, y también por quimioterapia, radioterapia, y similares. La inmunoterapia que suprime el crecimiento del cáncer mediante la mejora de la inmunidad del paciente con cáncer contra el cáncer está atrayendo la atención como una nueva terapia para el cáncer metastásico y el cáncer no tratable, contra la cual es imposible la aplicación de las terapias previamente mencionadas.

50 El cáncer de pulmón está aumentando continuamente en los últimos años en todo el mundo, y en la actualidad aproximadamente un millón de personas mueren de cáncer de pulmón en un año. La muerte por cáncer de pulmón está aumentando continuamente, también en Japón, y se piensa que llegará a ser de 123.000 en 2015. Es la causa principal de muerte en las neoplasias malignas en Japón. Se cree que el número de pacientes aumentará a medida

que progrese el envejecimiento de la población. La detección temprana y el tratamiento temprano son importantes en el tratamiento del cáncer de pulmón. Sin embargo, recientemente se ha señalado que simples radiografías de tórax y el examen de esputo realizados en los controles de salud tienen deficientes efectos en la detección precoz del cáncer de pulmón, y no conducen a la reducción de las muertes por cáncer. Dado que se considera que el número de muertes por cáncer de pulmón aumenta de forma continua, el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica es un reto urgente.

Por otra parte, desarrollos recientes en biología molecular e inmunología tumoral han dilucidado que células T citotóxicas (asesinas) y células T auxiliares reconocen péptidos generados por la degradación de las proteínas que se expresan específica y altamente en células cancerosas y que se presentan en la superficie de las células cancerosas o células presentadoras de antígeno *vía* moléculas de HLA, y provocan una inmunorreacción que destruye las células cancerosas. Además, se han identificado muchas proteínas antigénicas tumorales y péptidos derivados de las mismas que estimulan inmunorreacciones de este tipo que atacan estos cánceres, y está ahora en progreso la aplicación clínica de inmunoterapias tumorales específicas para antígenos.

La molécula HLA clase I se expresa en la superficie de todas las células nucleadas del cuerpo. Se expresa en la superficie de las células mediante la unión a péptidos generados por degradación intracelular de proteínas producidas en el citoplasma o en el núcleo. En la superficie de una célula normal, péptidos derivados de sus proteínas normales se unen a las moléculas HLA clase I, y las células T del sistema inmunológico no las identificarán para destruir la célula. Por otro lado, en el proceso de cancerización, las células cancerosas expresan a veces una gran cantidad de proteínas que apenas se expresan o se expresan de forma muy ligera en las células normales. Cuando las moléculas HLA clase I se unen a péptidos generados por la degradación intracelular de proteínas específica y altamente expresadas en células cancerosas y, a continuación, se expresan en la superficie de células cancerosas, las células T asesinas las reconocerán y destruirán sólo las células cancerosas. Además de ello, mediante la administración de tales antígenos o péptidos específicos para el cáncer a un individuo, se puede inducir una respuesta inmunológica que destruye las células cancerosas y suprime el crecimiento del cáncer, sin dañar las células normales. Esto se denomina inmunoterapia del cáncer utilizando antígenos específicos para el cáncer. Moléculas de HLA clase II se expresan principalmente en la superficie de células presentadoras de antígenos. Moléculas de HLA clase II se unen a péptidos derivados de antígenos específicos del cáncer, que se generan por la degradación intracelular de antígenos específicos para el cáncer incorporados en células presentadoras de antígenos desde el exterior de las células, y luego se expresan en la superficie de la célula. Son activadas células T auxiliares que las han reconocido e inducen o potencian una reacción inmunológica contra tumores mediante la producción de diversas citoquinas que activan a otras células inmunocompetentes.

Por consiguiente, si se desarrolla una inmunoterapia que se fije como objetivo antígeno específica y altamente expresados en estos cánceres, una terapia de este tipo puede eliminar de manera eficaz sólo los cánceres, sin provocar evento perjudicial alguno en los propios órganos normales de una persona. También se espera que la terapia pueda ser utilizada para cualquier paciente con cáncer terminal a la que no se deben aplicar otros tratamientos. Además, mediante la administración de un antígeno específico para el cáncer y el péptido como vacuna por adelantado a las personas con un alto riesgo de desarrollar dichos cánceres, se puede prevenir el desarrollo del cáncer.

Aunque existen diversas terapias para el cáncer de páncreas, el pronóstico del cáncer es muy pobre en comparación con otros tipos de cáncer. Esto se debe a que el cáncer de páncreas es difícil de detectar en una fase forma temprana, progresa rápidamente y, por lo tanto, se detecta a menudo sólo en etapas muy avanzadas. Aunque la extirpación quirúrgica es la cura radical más prometedora en la actualidad, los casos extirpados son sólo aproximadamente el 20% del número total. La cirugía de páncreas también es altamente invasiva, y los casos avanzados muestran un mal pronóstico, incluso después de la extirpación quirúrgica. Casos no eliminables son tratados por quimioterapia que principalmente utiliza gemcitabina y radioterapia. Sin embargo, muchos casos muestran resistencia al tratamiento y tienen pocos efectos citorreductores, lo cual es una de las razones por las que el cáncer de páncreas no se puede tratar. Por consiguiente, si se desarrolla una inmunoterapia dirigida a un antígeno que es específica y altamente expresada en el cáncer de páncreas, una terapia de este tipo puede eliminar efectivamente sólo el cáncer sin provocar evento perjudicial alguno en los propios órganos normales de una persona. También se espera que sea una terapia que puede ser aplicado para cualquier paciente con cáncer terminal. Además, ya que el cáncer de páncreas reaparece a menudo poco después de la extirpación, también se espera que la terapia sea útil como una terapia adyuvante postoperatoria.

Con anterioridad se realizó un análisis de la expresión de genes en todo el genoma de 27.648 genes humanos mediante análisis del chip de ADNc para examinar sus perfiles de expresión en 16 casos de cáncer de páncreas, órganos fetales y diversos órganos normales adultos. Como resultado, se descubrió que P-cadherina (CDH3) estaba altamente expresada en muchos cánceres de páncreas, mientras que apenas se expresaba en órganos normales adultos. Además, se observó que CDH3 también se expresaba altamente en la mayoría de los casos de carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer testicular, cáncer cervical, osteosarcoma, sarcoma de tejido blando, y similares. Este hecho sugiere que CDH3 puede ser un antígeno específico para el cáncer en muchos tipos de cáncer.

5 HLA-A2 se observa con frecuencia en poblaciones humanas, independientemente de la raza, y alrededor del 30% de los japoneses portan HLA-A2. Por lo tanto, si se puede identificar un péptido presentado a células T asesinas por parte de HLA-A2, se puede aplicar ampliamente no sólo los japoneses, sino también a los caucásicos occidentales y similares. Por consiguiente, la identificación de péptidos antigénicos del cáncer presentados a células T asesinas por HLA-A2 es una tarea importante. Puede ser muy beneficioso para aplicar dichos péptidos antigénicos del cáncer a la inmunoterapia para el cáncer de pulmón, cuya morbilidad y mortalidad son altas en todo el mundo.

Se muestra a continuación información de documentos de la técnica anterior relevante para la invención de la presente solicitud:

- [Documento no de Patente 1] Nakamura, T., *et al.*, Oncogene 23: 2385-2400 (2004)
- 10 [Documento no de patente 2] Obama, K., *et al.*, Hepatology 41: 1339-1348 (2005)
- [Documento no de patente 3] Taniuchi, K., *et al.*, Cancer Res. 65: 3092-3099 (2005)
- [Documento no de patente 4] Soler, A.P., *et al.*, Cancer 86: 1263-1272 (1999)
- [Documento no de patente 5] Paredes, J., *et al.*, Clin Cancer Res. 11: 5869-5877 (2005)
- [Documento no de patente 6] Ingunn, M., *et al.*, J Clin Oncol. 22: 1242-1252 (2004)
- 15 [Documento no de patente 7] Glenn, L., *et al.*, J Cell Biol 139: 1025-1032 (1997)
- [Documento no de patente 8] Bauer, R., *et al.*, Exp. Mol. Pathol. 81: 224-230 (2006)
- [Documento no de patente 9] Muzon-Guerra, M.F., *et al.*, Cancer 103: 960-969 (2005)
- [Documento no de patente 10] Marck, V.V., *et al.*, Cancer Res. 65: 8774-8783 (2005)

Descripción de la invención

20 [Problemas a resolver por la invención]

Un objetivo a ser alcanzado por la invención es el desarrollo de medios para realizar una inmunoterapia que suprime el crecimiento del cáncer mejorando la inmunidad de pacientes con cáncer contra el cáncer, como una nueva terapia para cánceres metastásicos o inabordables que son difíciles de ser tratados por tratamientos quirúrgicos, quimioterapia y radioterapia, que se utilizan para tratar el cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células no pequeñas, y similares. La invención proporciona péptidos identificados que se derivan de proteínas específica y altamente expresadas en cánceres y se presentan a células T asesinas por HLA-A2. Esto permite que se pueda aplicar una inmunoterapia a aproximadamente un 30% de los pacientes japoneses con diversos tipos de cáncer que expresan altamente CDH3.

25

[Medios para Resolver los Problemas]

30 CDH3 (GenBank nº de acceso NM_001793) fue identificado como un gen altamente expresado en el cáncer de páncreas, por análisis del chip de ADNc de los tejidos de cáncer de páncreas. Con el fin de examinar si o no la inmunidad antitumoral es inducida por células T asesinas específicas para CDH3, se utilizaron ratones transgénicos HLA-A2 que expresan HLA-A2, que es portado por aproximadamente el 30% de los japoneses. Específicamente, ratones transgénicos HLA-A2 fueron inmunizados con células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón pulsadas con un péptido CDH3 humano que tiene un motivo de unión a HLA-A2 para examinar si serían inducidas células T asesinas específicas para péptidos restringidas en HLA-A2. El método ELISPOT se utilizó para detectar γ -interferón (IFN- γ) producido por células T asesinas que habían sido activadas mediante el reconocimiento del péptido presentado por HLA-A2 y, con ello, examinar si se indujeron o no células T asesinas específicas para el péptido CDH3 en células de bazo de los ratones inmunizados. Como resultado, se identificaron dos nuevos péptidos CDH3 aplicables a la inmunoterapia para pacientes con cáncer HLA-A2 positivo. Además, se reveló que CTLs que responden a CDH3 inducidas por el uso de estos péptidos tenían citotoxicidad específica para las células cancerosas que expresan moléculas de CDH3 y HLA-A2 endógenas, y que los CTLs reconocían a las células diana de una manera restringida a HLA clase I. Además, también se reveló que el crecimiento de tumores trasplantados a ratones NOD/SCID se suprimió significativamente por la inyección intravenosa de células CD8 positivas inducidas por los péptidos (método de inmunidad adoptiva CTL).

35

40

45

Más específicamente, la presente invención proporciona:

- (1) Un péptido de los siguientes (A) o (B):

- (A) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2;
- (B) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, en que uno o dos aminoácido(s) están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos, y en donde el péptido tiene actividad para inducir una célula T citotóxica (asesina).
- 5 (2) El péptido de (1), en donde dicho péptido es de los siguientes (A) o (B):
- (A) dicho péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2;
- (B) dicho péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, en que uno o dos aminoácido(s) están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos, y en donde el péptido tiene actividad para inducir una célula T citotóxica (asesina).
- 10 (3) El péptido de (1) o (2), en donde el segundo aminoácido del extremo N es leucina o metionina.
- (4) El péptido de (1) o (2), en donde el aminoácido C-terminal es valina o leucina.
- (5) Un agente para uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que comprende uno o más péptido(s) de uno cualquiera de (1) a (4) como ingrediente activo.
- 15 (6) Un agente farmacéutico que comprende uno o más péptidos(s) de uno cualquiera de (1) a (4) o un polinucleótido(s) que codifica dichos péptidos como un ingrediente activo.
- (7) Un anticuerpo contra el péptido de (2).
- (8) Una célula T citotóxica (asesina), o un grupo de inmunocitos que comprende la célula, que es inducida al utilizar el péptido de uno cualquiera de (1) a (4).
- 20 (9) Una célula presentadora de antígenos que presenta un complejo que comprende el péptido de uno cualquiera de (1) a (4) y un antígeno HLA.
- (10) Un exosoma que presenta un complejo que comprende el péptido de uno cualquiera de (1) a (4) y un antígeno HLA.
- (11) El exosoma de (10), en donde el antígeno HLA es HLA-A2 (HLA-A*0201).
- 25 (12) Un método in-vitro para inducir una célula presentadora de antígeno que tiene actividad inductora de células T citotóxicas (asesinas), que comprende una etapa de
- (a) poner en contacto una célula presentadora de antígenos con el péptido de uno cualquiera de (1) a (4); o
- (b) transfectar un polinucleótido que codifica el péptido de uno cualquiera de (1) a (4) en una célula presentadora de antígenos.
- 30 (13) La célula presentadora de antígenos de (9), que es inducida por el método de (12).
- (14) Un método in-vitro para inducir una célula T citotóxica (asesina), que comprende una etapa de
- (a) poner en contacto una célula T con el péptido de uno cualquiera de (1) a (4); o
- (b) co-cultivar una célula presentadora de antígenos puesta en contacto con el péptido de uno cualquiera de (1) a (4) con una célula T CD8⁺.
- 35 (15) La célula presentadora de antígenos que tiene actividad inductora de células T citotóxicas (asesinas) según se obtiene por el método de (12) o la célula T citotóxica (asesina) según se obtiene por el método de (14) para uso en el tratamiento del cáncer.

Breve Descripción de los Dibujos

La Fig. 1 muestra el protocolo para la identificación de péptidos CDH3 reconocidos por las células T asesinas restringidas en HLA-A2. (El día en que se aislaron células del bazo de ratones inmunizados se establece como "Día 0").

5 La Fig. 2 representa un gráfico que muestra el resultado del ensayo ELISPOT para 18 péptidos CDH3. El ensayo ELISPOT se utilizó para examinar si las células T asesinas obtenidas de ratones inmunizados podrían reaccionar específicamente con células pulsadas con péptidos CDH3 y producir IFN- γ . Las células T asesinas inducidas con CDH3-4 o péptido CDH3-7 reconocen específicamente BM-DCs pulsadas con péptidos CDH3 y produjeron IFN- γ ; sin embargo, células T asesinas inducidas con otros péptidos no exhibieron respuesta inmunológica de CTL específica para CDH3. Por lo tanto, se confirmó que los péptidos CDH3-4 y CDH3-7 eran péptidos de epítomos capaces de inducir células T asesinas restringidas en HLA-A2, específicas para CDH3. Los números de péptidos CDH3 mostrados en la Figura 2 corresponden a los números de péptidos que se muestran en la columna "Posiciones de Péptidos" de la Tabla 2, y no a las SEQ ID NOs descritas en esta memoria.

15 La Fig. 3 representa las fotografías que muestran los resultados del ensayo ELISPOT que detecta IFN- γ producido a partir de las células T asesinas activadas a través del reconocimiento específico de péptidos CDH3. Células de bazo CD4-negativas mostraron $283,7 \pm 40,0$ puntos/pocillo, en respuesta a BM-DC pulsados con el péptido CDH3-4₆₅₅₋₆₆₃ (a la izquierda en A y superior en B), mientras que mostraron $48,7 \pm 11,9$ puntos/pocillo en respuesta a BM-DCs sin péptido pulsante (a la derecha en A y fila inferior en B) ($P < 0,05$). De manera similar, células de bazo CD4 negativas mostraron $79,3 \pm 3,2$ puntos/pocillo, en respuesta a BM-DCs pulsados con el péptido CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ (fila superior en C), mientras que mostraron $42,7 \pm 2,5$ puntos/pocillo, en respuesta a BM-DCs sin péptido pulsante (fila inferior en C) ($P < 0,05$). El ensayo se llevó a cabo dos veces y dio los mismos resultados.

25 La Fig. 4 representa los gráficos de líneas que muestran el resultado de la inducción de CTLs humanas específicas para CDH3 a partir de PBMCs de donantes sanos HLA-A2 positivos y pacientes con cáncer. A: CTLs reactivos a péptido CDH3 fueron inducidas a partir de PBMCs de donantes sanos HLA-A2 positivos. Después de la estimulación durante tres veces con DCs derivadas de monocitos autólogas pulsadas con péptido CDH3-4₆₅₅₋₆₆₃ (superior) o CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ (inferior), la citotoxicidad frente a células T2 (HLA-A2 positivas, deficientes en TAP) pulsada o no pulsada con cada uno de los péptidos fue evaluada por el ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar. Los CTLs mostraron citotoxicidad para células T2 pulsadas con péptidos CDH3-4₆₅₅₋₆₆₃ (superior) o CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ (inferior), pero no a células T2 no pulsadas con péptidos. B: Los CTLs mostraron citotoxicidad para la línea celular de cáncer de colon humano HCT116 CDH3⁺ HLA-A2⁺, y línea celular de cáncer escamoso oral de HSC3, así como a PANC1/CDH3, que es una línea celular de cáncer pancreático humano PANC1 CDH3⁻ HLA-A2⁺ transformada con el gen *CDH3*. Sin embargo, los CTLs no exhibieron citotoxicidad para la línea celular de cáncer de hígado humano SKHep1, PANC1 CDH3⁻ HLA-A2⁺ y la línea celular de cáncer pancreático humano PK8 CDH3⁺ HLA-A2⁻. C: CTLs reactivos con CDH3 inducidas a partir de PBMCs de pacientes de cáncer pancreático (PC) HLA-A2 positivas y pacientes de cáncer gástrico (GC) exhibían citotoxicidad para HCT116 y PANC1/CDH3, pero no para PANC1 y PK8. D: se muestra la inhibición de la citotoxicidad por parte del mAb anti-HLA clase I. Después de incubar células diana, SKHep1/CDH3 y HSC3, con mAb anti-HLA clase I (W6/32, IgG_{2a}) o anti-HLA-DR mAb (H-DR-1, IgG_{2a}) durante una hora, se añadieron CTLs inducidos a partir de PBMCs de donantes sanos estimulados con péptido CDH3-4₆₅₅₋₆₆₃ (izquierda, centro) o CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ (derecha). La producción de IFN- γ (izquierda y derecha, IFN- γ ensayo ELISPOT) y la citotoxicidad (centro, ensayo de liberación de ⁵¹Cr) fue acusadamente inhibida por W6/32, pero no por H-DR-1.

40 La Fig. 5 representa la actividad antitumoral *in vivo* de CTLs humanos inducidos por CDH3 contra células cancerosas humanas trasplantadas en ratones NOD/SCID. A: Inhibición del crecimiento de una línea celular de cáncer colorrectal humano, HCT116 (CDH3⁺, HLA-A2⁺), injertada en ratones NOD/SCID después de la transferencia de CTL. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 25 mm² el día 7 después de la implantación subcutánea del tumor, CTLs humanas reactivas al péptido CDH3-4₆₅₅₋₆₆₃ (□) y al péptido CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ (■) se inocularon por vía intravenosa. El día 14, los CTLs se inocularon de nuevo de la misma manera. Las células T CD8⁺ control estimuladas con el péptido VIH restringido en HLA-A2 no mostraron citotoxicidad (◇). Se muestran los volúmenes de los tumores en ratones NOD/SCID que recibieron dos administraciones de CTLs reactivos con CDH3 (n = 7), células T control CD8⁺ (n = 7) o PBS solo (○, n = 7) el día 7 y día 14. Los tamaños de los tumores se expresan en milímetros cuadrados. B: Se muestra el tamaño del tumor en cada uno de los grupos con \pm SD (n = 7).

50 Modo de Llevar a Cabo la Invención

Los términos "un", "una", y "el", "la", tal como se utilizan en esta memoria significan "al menos uno (una)" a menos que se indica específicamente de otro modo.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado comúnmente entendido por los expertos ordinarios en la técnica a la que pertenece la presente invención.

El péptido de acuerdo con la invención es un epítipo restringido por HLA-A2, que es un alelo HLA que se encuentra generalmente en poblaciones de japoneses y caucasianos. Específicamente, se seleccionaron candidatos de péptidos de unión a HLA-A2 derivados de CDH3 utilizando como un índice su afinidad de unión a HLA-A2. Los péptidos seleccionados fueron evaluados por la prueba de si se inducirían células T asesinas en el cuerpo del ratón transgénico HLA-A2 por parte de células dendríticas derivadas de las células de la médula ósea de ratón (BM-DCs) HLA-A2 transgénico pulsadas con un péptido seleccionado. Las células T asesinas fueron inducidas por CDH3-4 (FILPVLGAV (SEQ ID NO: 1)) y CDH3-7 (FIENLKAA (SEQ ID NO: 2)), en el cuerpo del ratón transgénico HLA-A2. Las células T asesinas inducidas por estos péptidos mostraron una respuesta inmune a BM-DCs a las que se añadieron estos péptidos. Sin embargo, estas células T asesinas no mostraron respuesta inmune alguna a BM-DCs a las que no se añadieron los péptidos. Estos resultados demuestran que los péptidos derivados de CDH3 son útiles como péptidos para inducir una reacción inmune contra células presentadoras de CDH3, y que los péptidos derivados de CDH3 son péptidos epítipos restringidos por HLA-A2. CDH3 fue altamente expresado en la mayoría de los casos con cánceres tales como cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer testicular, cáncer cervical, osteosarcoma y tumores de tejidos blandos. Esto indica que CDH3 es útil como una diana para la inmunoterapia en muchos tipos de cáncer.

(1) Péptidos de acuerdo con la invención y agentes para la inducción de inmunidad contra el cáncer que contiene estos péptidos

Un péptido de acuerdo con la invención es uno cualquiera de los siguientes péptidos:

(A) un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2;

(B) un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, en donde uno o dos aminoácido(s) están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos, y en donde el péptido tiene una actividad para inducir células T asesinas;

(C) el péptido de (B), en el que el segundo aminoácido desde el extremo N es leucina o metionina; y

(D) el péptido de (B), en el que el aminoácido C-terminal es valina o leucina.

Un péptido de acuerdo con la invención es un péptido de epítipo que tiene menos de 15 aminoácidos, que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 y que tiene la actividad para inducir células T asesinas. Alternativamente, el péptido de epítipo puede incluir un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, en donde uno o dos aminoácido(s) están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos, siempre y cuando se conserve la actividad para inducir células T asesinas. El número de residuos sustituido, suprimido, insertado y/o añadido es 1 aminoácido o 2 aminoácidos.

Se sabe que péptidos variantes (es decir, péptidos que incluyen secuencias de aminoácidos obtenidas mediante la alteración de las secuencias de aminoácidos originales por sustitución, delección, inserción y/o adición de uno o dos residuos aminoácidos) conservan actividades biológicas originales (Mark DF *et al.*, (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81: 5662-6; Zoller MJ y Smith M, (1982) Nucleic Acids Res 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland G *et al.*, (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79: 6409-13). Alteraciones de aminoácidos conservan preferiblemente propiedades de las cadenas laterales de aminoácidos originales. Ejemplos de propiedades de cadenas laterales de aminoácidos son aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrofílicos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: cadenas laterales alifáticas (G, A, V, L, I, P); cadenas laterales que contienen grupos hidroxilo (S, T, Y); cadenas laterales que contienen átomos de azufre (C, M); cadenas laterales que contienen ácidos carboxílicos y amidas (D, N, E, Q); cadenas laterales que contienen bases (R, K, H); y cadenas laterales que contienen compuestos aromáticos (H, F, Y, W), en donde los caracteres dentro de los paréntesis se refieren a los códigos de una letra de aminoácidos.

En una realización preferida, los péptidos de la invención (péptidos inmunogénicos) son nonapéptidos (9-meros) o decapeptidos (10-meros).

En esta memoria, un péptido que tiene actividad inductora de células T asesinas significa un péptido que tiene actividad inductora de células T que estimula las células T asesinas (células T citotóxicas/CTLs).

Con el fin de obtener péptidos con alta afinidad de unión y actividad inductora de células T asesinas, la secuencia de aminoácidos de un péptido parcial de CDH3 que se produce de forma natural puede ser alterada por sustitución, delección o adición de uno, dos o varios aminoácidos. Además, puesto que la regularidad en las secuencias de péptidos que tienen alta afinidad para antígenos HLA es conocida (Kubo RT, *et al.*, (1994) J. Immunol., 152:3913-24; Rammensee HG, *et al.*, (1995) Immunogenetics. 41: 178-228; Kondo A, *et al.* (1995) J. Immunol 155: 4307-12), los péptidos de la invención (péptidos de epítipo) pueden ser alterados con el fin de mejorar su afinidad por los antígenos HLA en base a la regularidad. Por ejemplo, péptidos con alta afinidad de unión a HLA-2 se pueden obtener reemplazando el segundo aminoácido desde el extremo N por leucina o metionina. De manera similar, los

péptidos con alta afinidad de unión a HLA-2 también se pueden obtener reemplazando el aminoácido C-terminal con valina o leucina.

5 Cuando la secuencia de un péptido de epítipo es la misma como una parte de una secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, se pueden provocar efectos secundarios tales como trastornos autoinmunes o síntomas de alergia contra una sustancia específica. A fin de evitar tales efectos secundarios, un péptido de epítipo alterado no debería ser idéntico a las secuencias de aminoácidos de proteínas conocidas. Para este propósito, es necesario llevar a cabo una búsqueda de homología utilizando bases de datos disponibles para confirmar que no existe proteína endógena o exógena con una función diferente que muestre una homología del 100% con el péptido de epítipo alterado. Mediante este proceso, se pueden evitar los riesgos provocados por la alteración de la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente para aumentar la afinidad de unión con el antígeno de HLA y/o para aumentar la actividad inductora de células T asesinas.

15 Aunque se espera que los péptidos descritos anteriormente tengan una afinidad de unión alta a los antígenos de HLA para ser altamente eficaces como vacunas contra el cáncer, los péptidos candidatos seleccionados utilizando la alta afinidad como un índice deben ser examinados para ver si en realidad tienen actividad inductora de células T asesinas. La actividad inductora de células T asesinas puede confirmarse por: induciendo células presentadoras de antígenos que tienen el antígeno MHC humano (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas), o más específicamente, induciendo células dendríticas derivadas de leucocitos mononucleares de la sangre periférica humana; estimulándolas con un péptido de interés; mezclándola después con células CD8 positivas; y midiendo la actividad citotóxica contra la célula diana. Como un sistema de reacción, se pueden utilizar animales transgénicos que expresan el antígeno HLA humano (tal como se describe, por ejemplo, en BenMohamed L, *et al.*, (2000) Hum. Immunol. 61 (8):764-79, Artículos Relacionados, Libros y Linkout). Por ejemplo, las células diana pueden ser radiomarcadas por ⁵¹Cr o similar, y la actividad citotóxica se puede calcular a partir de la radiactividad liberada de las células diana. Alternativamente, las células diana pueden ser examinados: midiendo IFN-γ producido y liberado de las células T asesinas en presencia del antígeno que presenta células que tienen el péptido inmovilizado; y visualizando la zona de producción de IFN-γ en el medio de cultivo utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ.

20 Tal como se muestra en los Ejemplos, el resultado del examen de la actividad inductora de células T asesinas de péptidos demostraron que los péptidos tienen alta afinidad de unión al antígeno HLA no tienen necesariamente una alta actividad inductora de células T asesinas. Sin embargo, los péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos de CDH3-4 (FILPVLGAV (SEQ ID NO: 1)) o CDH3-7 (FIENLKAA (SEQ ID NO: 2)) mostraron una actividad inductora de células T especialmente alta.

35 Tal como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona péptidos que tienen actividad inductora de células T asesinas, más específicamente, los péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, o variantes de los mismos (*es decir*, secuencias de aminoácidos en las que uno o dos aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos). Las secuencias de aminoácidos de péptidos que contienen los nueve aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, o variantes de los mismos no son preferiblemente idénticas a las de otras proteínas endógenas. Especialmente, péptidos con alta afinidad de unión a HLA-A2 se pueden obtener reemplazando el segundo aminoácido desde el extremo N por leucina o metionina, y/o reemplazando el aminoácido C-terminal por valina o leucina.

40 Los péptidos de la invención pueden incluir modificaciones tales como glicosilación, oxidación de la cadena lateral y fosforilación, a menos que los péptidos pierdan su actividad inductora de células T asesinas. Otras modificaciones incluyen, por ejemplo, D-aminoácidos u otros análogos de aminoácidos que pueden ser utilizados para aumentar la semi-vida en suero de los péptidos.

45 Métodos para obtener y fabricar los péptidos de la invención no están particularmente limitados. Pueden ser péptidos sintetizados químicamente o péptidos recombinantes producidos mediante la tecnología de recombinación de genes.

Péptidos sintetizados químicamente de la divulgación se pueden sintetizar de acuerdo con métodos de síntesis química tales como el método Fmoc (método de fluorenilmetiloxycarbonilo) y el método t-Boc (método de t-butiloxycarbonilo). Los péptidos de la presente invención también se pueden sintetizar utilizando diversos sintetizadores de péptidos disponibles comercialmente.

50 Los péptidos de la invención se pueden fabricar como proteínas recombinantes mediante la obtención de los ADNs que tienen las secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos, o variantes u homólogos de los mismos, y su introducción en un sistema de expresión adecuado.

55 Los vectores de expresión utilizados pueden ser preferiblemente cualquiera de los vectores que se pueden duplicar de forma autónoma en células huésped, o se pueden incorporar en un cromosoma de la célula huésped, y contienen un promotor en un locus adecuado para permitir la expresión de un gen que codifica el péptido. Transformantes que

tienen un gen que codifica el péptido de la divulgación se pueden producir introduciendo el vector de expresión anteriormente mencionado en el huésped. El huésped puede ser cualquier de bacterias, levaduras, células animales y células de insectos, y la introducción del vector de expresión para el huésped puede llevarse a cabo utilizando cualesquiera técnicas conocidas, dependiendo del huésped.

- 5 En la presente divulgación, el péptido recombinante descrito en esta memoria puede aislarse cultivando el transformante producido tal como se describe anteriormente, produciendo y acumulando el péptido en el cultivo y recogiendo el péptido del cultivo.

10 Cuando el transformante es un procariota tal como *E. coli* o un eucariota tal como una levadura, el medio de cultivo para cultivar estos microorganismos puede ser un medio natural o un medio sintético, siempre que contenga una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales y similares que pueden ser utilizados por los microorganismos y permite el cultivo eficiente del transformante. Las condiciones de cultivo pueden ser las habitualmente utilizadas para el cultivo de microorganismos. Después del cultivo, el péptido de la presente invención puede ser aislado y purificado a partir del cultivo del transformante utilizando métodos convencionales para el aislamiento y la purificación de péptidos.

15 Péptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos o añadidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 se pueden producir u obtener de manera apropiada por una persona experta en la técnica basándose en la información en la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2. Específicamente, el gen que codifica un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos en la que se sustituyen, suprimen, insertan y/o añaden uno o dos aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 y tiene actividad inductora de células T asesinas, también puede ser producido por cualquier método conocido para una persona experta en la técnica tal como síntesis química, técnicas de ingeniería genética o mutagénesis. Por ejemplo, el método de mutagénesis dirigida al sitio, una de las técnicas de ingeniería genética, es útil porque puede introducir una mutación específica en una posición específica. Se puede llevar a cabo de acuerdo con los métodos descritos en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (en adelante abreviado como. Molecular Cloning 2ª Ed), Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 1-38, John Wiley & Sons (1987-1997) (en adelante abreviado como Current Protocols in Molecular Biology), y similares.

20 Los péptidos descritos anteriormente pueden inducir inmunidad contra el cáncer, como también se muestra más adelante en los Ejemplos. Por lo tanto, de acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan agentes para inducir inmunidad contra el cáncer que contiene los péptidos descritos en esta memoria. Los agentes para inducir inmunidad de la presente invención también se pueden preparar como una formulación mixta combinando dos o más péptidos de epítopos. Agentes para inducir inmunidad, formulados mediante la combinación de múltiples tipos de péptidos, puede ser un cóctel, o pueden estar mutuamente enlazados utilizando técnicas estándares. Los péptidos de epítipo a ser combinados pueden ser péptidos que tienen diferentes secuencias de aminoácidos derivadas del mismo gen, o pueden ser péptidos que tienen secuencias de aminoácidos derivadas de diferentes genes. Cuando los péptidos descritos en esta memoria se administran a un sujeto, los péptidos administrados están densamente presentes sobre antígenos HLA de células presentadoras de antígenos y, posteriormente, las células T asesinas, que reaccionan específicamente con los complejos formados entre los péptidos administrados y son inducidos los antígenos HLA. Alternativamente, poniendo en contacto células dendríticas recogidas de un sujeto con los péptidos descritos en esta memoria (o pulsando con los péptidos descritos en esta memoria células dendríticas recogidas de un sujeto), se pueden obtener células presentadoras de antígenos que presentan los péptidos descritos en esta memoria en sus superficies celulares. Mediante la administración de estos células presentadoras de antígenos de nuevo a cada uno de los sujetos, se pueden mejorar las células T asesinas se inducen en el cuerpo del sujeto, y como resultado, las respuestas de inmunidad a las células diana que presentan los péptidos de la presente invención.

45 Cuando se utilizan *in vitro* o *in vivo*, preferiblemente *in vitro*, los agentes para la inducción de inmunidad contra el cáncer de acuerdo con la presente invención pueden inducir a células T auxiliares, células T asesinas o grupos de inmunocitos que incluyen estas células, confiriendo con ello inmunidad contra el cáncer.

- 50 (2) Agentes farmacéuticos para tratar y/o prevenir el cáncer de acuerdo con la presente invención (vacunas contra el cáncer)

55 Se ha demostrado en los Ejemplos que los péptidos de la invención pueden inducir células T asesinas específicas para las células cancerosas *in vivo*. Además de ello, se ha demostrado que CDH3 fue altamente expresado en la mayoría de los casos tales como el cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer testicular, cáncer cervical, osteosarcoma, sarcoma de tejido blando, o similares. Por consiguiente, se espera que los agentes para inducir inmunidad incluyan los péptidos descritos en esta memoria sean eficaces como agentes para tratar y/o prevenir el cáncer. Es decir, inyectando los péptidos de la invención, junto con un adyuvante adecuado en el cuerpo, o después de pulsar con los péptidos las

5 células presentadoras de antígenos tales como células dendríticas, células T asesinas que atacan tumores son inducidas y activadas y, como resultado, pueden esperarse efectos antitumorales. Además, los genes que codifican los péptidos descritos en esta memoria se pueden incorporar en vectores adecuados. Células presentadoras de antígenos humanos (células dendríticas, etc.) y bacterias tales como BCG de *Mycobacterium tuberculosis* que son transformadas por el ADN recombinante, o virus tales como el virus vaccinia que tienen un ADN integrado en el genoma que codifica el péptido descrito en esta memoria, pueden ser eficazmente utilizados como vacunas vivas para tratar y/o prevenir el cáncer humano. Las dosificaciones y los métodos de administración de las vacunas contra el cáncer son los mismos que aquellos para vacunas contra la viruela habituales o vacunas de BCG.

10 En relación con la presente divulgación, el término "vacuna" (también denominada composición inmunogénica) se refiere a una sustancia que induce inmunidad antitumoral o suprime varios tipos de cáncer cuando se inyecta a un animal. De acuerdo con la invención, se sugirió que el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 es un péptido de epítipo restringido por HLA-A2 que puede inducir respuestas inmunes fuertes y específicas contra células presentadoras de CDH3. Por consiguiente, la divulgación también incluye métodos para inducir inmunidad antitumoral mediante el uso de los péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, o variantes del mismo que incluyen sustituciones, deleciones o adiciones de uno o dos aminoácidos. En general, la inmunidad antitumoral incluye las siguientes respuestas inmunes:

- (1) inducción de células T asesinas contra los tumores contienen células que expresan CDH3;
- (2) inducción de anticuerpos que reconocen tumores que contienen células que expresan CDH3; y
- (3) inducción de la producción de citoquinas contra el cáncer.

20 Cuando un péptido particular induce una cualquiera de estas respuestas inmunológicas a través de la inoculación a un animal, se determina que ese péptido tiene un efecto inductor de la inmunidad antitumoral. La inducción de inmunidad antitumoral por el péptido se puede detectar mediante la observación de la respuesta *in vivo* o *in vitro* del sistema inmune al péptido en un huésped.

25 Por ejemplo, métodos para detectar la inducción de células T asesinas son bien conocidos. Una sustancia extraña que invade un cuerpo vivo es presentada a las células T y las células B por la acción de células presentadoras de antígeno (APC). Las células T que responden a antígenos presentados por células presentadoras de antígenos de una manera específica para el antígeno se diferencian en células T asesinas (también llamados linfocitos T citotóxicos o CTLs) a través de la estimulación por parte de antígenos, y luego proliferan. En esta memoria, a este proceso se le denomina "activación" de células T. La inducción de células T asesinas por un péptido específico se puede evaluar mediante la presentación del péptido en células T utilizando células presentadoras de antígenos pulsadas con péptidos, y luego detectando la inducción de células T asesinas. Además, las células presentadoras de antígenos tienen efectos de la activación de células T CD4⁺, células T CD8⁺, macrófagos, eosinófilos y células NK. Dado que las células T CD4⁺ son importantes en la inmunidad antitumoral, se puede evaluar el efecto inductor de inmunidad antitumoral del péptido utilizando los efectos de activación de estas células como indicadores.

35 Métodos para evaluar los efectos inductores de células T asesinas, en donde las células T asesinas son inducidas utilizando células dendríticas (DCs) como células presentadoras de antígenos son bien conocidos en la técnica. Entre las células presentadoras de antígenos, las DCs tienen el efecto inductor de células T asesinas más fuerte. Este método implica, poner en contacto primero un péptido de prueba con DCs, y luego poner en contacto las DCs con células T. Células T que tienen efectos citotóxicos sobre las células diana se detectan a partir de las células T puestas en contacto con las DCs. Si las células T muestran una actividad citotóxica contra las células diana, esto significa que el péptido de prueba tiene una actividad para inducir a las células T citotóxicas. La actividad de células T asesinas contra las células diana tales como las células tumorales puede detectarse, por ejemplo, utilizando la lisis de células tumorales marcadas con ⁵¹Cr como indicador. Alternativamente, el grado de daño de la célula tumoral puede evaluarse utilizando la actividad de captación de ³H-timidina o la liberación de lactosa deshidrogenasa (LDH) como un índice.

40 Péptidos de ensayo confirmados por estos métodos que tienen actividad inductora de células T asesinas son péptidos que tienen efectos activantes de DC y la posterior actividad inductora de células T asesinas. Por lo tanto, los péptidos que inducen las células T asesinas contra las células tumorales serán útiles como vacunas contra cánceres que presentan CDH3. Además, células presentadoras de antígenos que han adquirido una capacidad para inducir células T asesinas contra los cánceres a través del contacto con el péptido serán útiles como vacunas contra el cáncer. Adicionalmente, las células T asesinas que han adquirido citotoxicidad por la presentación de péptidos por células presentadoras de antígenos también se pueden utilizar como vacunas contra cánceres que presentan CDH3. El método para tratar el cáncer utilizando la inmunidad antitumoral por las células presentadoras de antígeno y las células T asesinas se denomina citoimmunoterapia.

55 En general, cuando se utilizan péptidos para la citoimmunoterapia, la eficiencia de la inducción de células T asesinas puede ser mejorada combinando una pluralidad de péptidos que tienen estructuras diferentes. Por lo tanto, cuando se estimulan DCs con fragmentos de proteína, es ventajoso utilizar una mezcla de más de un tipo de fragmentos de péptidos.

La inducción de inmunidad antitumoral por parte de péptidos también puede evaluarse observando la inducción de la producción de anticuerpos contra los tumores. Por ejemplo, cuando se inducen anticuerpos contra péptidos en animales de laboratorio inmunizados con los péptidos, y cuando el crecimiento, la proliferación y/o la metástasis de células tumorales son suprimidas por estos anticuerpos, se determina que los péptidos inducen inmunidad antitumoral.

La inmunidad antitumoral puede ser inducida al administrar una vacuna de la presente invención, y la inducción de inmunidad antitumoral permite el tratamiento y la prevención del cáncer. Efectos del tratamiento del cáncer o la prevención de la incidencia de cáncer pueden incluir la inhibición de crecimiento de células cancerosas, la regresión de las células cancerosas y la supresión del desarrollo de células cancerosas. La disminución de la tasa de mortalidad de individuos que tienen cáncer, la disminución en los marcadores tumorales en la sangre y la reducción de los síntomas detectables que acompañan al cáncer también se incluyen en los efectos del tratamiento o prevención del cáncer. Tales efectos terapéuticos o preventivos de la vacuna contra el cáncer son preferiblemente estadísticamente significativos en comparación con los de un control sin administración de la vacuna. Por ejemplo, se observan los efectos a un nivel de significancia del 5% o menos. Métodos estadísticos que pueden ser utilizados para determinar la significancia estadística son, por ejemplo, del ensayo t de Student, ensayo U de Mann-Whitney o ANOVA.

En la divulgación, el sujeto es preferiblemente un mamífero. Ejemplos incluyen seres humanos, primates no humanos, ratones, ratas, perros, gatos, caballos o ganado, pero no se limitan a los mismos.

Péptidos de la presente invención se pueden administrar a un sujeto *in vivo* o *ex vivo*. Además, para producir una composición inmunogénica para el tratamiento o la prevención del cáncer, se puede utilizar un péptido inmunogénico de la invención, es decir, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, o nonapéptidos seleccionados de péptidos variantes de los mismos.

Más específicamente, la invención proporciona agentes farmacéuticos para el tratamiento de tumores o para prevenir el crecimiento, la metástasis y similares de tumores, que incluyen uno o más péptidos de la presente invención como ingredientes activos. Péptidos de la invención son particularmente útiles para tratar el cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer testicular, cáncer cervical y tumores tales como osteosarcoma y sarcoma de tejidos blandos.

Péptidos descritos en esta memoria se pueden administrar directamente a un sujeto como un agente farmacéutico formulado por métodos de formulación ordinarios. Tal formulación puede incluir, además de los péptidos descritos en esta memoria, vehículos, excipientes y similares farmacéuticamente aceptables según sea necesario. Agentes farmacéuticos descritos en esta memoria se pueden utilizar para tratar y prevenir diversos tumores.

Además, para establecer eficazmente la inmunidad celular, adyuvantes se pueden mezclar en agentes farmacéuticos para el tratamiento y/o la prevención de tumores que incluyen uno o más péptidos de la presente invención como ingredientes activos. Alternativamente, esta composición puede ser co-administrada con otros ingredientes activos tales como agentes antitumorales. Formulaciones apropiadas también incluyen gránulos. Adyuvantes apropiados se describen en la bibliografía (Johnson AG, (1994) Clin Microbiol Rev., 7:277-89). Ejemplos de adyuvantes incluyen el adyuvante incompleto de Freund, BCG, dimicolato de trehalosa (TDM), lipopolisacárido (LPS), adyuvante de alumbre, adyuvante de sílice, fosfato de aluminio, hidróxido de alumbre y sulfato de aluminio y potasio, pero no se limitan a los mismos. Además, se pueden utilizar convenientemente formulaciones liposomales, formulaciones granulares en las que un fármaco está unido a perlas que tienen un diámetro de varios μm , y formulaciones en las que los lípidos están unidos a los péptidos antes mencionados. Métodos de administración pueden ser administración oral, inyección intradérmica, inyección subcutánea, inyección intravenosa, o similares, y pueden incluir la administración sistémica o la administración local cerca del tumor diana.

La dosis de los péptidos descritos en esta memoria se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con la enfermedad a tratar, la edad y el peso corporal del paciente, el método de administración, y similares. La dosis es habitualmente de 0,001 mg a 1.000 mg, preferiblemente de 0,01 mg a 100 mg, y más preferiblemente de 0,1 mg a 10 mg. Preferiblemente, ésta se administra una vez en unos pocos días a una vez en unos pocos meses, pero los expertos en la técnica puede seleccionar fácilmente las dosis y los métodos de administración apropiados, y la selección y optimización de estos parámetros están completamente dentro del alcance de la técnica convencional. La forma de la formulación tampoco está particularmente limitada, y puede ser secada por congelación, o granulada mediante la adición de excipientes tales como el azúcar.

Adyuvantes para aumentar la actividad inductora de células T que responden a tumores que se pueden añadir a los agentes farmacéuticos de la presente invención incluyen componentes bacterianos de bacterias BCG y tales, incluyendo dipéptido muramílico (MDP), ISCOM al que se hace referencia en Nature, vol. 344, p. 873 (1990), QS-21 de la serie de saponina descrito en, J. Immunol. vol. 148, p. 1438 (1992) de liposomas, e hidróxido de aluminio. Además, inmunoestimulantes tales como lentinan, sizofirán y Picibanil también se pueden utilizar como adyuvantes.

También se pueden utilizar como adyuvantes citoquinas y similares que potencian la proliferación y diferenciación de células T tales como IL-2, IL-4, IL-12, IL-1, IL-6 y TNF, así como CpG y lipopolisacáridos (LPS) que activan el sistema inmunológico natural mediante la unión a receptores de tipo Toll y α -galactosilceramida que activan las células NKT.

5 Las composiciones de vacuna descritas en esta memoria incluyen un componente que ceba células T asesinas. Se han identificado lípidos como sustancias que ceban contra antígenos virales *in vivo*. Por ejemplo, residuos de ácido palmítico pueden estar unidos al grupo ϵ -amino y al grupo α -amino de un residuo de lisina y, a continuación, pueden unirse a un péptido inmunogénico descrito en esta memoria. El péptido lipidado puede administrarse directamente por cualquiera de incorporación en una micela o partícula, la encapsulación en un liposoma o la emulsión en un adyuvante. Otro posible ejemplo de cebado de lípido es el cebado con una lipoproteína de *Escherichia coli* (*E. coli*) tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS) cuando se forma un enlace covalente con un péptido adecuado (Deres K., *et al.*, (1989) Nature 342: 561-4).

15 Péptidos inmunogénicos descritos en esta memoria también pueden expresarse mediante vectores virales o vectores bacterianos. Ejemplos de vectores de expresión apropiados incluyen huéspedes virales de virulencia atenuada tales como vaccinia o viruela aviar. Por ejemplo, el virus vaccinia puede ser utilizado como un vector para expresar una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido. Mediante la introducción del virus vaccinia recombinante en células huéspedes, los péptidos inmunogénicos se expresan, y esto provoca una respuesta inmunológica. Un método de inmunización utilizando vectores de vaccinia se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 4.722.848. También se puede utilizar el *Bacilo de Calmette et Guerin* (BCG). Vectores de BCG se describen en Stover CK, *et al.*, (1991) Nature 31: 456-60. Una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o la inmunización, incluyendo adeno y vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovirales, vector del bacilo de la fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*) y vectores de toxina ántrax desintoxicados son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Shata MT, *et al.*, (2000) Mol. Med. Today 6: 66-71; Shedlock DJ y Weiner DB *et al.*, (2000) J. Leukoc. Biol. 68: 793-806; y Hipp JD, *et al.*, (2000) In Vivo 14: 571-85.

25 Además, para inducir eficazmente a células T asesinas en el cuerpo de un paciente, se añade el péptido antigénico *in vitro* para presentar el antígeno a células recogidas de un paciente o a células de otra persona que comparte una parte de un alelo HLA (allo), y luego las células se administran al paciente por vía intravascular o localmente al tumor. Alternativamente, después de la inducción de células T asesinas *in vivo* mediante la adición del péptido a los linfocitos de sangre periférica del paciente y el cultivo del mismo *in vivo*, las células se pueden administrar al paciente por vía intravascular o localmente al tumor. Un tratamiento de este tipo por transferencia de células ya se ha llevado a cabo como terapia de cáncer y es un método bien conocido entre los expertos en la técnica.

35 Tipos de cánceres en la presente divulgación no están particularmente limitados, y ejemplos específicos incluyen cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer de páncreas, melanoma maligno, linfoma maligno, osteosarcoma, feocromocitoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de útero, cáncer de ovario, tumor cerebral, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga y sarcoma. Ejemplos de cánceres para los que la aplicación de la presente invención es adecuada son el cáncer de páncreas preferiblemente, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon o cáncer de pulmón.

40 (3) Los Anticuerpos de la Invención

La invención se refiere a anticuerpos que reconocen una parte de o el péptido entero mencionado anteriormente como un epítipo (antígeno) y también se dirige a células T asesinas que son inducidas por la estimulación *in vitro* utilizando las proteínas o los péptidos. En general, las células T asesinas demuestran una actividad antitumoral más potente que los anticuerpos.

45 Además, de manera similar a los péptidos descritos en esta memoria, los anticuerpos de la invención son útiles como un agente para prevenir y/o tratar cánceres que expresan CDH3 siempre que puedan inhibir la actividad del antígeno de cáncer CDH3. En un uso práctico, los péptidos o los anticuerpos descritos en esta memoria se pueden administrar como tales o con un soporte y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, con un adyuvante si es necesario, mediante inyección o mediante absorción transdérmica a través de membranas de las mucosas por pulverización o método similar. Más específicamente, la albúmina de suero humano puede ser ejemplificada como un soporte mencionado en esta memoria, y PBS, agua destilada y similar puede ser ejemplificada como un diluyente.

Los anticuerpos descritos en esta memoria pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales, y pueden ser producidos por métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, los anticuerpos policlonales se pueden obtener inmunizando mamíferos o especies aviares con un péptido de la presente invención como un antígeno, recogiendo sangre de los mamíferos o las especies aviares, y separando y purificando anticuerpos de la sangre recogida. Por ejemplo, se pueden inmunizar mamíferos tales como ratón, hámster, conejillo de indias, pollo, rata, conejo, perro, cabra, oveja y ganado, o especies aviares. Métodos de inmunización son conocidos por los expertos en la técnica, y el antígeno se puede administrar, por ejemplo, dos o tres veces a intervalos de 7 a 30 días. La dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 mg a 2 mg de antígeno por administración. La vía de administración puede seleccionarse adecuadamente a partir de administración subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular y similares, pero no se limita a una cualquiera de ellas. Además, el antígeno puede ser utilizado después de su disolución en un tampón adecuado, por ejemplo, un tampón que contiene un adyuvante convencional tal como adyuvante completo de Freund o hidróxido de aluminio.

Mamíferos o especies aviares inmunizados se crían durante un cierto período de tiempo, y cuando se ha incrementado el título de anticuerpos, pueden inmunizarse, además, con, por ejemplo, 100 µg a 1.000 µg del antígeno. Se recoge sangre de los mamíferos o especies aviares inmunizados de uno a dos meses después de la última administración y la sangre se puede separar y purificar por métodos convencionales tales como centrifugación, precipitación utilizando sulfato de amonio o polietilenglicol, y cromatografía tal como cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad para obtener los anticuerpos policlonales que reconocen los péptidos de la presente invención como un antisuero policlonal.

Anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante la preparación de hibridomas. Por ejemplo, los hibridomas se pueden obtener por fusión celular de células productoras de anticuerpos con líneas celulares de mieloma. Hibridomas que producen anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria pueden obtenerse por métodos de fusión de células tales como los indicados más adelante.

Las células del bazo, células de ganglios linfáticos, linfocitos B, y similares de los animales inmunizados se utilizan como células productoras de anticuerpos. Los péptidos de la presente invención se utilizan como un antígeno. Animales tales como ratones y ratas pueden ser utilizados como animales inmunizados, y la administración de antígenos a estos animales se puede llevar a cabo por métodos convencionales. Por ejemplo, los animales son inmunizados mediante la administración de varias veces por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal y similar con una suspensión o emulsión de un péptido de la presente invención, que es un antígeno, y de un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund. Células productoras de anticuerpos tales como células de bazo se obtienen a partir de animales inmunizados y se pueden fusionar con células de mieloma por métodos conocidos (G. Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975)) para generar hibridomas.

P3X63Ag8, P3U1, SP2/0 y similares de ratón se pueden ejemplificar como líneas celulares de mieloma utilizadas para la fusión celular. Se utiliza un agente fomentador de la fusión tal como polietilenglicol y virus Sendai para la fusión celular, y se utiliza hipoxantina/aminopterina/timidina (HAT) para seleccionar los hibridomas por un método convencional después de la fusión celular. Los hibridomas obtenidos mediante fusión celular se clonan mediante un método tal como el método de dilución limitante. Según sea necesario, líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente los péptidos de la presente invención se pueden obtener mediante rastreo mediante un método de inmunoensayo enzimático utilizando los péptidos de la presente invención.

Además de los métodos anteriores, las células inmunizados se pueden preparar mediante la estimulación de linfocitos humanos tales como los linfocitos infectados por el virus EB *in vitro*, utilizando los péptidos descritos en esta memoria, células que expresan los péptidos o lisados de los mismos. Los anticuerpos humanos que se unen a los péptidos de la presente invención también pueden obtenerse por fusión de linfocitos inmunizados de este tipo con células de la médula ósea derivadas de ser humano tales como U266 (Solicitud de Patente Japonesa Kokai N° de Publicación (JP-A) S63-17688 (solicitud de patente japonesa publicada, no examinada)).

Con el fin de producir anticuerpos monoclonales deseados a partir de los hibridomas así obtenidos, los hibridomas pueden cultivarse mediante métodos convencionales de cultivo o procedimientos de formación de ascitis, y los anticuerpos monoclonales pueden ser purificados a partir de los sobrenadantes de cultivo o la ascitis. La purificación de los anticuerpos monoclonales a partir de los sobrenadantes de cultivo o la ascitis se puede realizar por los métodos convencionales. Por ejemplo, fraccionamiento con sulfato amónico, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares se puede utilizar en combinación, según sea necesario.

Además, animales transgénicos que tienen un grupo de genes de anticuerpos humanos también pueden ser inmunizados utilizando los péptidos descritos en esta memoria, células que expresan los péptidos o lisados de los mismos. Células productoras de anticuerpos se pueden recoger de los animales transgénicos inmunizados para obtener hibridomas mediante la fusión con las líneas celulares de mieloma anteriormente descritas. Anticuerpos monoclonales deseados se pueden producir a partir de los hibridomas (documentos WO92-03918; WO94-02602; WO94-25585; WO94-33735; WO96-34096).

Alternativamente, células inmunes productoras de anticuerpos tales como linfocitos inmunizados también pueden immortalizarse utilizando oncogenes para preparar anticuerpos monoclonales.

5 Los anticuerpos monoclonales obtenidos de este modo también se pueden modular utilizando una tecnología de manipulación genética (Borrbæck y Larrick, (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies). Por ejemplo, los anticuerpos recombinantes se pueden preparar mediante clonando ADN que codifica un anticuerpo a partir de células productoras de anticuerpos tales como hibridomas y linfocitos inmunizados, insertándolo en un vector adecuado y transfectando esto en las células huésped.

10 Los anticuerpos descritos en esta memoria también pueden ser fragmentos de anticuerpo o anticuerpos modificados, siempre que se unan a los péptidos de la presente invención. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser Fab, F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena sencilla (scFv) en el que fragmentos Fv derivados de cadenas H y L están enlazados entre sí con un enlazador adecuado (Huston *et al.*, (1998) Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83). Más específicamente, los fragmentos de anticuerpos se pueden preparar por tratamiento de anticuerpos con una enzima tal como papaína y pepsina (Co *et al.*, (1994) J Immunol 152: 2968-76; Better y Horwitz, (1989) Methods Enzymol 178: 476-96; Pluckthun y Skerra, (1989) Methods Enzymol 178: 497-515; Lamoyi (1986) Methods Enzymol 121: 652-63; Rousseaux *et al.*, (1986) Methods Enzymol 121: 663-9; Bird y Walker, (1991) Trends Biotech 9: 132-7).

Los anticuerpos descritos en esta memoria incluyen anticuerpos modificados que se obtienen mediante el enlace de diversas moléculas tales como polietilenglicol (PEG). Los anticuerpos pueden ser modificados por métodos convencionales de modificación química conocida en el campo técnico.

20 Los anticuerpos descritos en esta memoria incluyen anticuerpos quiméricos que incluyen una región variable derivada de un anticuerpo no humano y una región constante derivada de un anticuerpo humano, y anticuerpos humanizados que incluyen una región determinante de complementariedad (CDR) derivada de un anticuerpo no humano, una región marco (FR) derivada de un anticuerpo humano y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Tales anticuerpos se pueden preparar por métodos convencionales conocidos en el campo técnico. Anticuerpos humanizados se obtienen mediante la sustitución de la región de secuencia de CDR de un anticuerpo humano con una región CDR de roedor que tiene la actividad de unión deseada (Verhoeyen *et al.*, (1988) Science 239: 1534-6). Por consiguiente, en comparación con los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados son anticuerpos en los que una región más pequeña del anticuerpo humano se sustituye con una correspondiente región de origen no humano.

30 Se puede preparar también un anticuerpo humano completo que tiene una región variable humana además de la región de marco humana y la región constante. Por ejemplo, en un método *in vitro*, el rastreo puede llevarse a cabo utilizando un banco recombinante de bacteriófagos que muestran fragmentos de anticuerpos humanos (Hoogenboom y Winter, (1992) J Mol Biol 227: 381-8). De manera similar, los anticuerpos humanos se pueden producir mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos cuyos genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente (documentos US6.150.584, US5.545.807, US5.545.806, US5.569.825, US5.625.126, US5.633.425, US5.661.016).

40 Los anticuerpos obtenidos como se ha indicado anteriormente se pueden purificar hasta homogeneidad por métodos convencionales conocidos en el campo técnico. Por ejemplo, se pueden utilizar métodos comunes de separación y purificación de proteínas. Los anticuerpos se pueden separar y purificar por una combinación de cromatografía en columna tal como cromatografía de afinidad, filtración, ultrafiltración, precipitación con sales, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, electroforesis de enfoque isoeléctrico, y similares; sin embargo, los métodos de separación y purificación no se limitan a estos métodos (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow y David Lane, (1988) Cold Spring Harbor Laboratory). Se pueden utilizar columnas de proteína A y columnas de proteína G como columnas de afinidad. La columna de proteína A se puede ejemplificar por HyperD, POROS y Sepharose FF (Farmacia).

45 La cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción, y similares se pueden ejemplificar como cromatografía distinta a la cromatografía de afinidad (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual Ed Daniel R. *et al.*). La cromatografía líquida tal como HPLC y FPLC también se puede utilizar como cromatografía.

50 La afinidad de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en esta memoria se puede medir utilizando, por ejemplo, la determinación de la absorbancia, ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) y ensayo de inmunofluorescencia; sin embargo, los métodos no se limitan a estos métodos. Para ELISA, los anticuerpos de la presente invención se inmovilizan sobre una placa, se añaden los péptidos descritos en esta memoria y después se añade una muestra que contiene un sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpos o anticuerpos purificados. En la siguiente etapa, se añade un anticuerpo secundario que tiene un marcador detectable y que reconoce el anticuerpo cuya unión a antígeno de afinidad se va a medir. Después de lavar la placa, se añaden los reactivos para la detección del marcador en el

anticuerpo secundario y se determina la absorbancia o similares. Por ejemplo, enzimas tales como fosfatasa alcalina se pueden utilizar como una etiqueta para el anticuerpo secundario, y sustratos de enzimas tales como fosfato de p-nitrofenilo se pueden utilizar como un reactivo para la detección. BIAcore (Pharmacia) también se puede utilizar para evaluar la actividad de los anticuerpos.

5 Los anticuerpos descritos en esta memoria pueden detectar péptidos tal como se describe en esta memoria contenidos en las muestras. A saber, la presencia de péptidos descritos en esta memoria en tejidos de cáncer puede ser confirmada, por ejemplo, mediante la exposición de muestras de biopsia de tejido de cáncer a los anticuerpos de la divulgación.

10 Antes de la etapa de tratar y/o prevenir el cáncer utilizando los péptidos descritos en esta memoria, los sujetos a ser tratados eficazmente se pueden predecir antes de iniciar el tratamiento mediante la confirmación de la expresión de los péptidos descritos en esta memoria en el cáncer a tratar utilizando los anticuerpos descritos en esta memoria.

Además, puesto que los anticuerpos de la presente divulgación reconocen fragmentos de péptido CDH3 cuya expresión está aumentado en diversas células cancerosas, se espera que sean aplicables no sólo para el diagnóstico, sino también para el tratamiento.

15 (4) Células T Auxiliares, Células T Asesinas, o grupo de inmunocitos que las incluyen

La invención también está dirigida a células T auxiliares, células T asesinas o a un grupo de inmunocitos que las incluyen inducida por la estimulación *in vitro* utilizando péptidos de la presente invención. Por ejemplo, las células T activadas reactivas al tumor son inducidas cuando linfocitos de la sangre periférica o linfocitos infiltrantes de tumores se estimulan *in vitro* utilizando los péptidos de la presente invención, y estas células T activadas pueden ser utilizadas eficazmente para la inmunoterapia adoptiva. También, las células dendríticas que son potentes células presentadoras de antígenos pueden ser pulsadas con los péptidos de la presente invención o pueden ser transformadas genéticamente para expresar los mismos, que luego se pueden utilizar para estimular células T *in vivo* o *in vitro* para inducir respuestas inmunes anti-tumorales.

25 Preferiblemente, las células T auxiliares, células T asesinas o grupo de inmunocitos que las incluye pueden ser inducidas por la estimulación *in vitro* utilizando los péptidos descritos en esta memoria y un inmunoestimulante. El inmunoestimulante en esta memoria incluye factores de crecimiento celular o citoquinas.

Los tumores pueden ser suprimidos y los cánceres se pueden prevenir y/o tratar mediante transfusión de células T auxiliares, células T asesinas o grupo de inmunocitos que las incluyen obtenidos tal como se describió anteriormente en el cuerpo.

30 Células T auxiliares, células T asesinas o grupo de inmunocitos que las incluyen, que pueden suprimir tumores tal como se describió anteriormente, también se pueden preparar utilizando los péptidos descritos en esta memoria.

Por lo tanto, la divulgación describe medios de cultivo celular que contiene los péptidos descritos en esta memoria. Las células T auxiliares, células T asesinas o grupo de inmunocitos que las incluyen, que pueden suprimir tumores, se pueden preparar utilizando tales medios de cultivo celular. Además, la divulgación describe un kit de cultivo celular que contiene un medio de cultivo celular descrito anteriormente y un recipiente de cultivo celular para producir células T auxiliares, células T asesinas o un grupo de inmunocitos que las incluyen.

(5) Exosomas Presentadores de Antígenos

La invención proporciona, además, vesículas endocíticas denominadas "exosomas", que presentan en su superficie un complejo formado entre un péptido descrito en esta memoria y un antígeno HLA. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, por métodos descritos en detalle en la traducción japonesa de la Solicitud de Patente Japonesa Kohyo N° de Publicación (JP-A) H11-510507 (publicación japonesa en fase nacional no examinada correspondiente a una publicación internacional no japonesa) y JP-A (Kohyo) 2000-512161. Preferiblemente, se puede preparar utilizando células presentadoras de antígenos obtenidas de un sujeto diana para el tratamiento y/o la prevención. Los exosomas de la presente invención pueden ser inyectados como una vacuna contra el cáncer de una manera similar a los péptidos de la presente invención.

El tipo antigénico HLA utilizado en la presente invención debe coincidir con el tipo antigénico HLA del sujeto que necesita el tratamiento y/o la prevención. Un ejemplo es HLA-A2, y preferiblemente, HLA-A2 (HLA-A*0201). "HLA-A2" significa una proteína, mientras que "HLA-A*0201" significa un gen correspondiente a un segmento de la proteína (este término se utiliza porque no hay términos disponibles en la actualidad que representen segmentos de la proteína).

(6) Métodos para Inducir Células Presentadoras de Antígenos y Células T Asesinas

La invención proporciona métodos para inducir células presentadoras de antígenos utilizando uno o más péptidos descritos en esta memoria. Células presentadoras de antígenos pueden ser inducidas por células dendríticas pulsantes inducidas a partir de monocitos de la sangre periférica con uno o más péptidos de la presente invención para estimular las células. Cuando los péptidos tal como se describen en esta memoria se administran a un sujeto, células presentadoras de antígenos que presentan los péptidos descritos en esta memoria en sus superficies pueden ser inducidos en el cuerpo del sujeto. Alternativamente, después de poner en contacto las células presentadoras de antígenos con péptidos descritos en esta memoria (o después de pulsar células presentadoras de antígenos con péptidos descritos en esta memoria), las células se pueden administrar al sujeto como una vacuna utilizando un método *ex vivo*. Por ejemplo, la administración *ex vivo* puede incluir las etapas de:

- (1) recoger células presentadoras de antígenos de un sujeto; y
- (2) poner en contacto células presentadoras de antígenos de la etapa (1) con péptidos de la presente invención (o pulsar células presentadoras de antígenos de la etapa (1) con péptidos de la presente invención).

Las células presentadoras de antígenos obtenidas en la etapa (2) se pueden administrar a un sujeto como una vacuna.

La invención también proporciona métodos para inducir células presentadoras de antígenos que tienen un alto nivel de actividad de inducción de células T asesinas. Los métodos incluyen una etapa de transfectar *in vitro* un gen que incluye un polinucleótido que codifica uno o más péptidos descritos en esta memoria en células presentadoras de antígenos. El gen a transfectar puede ser ADN o ARN. Como un método para la transfección, se pueden utilizar de manera adecuada diversos métodos, que se utilizan convencionalmente en la técnica, tales como lipofección, electroporación y un método de fosfato de calcio, pero no se limitan a los mismos. Más específicamente, la transfección puede llevarse a cabo tal como se describe en Reeves ME, *et al.*, (1996) Cancer Res., 56: 5672-7; Butterfield LH, *et al.*, (1998) J. Immunol., 161: 5607-13; Boczkowski D, *et al.*, (1996) J Exp. Med, 184: 465-72; y en la traducción japonesa publicada del documento WO2000-509281. Cuando los genes se transfectaron en células presentadoras de antígenos, éstos se transcriben y se traducen en las células. Las proteínas así obtenidas se procesan posteriormente a lo largo de las vías de MHC clase I o clase II y se presentan, a través de la vía presentadora de antígenos, en la superficie de células presentadoras de antígenos como péptidos parciales.

La presente invención proporciona, además, métodos para la inducción de células T asesinas utilizando uno o más péptidos descritos en esta memoria. Mediante la administración de uno o más péptidos descritos en esta memoria al sujeto, las células T asesinas pueden ser inducidas en el cuerpo del sujeto, mejorando así el sistema inmunológico que fija como objetivo las células cancerosas que presentan CDH3 en los tejidos tumorales. Alternativamente, las células T asesinas activadas pueden ser inducidas por contacto con células presentadoras de antígenos de un sujeto y células CD8 positivas con uno o más péptidos de la presente invención *in vitro* y mediante el contacto adicional de leucocitos mononucleares de la sangre periférica con células presentadoras de antígenos *in vitro* para estimular las células. En métodos de tratamiento *ex vivo*, el sistema inmunológico que fija como objetivo células cancerosas que presentan CDH3 en tejidos tumorales en el sujeto puede ser mejorado mediante la devolución al sujeto de las células T asesinas activadas. Por ejemplo, los métodos incluyen las etapas de:

- (1) recoger células presentadoras de antígeno de un sujeto;
- (2) poner en contacto células presentadoras de antígeno de la etapa (1) con los péptidos descritos en esta memoria (o pulsar células presentadoras de antígenos de la etapa (1) con los péptidos descritos en esta memoria);
- (3) mezclar y co-cultivar células presentadoras de antígenos de la etapa (2) con células T CD8⁺ para inducir células T citotóxicas;y
- (4) recoger células T CD8⁺ del co-cultivo de la etapa (3).

Células T CD8⁺ que tienen actividad citotóxica obtenidas en la etapa (4) se pueden administrar a un sujeto como una vacuna.

La divulgación también describe células T asesinas aisladas que son inducidas utilizando uno o más péptidos de la presente invención. Preferiblemente, las células T asesinas inducidas por el método descrito en esta memoria se derivan del sujeto a tratar y/o prevenir. Se pueden administrar en combinación con otros agentes, incluyendo células presentadoras de antígenos o exosomas que presentan uno o más péptidos descritos en esta memoria. Las células T asesinas obtenidas son específicas para células diana que presentan un péptido que es el mismo que el utilizado para la inducción. Las células diana son las que expresan CDH3 endógenamente, o las transfectadas con el gen CDH3. Las células que presentan los péptidos de la presente invención en sus superficies por estimulación con los péptidos de la presente invención, tales como células cancerosas de cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer testicular, cáncer cervical, osteosarcoma y sarcoma de tejidos blandos pueden ser objeto de ataque.

5 La divulgación describe células presentadoras de antígenos que presentan un complejo formado entre el antígeno HLA y uno o más péptidos descritos en esta memoria. Las células presentadoras de antígenos que expresan uno o más péptidos descritos en esta memoria o nucleótidos que codifican tales péptidos se recogen preferiblemente del sujeto a tratar y/o prevenir. Los péptidos descritos en esta memoria, las células presentadoras de antígenos que presentan los péptidos, exosomas o células T asesinas activadas pueden administrarse como una vacuna en combinación con otros agentes.

La invención se explica más detalladamente en los Ejemplos descritos a continuación.

Ejemplos

[Ejemplo 1]

10 Expresión de CDH3 en tumores malignos

De acuerdo con análisis del chip de ADNc del pasado, la expresión de CDH3 se incrementó en diversos tumores malignos, incluyendo el cáncer gástrico, cáncer intestinal grande, y similares, en comparación con la expresión en tejidos adyacentes normales (Tabla 1) (Nakamura T, *et al.*, Oncogene 2004; 23.: 2385-2400; Kitahara O, Cancer Res 2001; 61: 3544-3549, Obama K, *et al.*, Hepatology 2005; 41:1339-1348).

15 [Tabla 1]

	n	Tasa positiva* (%)	Relación de la expresión relativa (media)
Cáncer de páncreas	16/16	100	1.900.000
Cancer testicular	10/10	100	396.000
Tumor de tejido blando	21/21	100	248.000
Carcinoma colangiocelular	19/19	100	3600
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	35/37	95	73.000
Cáncer colorrectal	31/34	91	84.000
Cáncer cervical	14/19	74	1500
Cáncer gástrico	20/28	71	35000
Cáncer de vejiga urinaria	24/34	71	30
Cáncer de pulmón de células pequeñas	3/14	21	7
Cáncer de mama	5/81	6	1
Cancer de próstata	2/57	4	1500
Carcinoma de células renales	0/20	0	0
Cáncer de esófago	0/19	0	2

* "Positivo" significa cuando la relación expresión relativa (tejido canceroso/normal) es > 5.

[Ejemplo 2]

Selección de un repertorio de péptidos CDH3 que tiene afinidad de unión a HLA-A2

La secuencia de aminoácidos CDH3 humano fue rastreada utilizando el sistema BIMAS, y 18 péptidos fueron seleccionados con el fin de afinidad de unión esperada para HLA-A2 (Tabla 2)

20 [Tabla 2]

péptidos	posiciones	secuencias de aminoácidos péptidos	Encuadración	puntuaciones de afinidad
CDH3-1	659-677	VLGAVLALL (SEQ ID NO: 3)		84
CDH3-2	629-637	QLTVIRATV (SEQ ID NO: 4)		70
CDH3-3	602-610	VVLSLKKFL (SEQ ID NO: 5)		65
CDH3-4	655-663	FILPVLGAV (SEQ ID NO: 1)		49
CDH3-5	419-427	KLPTSTATI (SEQ ID NO: 6)		37
CDH3-6	564-572	VLNITDKDL (SEQ ID NO: 7)		36
CDH3-7	757-765	FIIENLKAA (SEQ ID NO: 2)		30
CDH3-8	187-195	AVSENGASV (SEQ ID NO: 8)		25
CDH3-9	152-160	SPPEGVFAV (SEQ ID NO: 9)		25
CDH3-10	228-237	VLPGTSVMQV (SEQ ID NO: 10)		272
CDH3-11	500-509	TLDREDEQFV (SEQ ID NO: 11)		153
CDH3-12	419-428	KLPTSTATIV (SEQ ID NO: 12)		100
CDH3-13	440-449	FVPPSKVVEV (SEQ ID NO: 13)		64
CDH3-14	66-75	FSTDNDDFTV (SEQ ID NO: 14)		50
CDH3-15	2-11	GLPRGPLASL (SEQ ID NO: 15)		49
CDH3-16	101-110	ILRRHKRDWV (SEQ ID NO: 16)		24
CDH3-17	223-232	SVLEGVLPGT (SEQ ID NO: 17)		23
CDH3-18	655-664	FILPVLGAVL (SEQ ID NO: 18)		20

Los epítomos de células T asesinas restringidos por HLA-A2 identificados en la presente invención se muestran mediante subrayado.

[Ejemplo 3]

5 En primer lugar, se indujeron células dendríticas (DC) procedentes de células de la médula ósea de ratones transgénicos HLA-A2 utilizando el método descrito previamente (Komori H et al Clinical Cancer Research 12: 2689-2697, 2006). Posteriormente, BM-DCs obtenidas de este modo se pulsaron con péptidos CDH3 (10 μ M), y luego se administraron por vía intraperitoneal a ratones transgénicos HLA-A2 a razón de 5×10^5 células/ratón. Después de la inmunización mediante la administración durante dos veces a intervalos semanales, se recogieron células de bazo de ratón y se utilizaron para la detección de las células T asesinas. Con el fin de detectar exactamente la inducción de células T asesinas derivadas de células T CD8⁺, se utilizaron las células de bazo que se prepararon mediante la eliminación de células T CD4⁺ mediante el uso de perlas de MACS después de la separación del bazo.

10 La Figura 1 representa el protocolo para la determinación de péptidos CDH3 reconocidos por células T asesinas restringidas por HLA-A2 en ratones transgénicos HLA-A2. El día en el que se recogieron células del bazo de ratones inmunizados se establece como "Día 0".

15 Día -21: (1) La inducción de células dendríticas derivadas de la médula ósea (en los que sigue en esta memoria, denominadas "BM-DC") fue iniciada por la adición de GM-CSF a las células de la médula ósea de ratones transgénicos HLA-A2.

Día -14: (2) se añadió una mezcla de tres tipos de péptidos CDH3 a las BM-DCs inducidas. Después de dos horas, BM-DCs se administraron por vía intraperitoneal a razón de 5×10^5 células/ratón.

(1) y (2) se repitieron dos veces a intervalos semanales.

20 Día 0: Se recogieron células de bazo de ratones transgénicos HLA-A2 inmunizados y se co-cultivaron con BM-DCs, que se incubaron de nuevo con el péptido CDH3 durante dos horas, y se cultivaron durante seis días.

Día 6: Para detectar células T asesinas que reconocen específicamente los péptidos CDH3, las células T productoras de interferón gamma (IFN- γ) se cuantificaron mediante el ensayo ELISPOT después de la estimulación antigénica. BM-DCs pulsadas con péptido CDH3 y BM-DCs no pulsadas se utilizaron como células diana.

Investigación de la actividad de células T asesinas específicas para CDH3 mediante ensayo ELISPOT:

25 Para confirmar que las células T asesinas reaccionan específicamente con CDH3 para producir IFN- γ que en realidad existe entre estas células, se llevó a cabo una investigación mediante el ensayo ELISPOT. IFN- γ se detectó utilizando el Set Mouse IFN- γ ELISPOT (BD Biosciences). Cuando células T asesinas (efectoras) responden a células estimuladoras (diana) y producen IFN- γ , IFN- γ será detectado como puntos rojos. BM-DCs o BM-DCs pulsadas con péptido CDH3 se utilizan como células diana. En primer lugar, una placa ELISPOT (BD Biosciences) se revistió con anticuerpo IFN- γ anti-ratón durante 18 horas, y después se bloqueó mediante el uso de FCS al 10%/RPMI durante dos horas. Las células efectoras (100 μ L/pocillo) y células diana (100 μ L/pocillo) se mezclaron y se cultivaron durante 22 horas a 37°C. El experimento se llevó a cabo a la relación efectora/diana (relación E/T) de 10:1. La placa se lavó después mediante agua esterilizada, se hizo reaccionar con anticuerpo IFN- γ anti-ratón biotinilado durante dos horas, y se hizo reaccionar adicionalmente con estreptavidina-HRP durante una hora. Puntos IFN- γ positivos se detectaron en la disolución de sustrato. Se utilizó el software Autoanalysis de MINERVA TECH para contar los puntos. Como resultado, no se observó respuesta inmunológica de células T asesinas específica para CDH3 para células T asesinas inducidas con péptido CDH3-4 o CDH3-7, mientras que no se observó respuesta inmunológica específica para CDH3 para células T asesinas inducidas con otros péptidos (Figuras 2 y 3).

40 Los resultados del ensayo ELISPOT en células T asesinas inducidas con péptido CDR3-4 (SEQ ID NO: 1) y péptido CDH3-7 (SEQ ID NO: 2) se muestran en la Figura 3.

45 Las células T asesinas mostraron $283,7 \pm 40,0$ puntos/pocillo en respuesta a BM-DCs pulsadas con el péptido CDH3-4 (SEQ ID NO: 1), mientras que mostraban $48,7 \pm 11,9$ puntos/pocillo en presencia de BM-DCs sin pulsación con péptidos ($P < 0,05$). Del mismo modo, células T asesinas mostraron $79,3 \pm 3,2$ puntos/pocillo en respuesta a las BM-DCs pulsadas con el péptido CDH3-7 (SEQ ID NO: 2), mientras que mostraron $42,7$ puntos/pocillo en presencia de BM-DCs sin pulsación con péptidos ($P < 0,05$).

Análisis estadístico:

Se utilizó el test *t* de Student de dos colas para evaluar la significancia estadística en los datos obtenidos por el ensayo ELISPOT y en el tamaño del tumor entre los grupos de tratamiento. Un valor de $P < 0,05$ se consideró

significativo. El análisis estadístico se realizó utilizando un paquete de software estadístico comercialmente disponible (SPSS para Windows (TM), versión 11.0, Chicago, IL, EE.UU.).

[Ejemplo 4]

Líneas celulares y expresión de HLA:

- 5 La línea celular de cáncer pancreático humano PANC1, la línea celular de cáncer oral HSC3 y la línea celular T2 deficiente en TAP y HLA-A2 (A*0201) positiva utilizadas para evaluar la actividad citotóxica se adquirieron de Riken Cell Bank (Tsukuba, Japón). La línea celular de cáncer pancreático humano PK8 fue proporcionada amablemente por el Centro de Recursos Celulares para la Investigación Biomédica, Instituto de Desarrollo, Envejecimiento y
- 10 Cáncer de la Universidad de Tohoku. La línea celular de cáncer de colon HCT116 humana fue proporcionada amablemente por el Dr. B. Vogelstein, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). La línea celular de cáncer de hígado humana SKHep1 fue proporcionada amablemente por el profesor Kyogo Ito, Universidad Kurume (Kurume, Japón). La expresión de HLA-A2 fue examinada por citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal (mAb) BB7.2 anti-HLA-A2 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, EE.UU.) con el fin de seleccionar donantes de sangre
- 15 HLA-A2 positivos y fijar como objetivo líneas celulares para los ensayos de citotoxicidad. Estas células se mantuvieron en medio RPMI 1640 o DMEM suplementado con FCS al 10% en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 C.

Transferencia de genes lentivirales:

- La transferencia génica mediada por vectores lentivirales se realizó como se ha descrito previamente (Tahara-Hanaoka S, *et al.* Exp Hematol 2002; 30: 11-17). En síntesis, 17  g de vectores CSII-CMV-RfA y CSIIIF-RfA auto-inactivantes (Miyoshi H, *et al.* J Virol 1998; 72: 8150-8157) que portan ADNcs de CDH3 y 10  g de pCMV-VSV-G-RSV-Rev y pCAG-HIVgp se transfectaron en células 293T cultivadas en una placa de cultivo de 10 cm utilizando
- 20 Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corporation, CA, EE.UU.). Después de 60 horas, el medio de cultivo fue recuperado y las partículas virales se sedimentaron por ultracentrifugación (50.000 x g, dos horas). El sedimento se suspendió en 50 él de medio RPMI 1640 y se añadieron 10  L de la suspensión viral a células PANC1 o células SKHep1 que fueron sembradas en una placa de 96 pocillos de fondo plano a razón de 5 x 10⁴ células por pocillo. La expresión de CDH3 transfectados se confirmó por análisis de transferencia Western.
- 25

Inducción de CTLs humanos CDH3 reactivos:

- PBMCs derivadas de sangre heparinizada de pacientes con cáncer pancreático HLA-A2 positivos, pacientes con cáncer gástrico, pacientes con cáncer colorrectal o de donantes sanos se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Conray. DCs derivadas de células mononucleares periféricas (monocitos) se prepararon mediante
- 30 el método descrito previamente (Yoshitake Y, *et al.* Clin Cancer Res 2004; 10: 6437-6448, Komori H, *et al.* Clin Cancer Res 2006; 12: 2689-2697). Las DCs se pulsaron con 20  g/mL de un péptido candidato en presencia de 4  g/mL de  2-microglobulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante dos horas a 37 C en AIM-V (Invitrogen) que contiene 2% de plasma autólogo inactivado por calor. Estas DCs fueron entonces irradiadas (40 Gy) y se incubaron con células CD8 positivas. La incubación se llevó a cabo en placas de 24 pocillos, que se prepararon para
- 35 que contuvieran en cada uno de los pocillos 2 mL de AIM-V complementado con plasma autólogo al 2%, 1 x 10⁵ DCs pulsadas con péptidos, 2 x 10⁶ células T CD8⁺, y 5 ng/mL de IL-7 recombinante humano (Wako, Osaka, Japón). Después de dos días, estos cultivos se complementaron con IL-2 humana recombinante (PeproTec Inc.) a una concentración final de 20 UI/mL. Dos estimulaciones semanales adicionales con el mismo péptido pulsadas con DCs autólogas utilizando el mismo procedimiento se llevaron a cabo el día 7 y el día 14. Seis días después de la última
- 40 estimulación, las respuestas específicas de antígeno de CTLs inducidas fueron evaluadas por el ensayo de liberación de ⁵¹Cr y el ensayo ELISPOT de IFN- . Diversas células cancerosas o células T2 pulsadas con péptidos (5 x 10³ células/pocillo) utilizadas como células diana se co-cultivaron con CTLs en una relación efector/diana adecuada para llevar a cabo el ensayo de liberación de ⁵¹Cr mediante un método conocido (Komori H, *et al.*, Clin Cancer Res 2006; 12: 2689-2697).

- 45 Se intent  la inducción de CTL específica para CDH3 a partir de PBMCs de donantes sanos HLA-A2 positivos y diversos pacientes de cáncer por estimulación con péptidos CDH3-4⁶⁵⁵⁻⁶⁶³ y CDH3-7⁷⁵⁷⁻⁷⁶⁵. Células T CD8 escogidas de las PBMCs se incubaron con DCs derivadas de células mononucleares autólogas (monocitos) pulsadas con cada uno de los péptidos. Después de tres estimulaciones, el efecto citocida contra las células T2 pulsadas con péptidos se evaluó por el ensayo de liberación de ⁵¹Cr (Figura 4A) y el ensayo ELISPOT de IFN- . CTLs inducidos a partir de
- 50 PBMCs de donantes sanos exhibían un efecto citocida contra células T2 pulsadas con el péptido CDH3-4⁶⁵⁵⁻⁶⁶³ o el péptido CDH3-7⁷⁵⁷⁻⁷⁶⁵, pero no contra las células T2 sin pulsación con péptidos. Se observaron respuestas similares con respecto a otros donantes. Estos resultados indican que estos CTLs tienen citotoxicidad específica para péptidos.

A continuación, se testó la actividad citotóxica de estos CTLs contra líneas celulares de cáncer humano que expresan CDH3 y HLA-A2. Tal como se muestra en la Figura 4B, CTLs reactivos con CDH3 estimulados con el péptido CDH3-4₆₅₅₋₆₆₃ exhibían en donantes sanos citotoxicidad para HCT116 (CDH3 +, HLA-A2 +), HSC3 (CDH3 +, HLA-A2 +) y PANC1/CDH3 (CDH3 +, HLA-A2 +), en las que se transfectó el gen CDH3 en células PANC1; sin embargo, no exhibían el mismo efecto hacia PANC1 (CDH3-, HLA-A2 +), SKHep1 (CDH23-, HLA-A2 +) y PK8 (CDH3 +, HLA-A2-). De manera similar, los CTLs estimulados con el péptido CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ exhibían citotoxicidad hacia HSC3, pero no hacia PANC1, PK8 y SKHep1. Se observaron estas actividades citotóxicas para los CTLs derivados de diversos pacientes de cáncer (Figura 4C).

Con el fin de confirmar si estos péptidos podrían ser procesadas a partir de la proteína CDH3 en condiciones naturales, se utilizaron como células diana PANC1/CDH3 y SKHep1/CDH3 (CDH3 +, HLA-A2 +), en las que el gen CDH3 se transfectó en células SKHep1. Tal como se muestra en la Figura 4C, CTL inducidas por estimulación con péptido CDH3-4₆₅₅₋₆₆₃ o con CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ exhibían citotoxicidad contra HCT116, PANC1/CDH3 y SKHep1/CDH3, pero no contra PANC1, SKHep1 y PK8. Los resultados anteriores sugieren que estos péptidos se procesan y se presentan en la superficie de células cancerosas con las moléculas HLA-A2 en condiciones naturales. CTLs reactivos con CDH3 tenían citotoxicidad específica para las células cancerosas que expresan moléculas endógenas tanto CDH3 como HLA-A2.

Confirmación de restricción de HLA clase I:

Para confirmar si los CTLs inducidos podrían reconocer células diana de una manera restringida a la HLA clase I, células cancerosas diana se incubaron con 10 µg/mL de mAb anti-HLA clase I (W6/32) o con 10 µg/mL de mAb anti-HLA-DR (H-DR-1) durante una hora antes del co-cultivo de CTLs y una línea celular cancerosa para el ensayo de liberación de ⁵¹Cr o el ensayo ELISPOT, y los efectos de los mAbs sobre la actividad citotóxica de CTLs o la producción de IFN-γ fueron examinados por un método conocido (Gomi S, *et al.*, J Immunol 1999; 163: 4994-5004). Como resultado, el anticuerpo anti-HLA clase I podría inhibir la producción de IFN-γ con significancia estadística en el ensayo de ELISPOT para CTLs generados por estimulación con péptido CDH3-4₆₅₅₋₆₆₃ contra SKHep1/CDH3 (Figura 4D, izquierda, P <0,01). También podría inhibir la actividad citotóxica contra HCT116 en el ensayo de liberación de ⁵¹Cr (Figura 4D, centro). De manera similar, el anticuerpo anti-clase I podría inhibir la producción de IFN-γ con significancia estadística en el ensayo de ELISPOT para los CTLs generados por estimulación con el péptido CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ contra células HSC3 (Figura 4D, derecha, P <0,01). Estos resultados indican que los CTLs inducidos reconocen células diana que expresan CDH3 de una forma restringida a HLA clase-I.

[Ejemplo 5]

Inmunoterapia adoptiva

Actividad anti-cáncer *in vivo* de CTLs humanos inducidos con CDH3 utilizados para la inmunización adoptiva de ratones NOD/SCID:

Con el fin de evaluar el efecto terapéutico de la administración de CTL CDH3 reactiva a ratones a los que se había trasplantado células de cáncer humanas CDH3 positivas, se realizó una inmunoterapia adoptiva experimental tal como se ha descrito previamente (Komori H, *et al.* Clin Cancer Res 2006; 12:) 2689-2697. En síntesis, células HCT116 (4 x 10⁶ células) positivos tanto para HLA-A2 como CDH3 endógeno se inocularon a ratones NOD/SCID mediante inyección hipodérmica en el flanco derecho. Cuando el tamaño del tumor se convirtió en 25 mm² el día 7 después de la inoculación del tumor en ratones, una línea de CTLs específicas para el péptido CDH3-4₆₅₅₋₆₆₃ o el péptido CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ o, como control negativo, una línea de células T CD8⁺ estimuladas con el péptido VIH restringido para HLA-A2 (SLYNTYATL, SEQ ID NO: 19) derivado de cinco donantes sanos y suspendidas en 100 µL de PBS se inyectó por vía intravenosa (4 x 10⁶). Las células T fueron inyectadas por vía intravenosa de nuevo el día 14. Los tamaños de los tumores se midieron dos veces por semana, y se evaluaron midiendo dos diámetros perpendiculares entre sí utilizando calibres. Se utilizó el test *t* de Student de dos colas para evaluar la significancia estadística en el tamaño de los tumores. Un valor de *P* <0,05 se consideró significativo. El análisis estadístico se realizó utilizando un paquete de software estadístico comercialmente disponible (SPSS para Windows (TM), versión 11.0).

Células T CD8 + control estimuladas con péptidos de VIH control no exhibieron citotoxicidad contra células HCT116 *in vitro*. Se evaluaron los tamaños de los tumores de siete ratones individuales en cada uno de los grupos (Figura 5A) y la media ± desviación estándar de tamaños de tumor en cada uno de los grupos (Figura 5B). La línea de células T control y PBS solo no exhibían un efecto inhibitor sobre el crecimiento del tumor. El tamaño del tumor en ratones inoculados con los CTLs estimulados con CDH3 fue significativamente menor que en los ratones inoculados con células T CD8 + inducida por el péptido de control VIH o con PBS solo (*P* <0,001). Estos resultados indican la

eficacia de la terapia de transferencia adoptiva de CTLs humanos CDH3 reactivos contra tumor humano CDH3+ en ratones NOD/SCID.

Discusión:

5 En el estudio actual, los autores de la presente invención identificaron Cadherina 3 (CDH3)/P-cadherina como una nueva TAA a través de análisis del chip de ADNc de cáncer de páncreas. CDH3 se expresaba fuertemente en células de cáncer pancreático y se expresaba débilmente en el ovario y la glándula mamaria en base al análisis del chip de ADNc. La expresión de CDH3 fue apenas detectable en otros órganos vitales. Además, los datos de chips y RT-PCR demostraron que CDH3 se expresaba en los cánceres gástricos y colorrectales, así como en el cáncer de páncreas, pero apenas se expresaba en sus tejidos homólogos normales. Ya se informó que CDH3 se sobre-
10 expresaba en la mayoría de tejido de cáncer de páncreas, mientras que las células del conducto y acinares normales en páncreas casi no mostraron expresión de CDH3 por tinción inmunohistoquímica (Taniuchi K, *et al.* Cancer Res 2005; 65: 3092-3099). Estos resultados sugieren que CDH3 podría ser una nueva diana de la inmunoterapia para los cánceres anteriores, cuya diana conlleva un bajo riesgo de inducir una respuesta autoinmune.

15 La familia de las cadherinas se clasifica en diversas subfamilias, incluyendo Cadherina 1 (CDH1)/E-cadherina, Cadherina 2 (CDH2)/N-cadherina y Cadherina 3 (CDH3)/P-cadherina, de acuerdo con su distribución en los tejidos. CDH1 es el miembro de la familia cadherina predominante que se expresa en todos los tejidos epiteliales. Se supone que CDH1 actúa como un factor supresor de tumores que regula negativamente la invasión y metástasis de células cancerosas (Frixen U H, *et al.* J Cell Biol 1991; 113: 173-185, Berx G, *et al.* Genomics 1995; 26: 281-289, Oka H, *et al.* Cancer Res 1993; 53: 1696-1701). La expresión de CDH2 está aumentada en cánceres invasivos y CDH2 contribuye en los fenómenos invasivos mediante la interacción con el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y a través de la señalización aguas abajo (Suyama K, *et al.* Cancer Cell 2002; 2: 301-314). La expresión y el papel de CDH3 en los cánceres son poco conocidos. En un estudio anterior, Taniuchi *et al.* sugirieron que el aumento de expresión de CDH3 es probable que sea un factor que refuerza la invasividad del cáncer de páncreas mediante la interacción con p120ctn y la familia Rho GTPasa, Rac1 y Cdc42 (Taniuchi K, *et al.* Cancer Res 2005; 65: 3092-3099). Otros estudios previos sugirieron que CDH3 es también un factor de aumento de la capacidad de invasión y de mal pronóstico en el cáncer de mama (Palacios J, *et al.* Am J Pathol 1995; 146: 605-612, Paredes J, *et al.* Clin Cancer Res 2005; 11: 5869-5877, Peralta Soler A, *et al.* Cancer 1999; 86: 1263-1272) y cáncer de endometrio (Stefansson I M, *et al.* J Clin Oncol 2004; 22: 1242-1252).

30 Cuando los informes anteriores se toman juntos, la tasa de respuesta objetiva de vacunas contra el cáncer en los ensayos clínicos era tan baja como 2,6% (Rosenberg S A, *et al.* Nat Med 2004; 10: 909-915). Una posibilidad es que las células cancerosas expulsan inmunidad debido a la delección, mutación o regulación a la baja de TAA como consecuencia de la terapia de inducción inmunológica. En base al punto de vista de que las células tumorales no pueden perder antígenos que son necesarios para la tumorigénesis, CDH3 sería un candidato de TAA útil para la
35 inmunoterapia contra el cáncer.

En la presente invención, sus autores identificaron, entre los 18 péptidos candidatos seleccionados por el algoritmo BIMAS, dos péptidos de epítomos CDH3 restringidos por HLA-A2 que se confirmó inducen CTLs de ratón restringidos por HLA-A2 en ratones transgénicos HLA-A2.1 (HHD). Además, los autores de la presente invención confirmaron que CTLs CDH3 reactivos se generaron a partir de PBMCs derivadas de donantes sanos y pacientes de
40 cáncer mediante el uso de estos péptidos (Figura 4). Estos CTLs exhibían un efecto citocida no sólo hacia las células T2 pulsadas con su péptido correspondiente, sino también hacia las líneas de células cancerosas que expresan CDH3 y HLA-A2. De lo anterior, se sugiere que los presentes péptidos CDH3 (CDH3-4⁶⁵⁵⁻⁶⁶³ y CDH3-7⁷⁵⁷⁻⁷⁶⁵) son producidos de forma natural por el procesamiento de la proteína CDH3 en células cancerosas, presentada sobre la superficie celular junto con moléculas HLA-A2, y luego son reconocidos por CTLs.

45 La citotoxicidad de los CTLs CDH3 reactivos de la presente invención se confirmó no sólo *in vitro* por el ensayo de liberación de ⁵¹Cr, sino también *in vivo* por inmunoterapia adoptiva de CTL. Tal como se muestra en la Figura 5, la inyección intravenosa de células CD8+ inducida por los péptidos de la presente invención inhibía significativamente el crecimiento de tumores injertados en ratones NOD/SCID, en comparación con células CD8+ control y similares.

50 *HLA-A2 (A*0201)* es uno de los alelos de *HLA* más comunes en diversos grupos étnicos incluyendo asiáticos, africanos, afro-americanos y caucásicos (Browning M. *et al.* Immunol Today 1996; 17: 165-170). Por lo tanto, los péptidos identificados en la presente invención que son presentados a células T asesinas a través de HLA-A2 tienen una potencial aplicación clínica en todo el mundo, si su seguridad y eficacia en la inmunoterapia del cáncer se muestran en la medicina exploratoria. Además, la identificación de péptidos presentados a células T asesinas a través de HLA-A2, portadores de las cuales son frecuentes no sólo en personas japonesas, sino también en
55 personas de todo el mundo, es probable que conduzca al desarrollo de productos farmacéuticos para la

inmunoterapia del cáncer aplicables a aproximadamente el 30% de los pacientes con cáncer de páncreas en todo el mundo.

Aplicabilidad industrial

5 HLA-A2 es un alelo de HLA clase I que es portado por aproximadamente el 30% de la población japonesa. Cuando
ratones transgénicos que expresan HLA-A2 humano son inmunizados con los péptidos CDH3 de la presente
invención, los péptidos pueden inducir células T citotóxicas que reconocen péptidos unidos a moléculas de HLA-A2
para inducir respuestas inmunológicas. Es muy posible que, también en los seres humanos, estos péptidos puedan
inducir células T citotóxicas humanas que dañan las células cancerosas que expresan complejos de los péptidos y
moléculas de HLA-A2. Por lo tanto, los péptidos de la presente invención se pueden aplicar a la inmunoterapia para
10 el cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon y cáncer de pulmón de células
no pequeñas en pacientes HLA-A2 positivos. Por lo tanto, se espera que los péptidos mejoren la calidad de vida
(QOL) de los pacientes mediante la supresión de la proliferación y/o el progreso de este tipo de cánceres.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
THE UNIVERSITY OF TOKYO

5 <120> Péptido CDH3 y medicamento que comprende el mismo

<130> ONC-A0711P

<150> JP 2007-213999

<151> 20-08-2007

10

<160> 19

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 1

Phe Ile Leu Pro Val Leu Gly Ala Val
1 5

25

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 2

35

Phe Ile Ile Glu Asn Leu Lys Ala Ala
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

40

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 3

45

Val Leu Gly Ala Val Leu Ala Leu Leu
1 5

<210> 4

<211> 9

50

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

55

<400> 4

Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val
1 5

<210> 5

<211> 9

60

<212> PRT

ES 2 632 123 T3

<213> Artificial
<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
5
<400> 5

Val Val Leu Ser Leu Lys Lys Phe Leu
1 5
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
10
<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
15
<400> 6

Lys Leu Pro Thr Ser Thr Ala Thr Ile
1 5
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
20
<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
25
<400> 7

Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu
1 5
<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
30
<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
35
<400> 8

Ala Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val
1 5
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
40
<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
45
<400> 9

Ser Pro Pro Glu Gly Val Phe Ala Val
1 5
<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
50
<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
55
<400> 10

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
60
<400> 10

ES 2 632 123 T3

		Val	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Met	Gln	Val
		1				5					10
	<210>	11									
	<211>	10									
	<212>	PRT									
5	<213>	Artificial									
	<220>										
	<223>	Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente									
10	<400>	11									
		Thr	Leu	Asp	Arg	Glu	Asp	Glu	Gln	Phe	Val
		1				5					10
	<210>	12									
	<211>	10									
15	<212>	PRT									
	<213>	Artificial									
	<220>										
	<223>	Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente									
20	<400>	12									
		Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Val
		1				5					10
	<210>	13									
25	<211>	10									
	<212>	PRT									
	<213>	Artificial									
	<220>										
30	<223>	Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente									
	<400>	13									
		Phe	Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Val	Val	Glu	Val
		1				5					10
35	<210>	14									
	<211>	10									
	<212>	PRT									
	<213>	Artificial									
40	<220>										
	<223>	Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente									
	<400>	14									
45		Phe	Ser	Thr	Asp	Asn	Asp	Asp	Phe	Thr	Val
		1				5					10
	<210>	15									
	<211>	10									
	<212>	PRT									
50	<213>	Artificial									
	<220>										
	<223>	Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente									
55	<400>	15									
		Gly	Leu	Pro	Arg	Gly	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu
		1				5					10
	<210>	16									
	<211>	10									
60	<212>	PRT									
	<213>	Artificial									

ES 2 632 123 T3

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 16

5

Ile Leu Arg Arg His Lys Arg Asp Trp Val
1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15 <400> 17

Ser Val Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr
1 5 10

<210> 18

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

25

<400> 18

Phe Ile Leu Pro Val Leu Gly Ala Val Leu
1 5 10

<210> 19

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido artificialmente sintetizada

35 <400> 19

Ser Leu Tyr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de los siguientes (A) o (B):
 - (A) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2;
 - 5 (B) un péptido de menos de 15 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, en que uno o dos aminoácido(s) están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos, y en donde el péptido tiene actividad para inducir una célula T citotóxica (asesina).
2. El péptido de la reivindicación 1, en donde dicho péptido es de los siguientes (A) o (B):
 - (A) dicho péptido consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2;
 - 10 (B) dicho péptido consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, en que uno o dos aminoácido(s) están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos, y en donde el péptido tiene actividad para inducir una célula T citotóxica (asesina).
3. El péptido de la reivindicación 1 o 2, en donde el segundo aminoácido desde el extremo N es leucina o metionina.
4. El péptido de la reivindicación 1 o 2, en donde el aminoácido C-terminal es valina o leucina.
- 15 5. Un agente para uso en tratar y/o prevenir el cáncer, que comprende uno o más péptido(s) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en calidad de un ingrediente activo.
6. Un agente farmacéutico que comprende uno o más péptido(s) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un polinucleótido(s) que codifica dichos péptidos en calidad de un ingrediente activo.
7. Un anticuerpo contra el péptido de la reivindicación 2.
- 20 8. Una célula citotóxica (asesina) T aislada o un grupo de inmunocitos que comprende la célula, que es inducido utilizando el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Una célula presentadora de antígenos aislada que presenta un complejo que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un antígeno HLA.
10. Un exosoma que presenta un complejo que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un antígeno HLA.
- 25 11. El exosoma de la reivindicación 10, en donde el antígeno HLA es HLA-A2 (HLA-A*0201).
12. Un método in-vitro para inducir una célula presentadora de antígenos que tiene actividad inductora de células T citotóxicas (asesinas), que comprende una etapa de
 - 30 (a) poner en contacto una célula presentadora de antígeno con el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o
 - (b) transfectar un polinucleótido que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una célula presentadora de antígenos.
13. La célula presentadora de antígenos de la reivindicación 9, que es inducida por el método de la reivindicación 12.
- 35 14. Un método in-vitro para inducir una célula T citotóxica (asesina), que comprende una etapa de
 - (a) poner en contacto una célula T con el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; o
 - (b) co-cultivar una célula presentadora de antígenos puesta en contacto con el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con una célula T CD8⁺.
- 40 15. La célula presentadora de antígenos que tiene actividad inductora de células T citotóxicas (asesinas), según se obtiene por el método de la reivindicación 12, o la célula T citotóxica (asesina) según se obtiene por el método de la reivindicación 14 para uso en el tratamiento del cáncer.

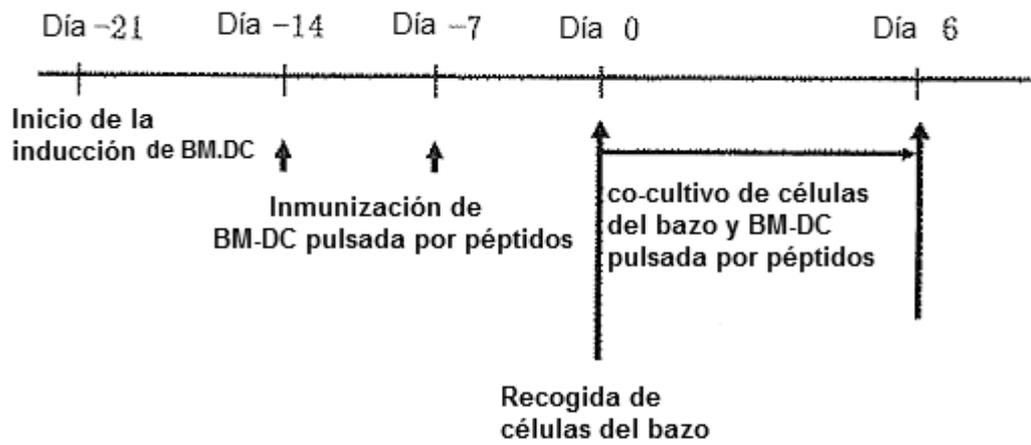


FIG. 1

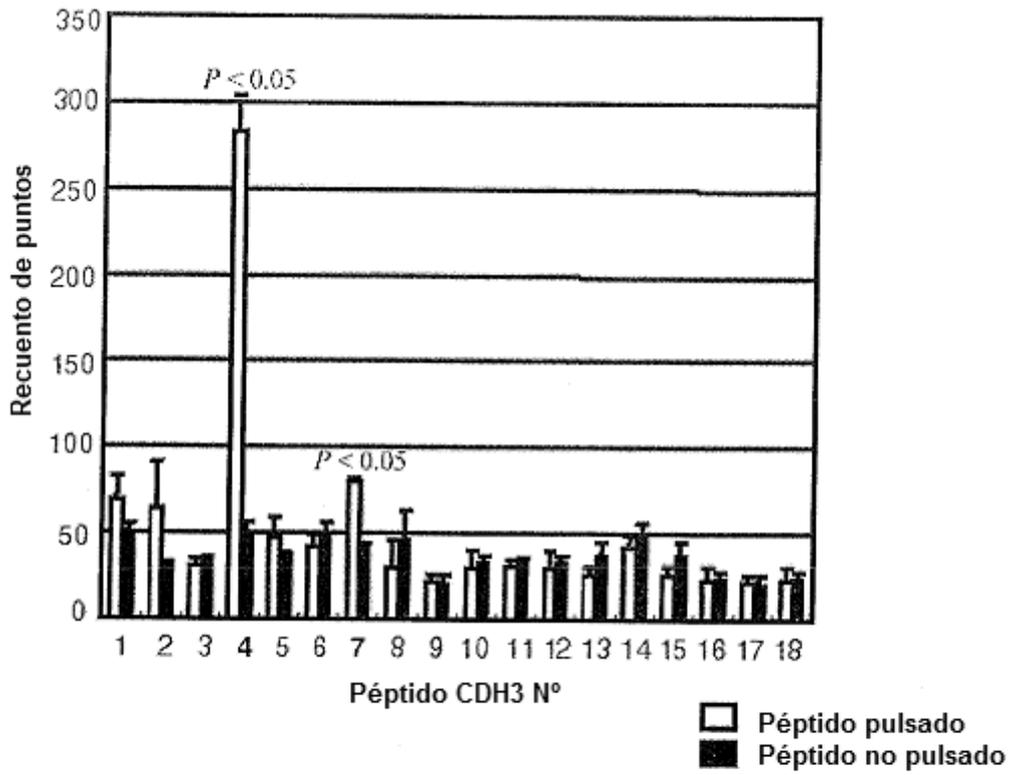


FIG. 2

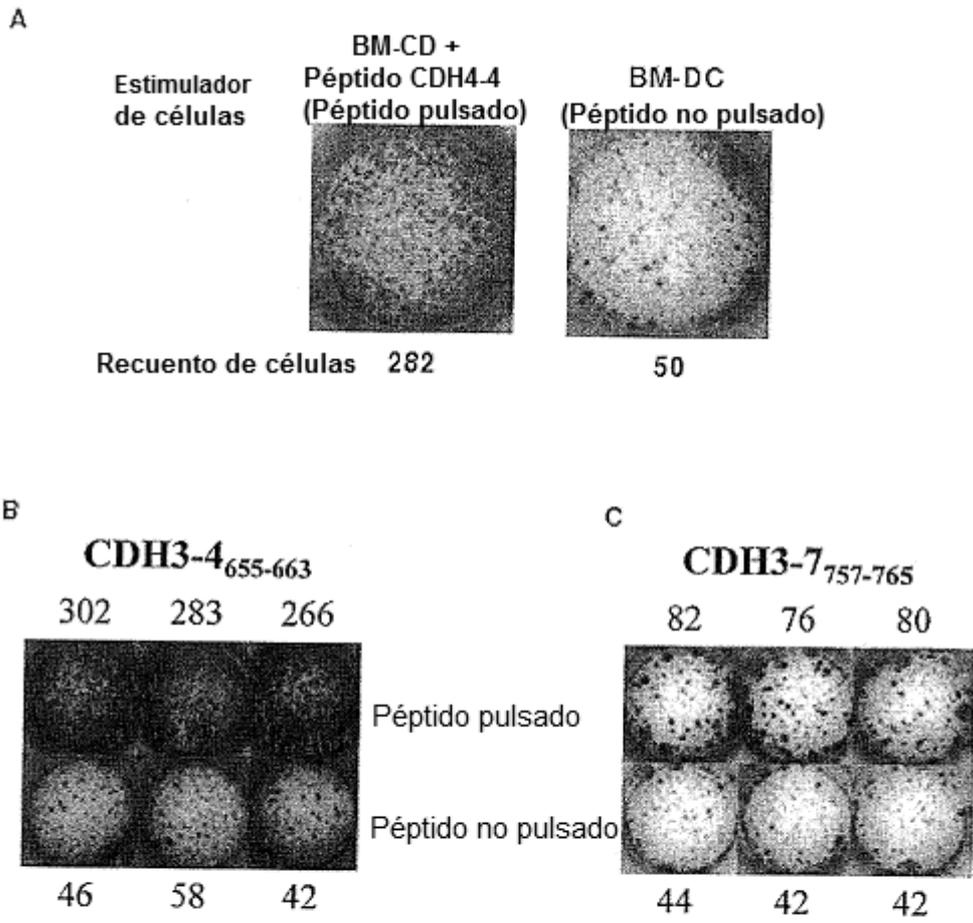


FIG. 3

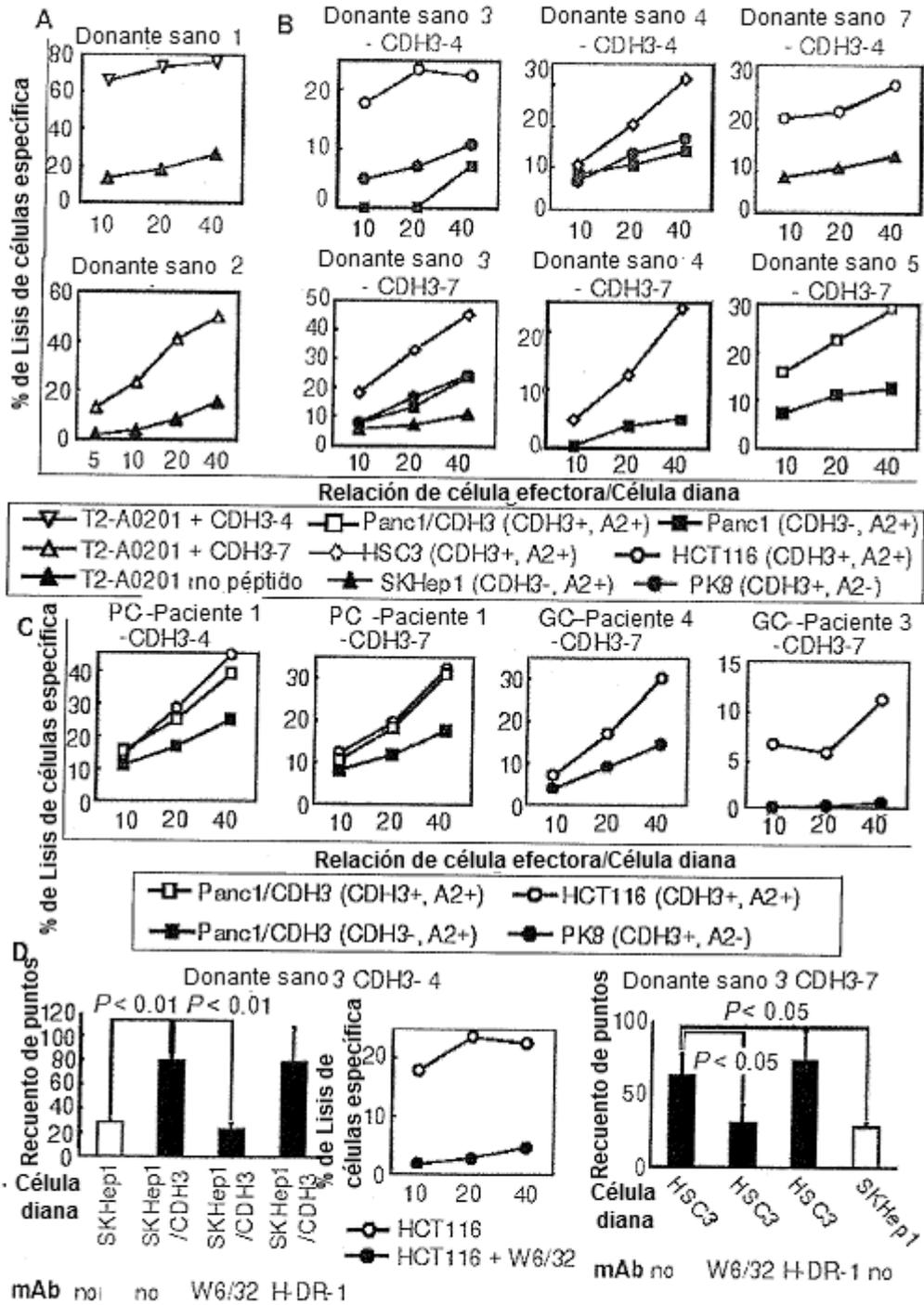


FIG. 4

