

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 900**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2012 PCT/JP2012/005076**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2013 WO13024582**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2012 E 12824137 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2742133**

54 Título: **Péptidos MPHOSPH1 y vacunas que incluyen los mismos**

30 Prioridad:

12.08.2011 US 201161522991 P

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

27.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TSUNODA, TAKUYA;
OSAWA, RYUJI;
YOSHIMURA, SACHIKO;
WATANABE, TOMOHISA y
NAKAMURA, YUSUKE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 647 900 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos MPHOSPH1 y vacunas que incluyen los mismos

[Campo técnico]

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

[Técnica anterior]

10 Se ha mostrado que los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen péptidos de epítipo derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) encontrados en la molécula de clase I del complejo mayor histocompatibilidad (MHC), y entonces destruyen las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia de antígeno de melanoma antígeno (MAGE), se han descubierto muchos otros TAA mediante enfoques inmunológicos (NPL 1, Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80; NPL 2, Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9). Algunos de estos TAA están siendo actualmente sometidos a desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas.

15 Los TAA favorables son indispensables para la proliferación y supervivencia de células cancerosas. El uso de tales TAA como dianas para inmunoterapia puede minimizar el riesgo bien descrito de escape inmunitario de células cancerosas atribuible a delección, mutación o regulación por disminución de TAA como consecuencia de selección inmunitaria terapéuticamente conducida. Por consiguiente, la identificación de nuevos TAA capaces de inducir respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas garantiza además el desarrollo y así la aplicación clínica de estrategias de vacunación de péptidos para diversos tipos de cáncer está en curso (NPL 3, Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55; NPL 4, Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; NPL 5, Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; NPL 6, van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14; NPL 7, Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; NPL 8, Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; NPL 9, Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66; NPL 10, Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94). Hasta la fecha, se ha informado de varios ensayos clínicos usando estos péptidos derivados de antígeno asociado a tumor. Desafortunadamente, muchas de los actuales ensayos de vacunas contra el cáncer han mostrado solo una baja tasa de respuesta objetivo (NPL 11, Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; NPL 12, Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42; NPL 13, Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15). Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad en la materia de nuevos TAA como dianas inmunoterapéuticas.

20 Se identificó MPHOSPH1 (fosfoproteína 1 de fase M; N° de acceso de GenBank NM_016195 y NP_057279, SEQ ID NO: 125 y 126) como una de las proteínas específicamente fosforiladas en la transición G2/M y se caracterizó como una proteína relacionada con kinesina dirigida al extremo más (NPL 14, Abaza A et al., J Biol Chem 2003, 278: 27844-52). Más particularmente, se ha informado que MPHOSPH1 es un motor molecular dirigido al extremo más que desempeña una función crucial en la citocinesis, y se acumula en la zona central del huso durante la anafase a la telofase en células HeLa (NPL 14, Abaza A et al., J Biol Chem 2003, 278: 27844-52; NPL 15, Kamimoto T et al., J Biol Chem 2001, 276: 37520-8). En el transcurso de los análisis del perfil de expresión génica usando una micromatriz de ADNc de genoma completo que contiene 23.040 genes, MPHOSPH1 se identificó como una molécula novedosa regulada por incremento en cáncer de vejiga (NPL 16, Kanehira M et al., Cancer Res. 2007 Apr 1;67(7):3276-85; PTL 1, WO2006/085684). Además, mediante análisis de transferencia Northern, se encontró que la expresión de los productos génicos de MPHOSPH1 se limitaba al testículo y estaba ausente de los órganos vitales normales.

25 Se identificaron previamente algunos fragmentos de péptido derivados de MPHOSPH1 que tienen inducibilidad de linfocitos T citotóxicos (CTL) (PTL 2, WO2008/047473). Estos fragmentos de péptido demostraron la capacidad de inducir CTL contra células estimuladas con los fragmentos de péptido relacionados. Sin embargo, estudios previos fracasaron en confirmar si los fragmentos de péptido tenían la capacidad de inducir o no CTL que se dirigen a células tumorales que expresan el gen MPHOSPH1 y el antígeno HLA-A2.

[Lista de referencias]

[Bibliografía de patente]

[PTL 1] WO2006/085684

50 [PTL 2] WO2008/047473

[Bibliografía no de patente]

[NPL 1] Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80

[NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9

- [NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55
- [NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42
- [NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9
- [NPL 6] van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14
- 5 [NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8
- [NPL 8] Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72
- [NPL 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66
- [NPL 10] Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94
- [NPL 11] Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80
- 10 [NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42
- [NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15
- [NPL 14] Abaza A et al., J Biol Chem 2003, 278: 27844-52.
- [NPL 15] Kamimoto T et al., J Biol Chem 2001, 276: 37520-8
- [NPL 16] Kanehira M et al., Cancer Res. 2007 Apr 1; 67(7):3276-85.

15 [Sumario de la invención]

La presente invención se refiere a las realizaciones como se definen en las reivindicaciones. Así, la invención se refiere a un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 y un polinucleótido aislado que consiste en un polinucleótido que codifica el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120. Además, la invención se refiere a una composición para inducir un linfocito T citotóxico (CTL) o una composición para inducir una célula presentadora de antígeno (APC) que tiene inducibilidad de CTL, en la que la composición comprende el péptido de SEQ ID NO: 120, o el polinucleótido que codifica el péptido de SEQ ID NO: 120. Además, la invención se refiere a un método *in vitro* de inducción de una célula presentadora de antígeno (APC) que tiene inducibilidad de CTL, comprendiendo el método una etapa seleccionada del grupo que consiste en (a) poner en contacto una APC con el péptido de SEQ ID NO: 120, y (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de SEQ ID NO: 120 en una APC. La invención se refiere a un método *in vitro* de inducción de un CTL, comprendiendo el método una etapa seleccionada del grupo que consiste en (a) co-cultivar a linfocito T CD8 positivo con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de SEQ ID NO: 120; y (b) co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de SEQ ID NO: 120. Además, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en (a) el péptido de SEQ ID NO: 120; (b) el polinucleótido que codifica el péptido de SEQ ID NO : 120; (c) una APC que presenta un complejo del péptido de SEQ ID NO: 120 y un antígeno HLA sobre su superficie; y (d) un exosoma que presenta un complejo del péptido de SEQ ID NO: 120 y un antígeno HLA sobre su superficie. Además, la invención se refiere a una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de SEQ ID NO: 120.

35 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de novedosos péptidos que pueden servir como dianas adecuadas de inmunoterapia. Debido a que los TAA son generalmente percibidos por el sistema inmunitario como "propios" y, por tanto, frecuentemente no tienen inmunogenicidad, el descubrimiento de dianas apropiadas es de importancia extrema. Como se observa anteriormente, MPHOSPH1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 126 codificado por el gen de N° de acceso de GenBank NM_016195 (SEQ ID NO: 125)) se ha identificado como regulado por incremento en cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (LMC), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos. Así, la presente invención se centra en MPHOSPH1 como candidato a diana de inmunoterapia para cáncer/tumor, más particularmente novedosos péptidos de epítipo de MPHOSPH1 que pueden servir de dianas inmunoterapéuticas adecuadas.

Para este fin, la presente invención se refiere a, al menos en parte, la identificación de péptidos específicos de epítipo que poseen la capacidad de inducir CTL específicos para MPHOSPH1 entre péptidos derivados de MPHOSPH1. Como se trata en mayor detalle más adelante, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de un donante sano se estimularon usando candidatos a péptidos de unión a HLA-A*0201 derivados de MPHOSPH1. Entonces se establecieron líneas de CTL con citotoxicidad específica contra las células diana HLA-A2 positivas pulsadas con cada uno de los candidatos a péptidos. Los resultados en el presente documento demuestran que estos péptidos son péptidos de epítipo restringidos a HLA-A2 que pueden inducir respuestas inmunitarias

potentes y específicas contra células que expresan MPHOSPH1. Estos resultados indican además que MPHOSPH1 es fuertemente inmunogénico y los epítopes del mismo son dianas eficaces para inmunoterapia para cáncer/tumor.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar péptidos aislados que se unen al antígeno HLA e inducen CTL, en el que los péptidos incluyen un fragmento inmunológicamente activo de MPHOSPH1 (SEQ ID NO: 126). Tales péptidos pueden usarse para inducir CTL *in vitro* o *ex vivo*, o para ser directamente administrados a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias *in vivo* contra cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos.

Los péptidos de la presente divulgación tienen generalmente menos de 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud. Péptidos preferidos de la presente divulgación son nonapéptidos o decapeptidos. Los péptidos particularmente preferidos tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120, ya que aquellos péptidos demostraron que se unían al antígeno HLA-A2 e inducían CTL.

Así, los péptidos de la presente divulgación son péptidos de menos de 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120. Los péptidos de la presente divulgación son nonapéptidos o decapeptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120. Además, como se demuestra en el presente documento, se confirmó que un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 inducía CTL que se dirigían a células tumorales que expresan MPHOSPH1 y el antígeno HLA-A2. Así, el péptido de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.

Cuando se ponga en contacto con células presentadoras de antígeno (APC) *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, el péptido de la presente invención se unirá con antígenos HLA-A2 sobre APC y se presentará sobre APC como complejos con antígenos HLA-A2. Alternativamente, el péptido de la presente invención puede ser captado por APC, procesado a fragmentos compuestos de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 en APC, y presentado sobre APC como complejo con antígenos HLA-A2. Por consiguiente, se inducen CTL específicos para tales péptidos y se considera que tales CTL son un elemento de la presente invención.

La presente divulgación también se refiere a péptidos modificados que tienen una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120, mientras que los péptidos modificados retienen la inducibilidad de CTL equivalente a la del péptido no modificado original. Para este fin, la presente divulgación se refiere a un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud, que tiene inducibilidad de CTL y comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) una secuencia de aminoácidos en la que 1, 2, o varios aminoácidos están sustituidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 14 y 64, y

(ii) la secuencia de aminoácidos de (i), en la que la secuencia de aminoácidos tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de dicha SEQ ID NO está seleccionado del grupo que consiste en leucina y metionina; y

(b) el aminoácido del extremo C de dicha SEQ ID NO está seleccionado del grupo que consiste en valina y leucina.

Además, la presente divulgación se refiere a un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12 u 11 aminoácidos de longitud, que tiene inducibilidad de CTL y comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i') una secuencia de aminoácidos en la que 1, 2 o varios aminoácidos están sustituidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 73, 77, 79, 97, 103 y 120, y

(ii') la secuencia de aminoácidos de (i'), en la que la secuencia de aminoácidos tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de dicha SEQ ID NO está seleccionado del grupo que consiste en leucina y metionina; y

(b) el aminoácido del extremo C de dicha SEQ ID NO está seleccionado del grupo que consiste en valina y leucina.

Como se demuestra en el presente documento, tales péptidos pueden unirse con antígenos HLA-A2 sobre APC y presentarse sobre APC como complejos con antígenos HLA-A2. Alternativamente, tales péptidos pueden ser captados por APC, procesados a fragmentos compuestos de una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre

(i), (ii), (i'), y (ii') en APC, y presentados sobre APC como complejos con antígenos HLA-A2, cuando aquellos péptidos se ponen en contacto con APC. Por consiguiente, los CTL específicos para tales péptidos se inducen y se considera que tales CTL son un elemento de la presente invención.

5 La presente invención engloba además el polinucleótido aislado que codifica el péptido de la presente invención. El polinucleótido puede usarse para inducir o preparar APC que tienen inducibilidad de CTL. Al igual que el péptido anteriormente descrito de la presente invención, tales APC pueden administrarse a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres.

10 Cuando se administra a un sujeto, el péptido de la presente invención se presenta sobre la superficie de APC para inducir CTL que se dirigen a los péptidos respectivos. Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes o composiciones que incluyen uno o más péptidos o polinucleótidos proporcionados por la presente invención para inducir cualquiera o ambos de APC y CTL. Tales agentes o composiciones también pueden usarse para uno o más fines seleccionados de entre el tratamiento del cáncer, la profilaxis del cáncer y la prevención de reaparición posoperatoria de cáncer. Ejemplos de cánceres elegidos como diana incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos. Así, es otro objeto más de la presente invención proporcionar agentes farmacéuticos o composiciones para cualquiera o ambos del tratamiento del cáncer y la profilaxis del cáncer, tales agentes farmacéuticos o composiciones formulados para incluir uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención. En lugar de o además de los péptidos o polinucleótidos de la presente invención, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden incluir como principios activos APC o exosomas que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención.

20 El péptido o polinucleótido de la presente invención puede usarse para inducir APC que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido presente, por ejemplo, poniendo en contacto APC con el péptido de la presente invención o introduciendo un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en APC. Tales APC tienen la capacidad de inducir CTL que reconocen específicamente células que presentan péptidos diana sobre su superficie y encuentran uso en inmunoterapia contra el cáncer. Por consiguiente, la presente invención engloba los métodos de inducción de APC que tienen inducibilidad de CTL, además de las APC obtenidas por tales métodos. Además, la presente invención también engloba los agentes o composiciones para su uso en la inducción de APC, incluyendo tales agentes o composiciones cualquier péptido o polinucleótido de la presente invención.

25 Es además un objeto de la presente invención proporcionar un método de inducción de CTL, incluyendo tal método la etapa de co-cultivar linfocitos T CD8 positivos sobre APC o exosomas que presentan el péptido de la presente invención sobre su superficie o la etapa de introducir un polinucleótido que codifica tanto subunidades del receptor de linfocitos T (TCR) como polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR, en el que el TCR puede unirse a un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA presentado sobre la superficie celular. Los CTL obtenidos por tales métodos pueden encontrar uso en cualquiera o ambos del tratamiento del cáncer y la prevención del cáncer. Ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos.

30 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar APC aisladas que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención. La presente invención proporciona además CTL aislados que se dirigen a péptidos de la presente invención. Estas APC y CTL encuentran utilidad en el contexto de la inmunoterapia contra el cáncer. Es otro objeto más de la presente invención proporcionar métodos de inducción de una respuesta inmunitaria contra un cáncer en un sujeto en necesidad de los mismos, incluyendo tales métodos la etapa de administrar un agente o composición que incluye al menos un componente seleccionado de entre los péptidos de la presente invención, polinucleótidos que codifican tales péptidos, exosomas o APC que presentan tales péptidos y CTL que reconocen células que presentan tales péptidos sobre su superficie.

35 La aplicabilidad de la presente invención se extiende a cualquiera de varias de las enfermedades que se refieren a o que surgen de la expresión en exceso de MPHOSPH1, tal como cáncer, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos.

Más específicamente, la presente divulgación se refiere a lo siguiente:

[1] Un péptido aislado de los siguientes (a) o (b):

55 (a) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120;

(b) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que 1, 2 o varios aminoácidos están sustituidos, deletados, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120, y en el que el péptido tiene inducibilidad de linfocitos T citotóxicos (CTL),

[2] El péptido aislado de [1], en el que el péptido tiene una o ambas de las siguientes características:

5 (a) el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120 está seleccionado del grupo que consiste en leucina y metionina; y

(b) el aminoácido del extremo C de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120 está seleccionado del grupo que consiste en valina y leucina,

10 [3] El péptido aislado de [1] o [2], en el que el péptido es un nonapéptido o decapeptido,

[4] Un polinucleótido aislado que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [3],

[5] Una composición para inducir un CTL, en la que la composición comprende uno o más péptidos de uno cualquiera de [1] a [3], o uno o más polinucleótidos de [4],

15 [6] Una composición para inducir una APC que tiene inducibilidad de CTL, en la que la composición comprende uno o más péptidos de uno cualquiera de [1] a [3], o uno o más polinucleótidos de [4],

[7] Una composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) uno o más péptidos de uno cualquiera de [1] a [3];

(b) uno o más polinucleótidos que codifican el péptido de uno cualquiera de [1] a [3];

20 (c) una o más APC o exosomas que presentan un complejo del péptido de uno cualquiera de [1] a [3] y un antígeno HLA sobre su superficie; y

(d) uno o más CTL que reconocen una célula que presenta un complejo del péptido de uno cualquiera de [1] a [3] y un antígeno HLA sobre su superficie,

25 [8] La composición farmacéutica de [7] para su uso en cualquiera o ambos del tratamiento y la profilaxis del cáncer, o inducción de una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto,

[9] La composición farmacéutica de [7] o [8], en la que la composición farmacéutica se formula para administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2,

[10] Un método de inducción de una célula presentadora de antígeno (APC) que tiene inducibilidad de CTL, comprendiendo dicho método una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

30 (a) poner en contacto una APC con el péptido de uno cualquiera de [1] a [3] *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, y

(b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [3] en una APC,

[11] Un método de inducción de un CTL, comprendiendo dicho método una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

35 (a) co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [3];

(b) co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [3]; y

40 (c) introducir un polinucleótido que codifica ambos de subunidades de receptores de linfocitos T (TCR) o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR en un linfocito T CD8 positivo, en el que el TCR puede unirse a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [3] presentado sobre una superficie celular,

[12] Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [3],

45 [13] La APC de [12], que se induce por el método de [10],

[14] Un CTL aislado que reconoce una célula que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [3],

[15] El CTL de [14], en el que dicho CTL se induce por el método de [11],

5 [16] Un método de cualquiera o ambos del tratamiento y profilaxis del cáncer en un sujeto, en el que el método comprende la etapa de administrar al sujeto (a) cantidad(es) farmacéuticamente eficaz (eficaces) de:

(a) uno o más péptidos de uno cualquiera de [1] a [3];

(b) uno o más polinucleótidos que codifican el péptido de uno cualquiera de [1] a [3];

10 (c) una o más APC o exosomas que presentan un complejo del péptido de uno cualquiera de [1] a [3] y un antígeno HLA sobre su superficie; o

(d) uno o más CTL que reconocen una célula que presenta un complejo del péptido de uno cualquiera de [1] a [3] y un antígeno HLA sobre su superficie,

15 [17] Un método de inducción de una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo dicho método la etapa de administrar al sujeto una composición que comprende un péptido de uno cualquiera de [1] a [3] o un polinucleótido que codifica el péptido,

[18] Un anticuerpo o fragmento inmunológicamente activo del mismo contra el péptido de uno cualquiera de [1] a [3],

[19] Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [3],

20 [20] Una célula hospedadora transformada o transfectada con el vector de [19], y

[21] Un kit de diagnóstico que comprende el péptido de uno cualquiera de [1] a [3], el polinucleótido de [4] o el anticuerpo de [18].

Objetos y características de la invención serán más completamente evidentes cuando la siguiente descripción detallada se lea conjuntamente con las figuras y ejemplos adjuntos.

25 [Breve descripción de los dibujos]

Diversos aspectos y aplicaciones de la presente invención serán evidentes para el experto tras la consideración de la breve descripción de las figuras y la descripción detallada de la presente invención y sus realizaciones preferidas que siguen.

[Fig. 1]

30 La Figura 1 está compuesta por una serie de fotografías, (a) a (j), que representan los resultados de ensayos de ELISPOT de IFN-gamma en CTL que se indujeron con péptidos derivados de MPHOSPH1. Los CTL en el número de pocillo N.º 7 estimulados con MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5) (a), en N.º 5 estimulados con MPHOSPH1-A02-9-129 (SEQ ID NO: 14) (b), en N.º 5 estimulados con MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64) (c), en N.º 2 estimulados con MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73) (d), en N.º 1 estimulados con MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77) (e), en N.º 1 estimulados con MPHOSPH1-A02-10-407 (SEQ ID NO: 79) (f), en N.º 4 estimulados con MPHOSPH1-A02-10-923 (SEQ ID NO: 97) (g), en N.º 5 estimulados con MPHOSPH1-A02-10-1484 (SEQ ID NO: 103) (h) y en N.º 8 estimulados con MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) (i) mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadrado sobre el pocillo de estas imágenes indica que las células del pocillo correspondiente se expandieron para establecer líneas de CTL. A diferencia, como caso típico de datos negativos, la producción de IFN-gamma específico de los CTL estimulados con MPHOSPH1-A02-9-575 (SEQ ID NO: 1) (j) no se mostró. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ningún péptido.

45 [Fig. 2a-f]

La Figura 2a-f está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (a) a (f), que representan los resultados de un ensayo de ELISA de IFN-gamma que demuestra la producción de IFN-gamma de líneas de CTL estimulados con MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5) (a), MPHOSPH1-A02-9-129 (SEQ ID NO: 14) (b), MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64) (c), MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73) (d), MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77) (e), y MPHOSPH1-A02-10-407 (SEQ ID NO: 79) (f). La cantidad de IFN-gamma que produjeron las líneas de CTL se midió por ensayoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) de IFN-gamma. Los

resultados demuestran que las líneas de CTL establecidas por estimulación con cada péptido muestran potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ningún péptido. La relación R/S indica la relación del número de células respondedoras (línea de CTL) y células estimuladoras.

[Fig. 2g-i]

La Figura 2g-i está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (g) a (i), que representan los resultados de un ensayo de ELISA de IFN-gamma que demuestra la producción de IFN-gamma de líneas de CTL estimulados con MPHOSPH1-A02-10-923 (SEQ ID NO: 97) (g), MPHOSPH1-A02-10-1484 (SEQ ID NO: 103) (h) y MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) (i). La cantidad de IFN-gamma que produjeron las líneas de CTL se midió por enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) de IFN-gamma. Los resultados demuestran que las líneas de CTL establecidas por estimulación con cada péptido muestran potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ningún péptido. La relación R/S indica la relación del número de células respondedoras (línea de CTL) y células estimuladoras.

[Fig. 3]

La Figura 3 está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (a) a (e), que representan la producción de IFN-gamma de los clones de CTL establecidos por dilución limitante a partir de las líneas de CTL estimulados con MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5) (a), MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64) (b), MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73) (c), MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77) (d) y MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) (e). Los resultados demuestran que los clones de CTL establecidos por estimulación con cada péptido muestran potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ningún péptido. La relación R/S indica la relación del número de células respondedoras (clon de CTL) y células estimuladoras.

[Fig. 4]

La Figura 4 es un gráfico de líneas que representa actividad de CTL específica contra las líneas de células tumorales. Se usaron células J82 que expresan tanto MPHOSPH1 como HLA-A*0201, células HT1376 que expresan MPHOSPH1 pero no HLA-A*0201 y células T2 que expresan HLA-A*0201 pero no MPHOSPH1 como células estimuladoras. El clon de CTL establecido con MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) mostró actividad de CTL específica contra células J82. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica significativa contra células HT1376 y T2. La relación R/S indica la relación del número de las células respondedoras (CTL clon) y las células estimuladoras.

[Fig. 5]

La Figura 5 es un gráfico de líneas que representa la actividad citotóxica de CTL contra las líneas de células tumorales. Se usaron células UMUC-3 que expresan tanto MPHOSPH1 como HLA-A*0201, células MKN45 que expresan MPHOSPH1 pero no HLA-A*0201 y T2 que expresaron HLA-A*0201 pero no MPHOSPH1 como células diana. El clon de CTL establecido con MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) mostró potente actividad citotóxica contra células UMUC-3. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica significativa contra células MKN45 y T2. La relación E/T indica la relación del número de células efectoras (clon de CTL) y células diana.

[Fig. 6]

La Figura 6 es un gráfico de líneas que representa la actividad citotóxica de CTL contra las células diana que expresan MPHOSPH1 y HLA-A*0206. Se prepararon células COS7 transfectadas con HLA-A*0206 o el gen MPHOSPH1 de longitud completa como los controles. La línea de CTL establecida con MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) mostró actividad de CTL específica contra células COS7 transfectadas con tanto MPHOSPH1 como HLA-A*0206 (rombo negro). Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica significativa contra células diana que expresan o bien HLA-A*0206 (triángulo) o bien MPHOSPH1 (círculo).

[Descripción de realizaciones]

Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de las realizaciones de la presente invención, ahora se describen métodos, dispositivos y materiales preferidos.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que la presente

invención pertenece. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes.

I. Definiciones:

5 Las palabras "un", "una", "el" y "la", como se usan en el presente documento, significan "al menos uno", a menos que se indique específicamente de otro modo.

10 Los términos "aislado" y "purificado", usados en relación con una sustancia (por ejemplo, péptido, anticuerpo, polinucleótido, etc.), indican que la sustancia está sustancialmente libre de al menos una sustancia que puede incluso incluirse en la fuente natural. Así, un péptido aislado o purificado se refiere a péptidos que están sustancialmente libres de material celular tales como hidrato de carbono, lípido, u otras proteínas contaminantes de la fuente de célula o tejido del que deriva el péptido, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. El término "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un péptido en las que el péptido se separa de componentes celulares de las células de las que se aísla o produce recombinantemente. Así, un péptido que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de polipéptido que tiene menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en el presente documento una "proteína contaminante"). Cuando el péptido se produce recombinantemente, también está preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, que incluye preparaciones de péptido con medio de cultivo inferior a aproximadamente el 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de péptido. Cuando el péptido se produce por síntesis química, está preferentemente sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, que incluye preparaciones de péptido con precursores químicos u otros productos químicos implicados en la síntesis del péptido inferior a aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) del volumen de la preparación de péptido. Puede mostrarse que una preparación de péptido particular contiene un péptido aislado o purificado, por ejemplo, por la aparición de una única banda tras la electroforesis en dodecilsulfato de sodio (SDS)-gel de poli(acrilamida de la preparación de proteína y tinción con azul de Coomassie Brilliant o similares del gel. En una realización preferida, se aíslan o purifican péptidos y polinucleótidos de la presente invención.

25 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos pueden ser resto(s) modificado(s), o resto(s) que no existen de forma natural, tales como mimético(s) químico(s) artificial(es) de aminoácido(s) que existe(n) de forma natural correspondiente(s), además de 30 a polímeros de aminoácidos que existen de forma natural.

El término "oligopéptido", algunas veces usado en la presente memoria descriptiva, se usa para referirse a péptidos de la presente divulgación que tienen 20 restos o menos, normalmente 15 restos o menos de longitud, y normalmente está compuesto de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 11 restos, frecuentemente 9 o 10 restos. Los últimos se denominan en el presente documento "nonapéptidos" y "decapéptidos", respectivamente.

35 El término "aminoácido", como se usa en el presente documento, se refiere a aminoácidos que existen de forma natural y sintéticos, además de a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácido que funcionan similarmente a los aminoácidos que existen de forma natural. El aminoácido puede ser o bien L-aminoácidos o bien D-aminoácidos. Los aminoácidos que existen de forma natural son aquellos codificados por el código genético, además de aquellos modificados después de la traducción en células (por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina). La expresión "análogo de aminoácido" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica (un carbono alfa unido a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) como aminoácido que existe de forma natural, pero tienen uno o más grupos R modificados o esqueletos modificados (por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metionina metil-sulfonio). La expresión "mimético de aminoácido" se refiere a compuestos químicos que tienen diferentes estructuras, pero funciones similares a los aminoácidos 40 generales.

Los aminoácidos pueden denominarse en el presente documento por sus símbolos comúnmente conocidos de tres letras o los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

50 Los términos "gen", "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en el presente documento y, a menos que se indique específicamente de otro modo, son similarmente a los aminoácidos referidos por sus códigos de una letra comúnmente aceptados.

55 Los términos "agente" y "composición" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un producto que incluye los componentes especificados en las cantidades especificadas, además de cualquier producto que resulte, directamente o indirectamente, de la combinación de los componentes especificados en las cantidades especificadas. Tales términos, cuando se usan en relación con el adjetivo "farmacéutico" (como en "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica") pretenden englobar un producto que incluye el (los) principio(s) activo(s), y cualquier componente inerte que constituya el vehículo, además de cualquier producto que resulte, directamente o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de dos cualesquiera o más de los componentes, o de la disociación de uno o más de los componentes, o de otros tipos de reacciones o interacciones

de uno o más de los componentes. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, los términos "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica" se refieren a cualquier producto preparado por mezcla de una molécula o compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

5 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo fisiológicamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa un material, composición, sustancia o vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, que incluye, pero no se limita a, una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación.

10 Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención encuentran uso particular como vacunas. En el contexto de la presente invención, la expresión "vacuna" (también denominada una "composición inmunogénica") se refiere a un agente o composición que tiene la función de inducir inmunidad antitumoral tras la inoculación en animales.

15 El término "principio activo" en el presente documento se refiere a una sustancia en un agente o composición que es biológicamente o fisiológicamente activo. Particularmente, en el contexto del agente farmacéutico o composición, el término "principio activo" se refiere a una sustancia que muestra un efecto farmacológico objetivo. Por ejemplo, en caso de agentes farmacéuticos o composiciones para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, principios activos en los agentes o composiciones pueden conducir a al menos una acción biológica o fisiológica sobre células cancerosas y/o tejidos directamente o indirectamente. Preferentemente, tal acción puede incluir reducir o inhibir el crecimiento de células cancerosas, dañar o destruir células cancerosas y/o tejidos, etc. Normalmente, el efecto indirecto de los principios activos es inducciones de CTL que reconocen o que destruyen células cancerosas. Antes de ser formulado, el "principio activo" también puede denominarse "sustancia activa", "principio activo" o "producto técnico".

20 A menos que se defina de otro modo, el término "cáncer" se refiere a cánceres que expresan en exceso el gen MPHOSPH1, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos.

A menos que se defina de otro modo, los términos "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" se usan indistintamente en el presente documento y, a menos que se indique específicamente de otro modo, se refieren a un sub-grupo de linfocitos T que son capaces de reconocer células no propias (por ejemplo, células tumorales/cancerosas, células infectadas por virus) e inducir la muerte de tales células.

30 A menos que se defina de otro modo, el término "HLA-A2", como se usa en el presente documento, se refiere representativamente a los subtipos, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 y HLA-A*0250.

35 A menos que se defina de otro modo, el término "kit", como se usa en el presente documento, se usa en referencia a una combinación de reactivos y otros materiales. Se contempla en el presente documento que el kit puede incluir micromatriz, chip, marcador, etc. No se pretende que el término "kit" se limite a una combinación particular de reactivos y/o materiales.

40 Como se usa en el presente documento, en el contexto de un sujeto o paciente, la expresión "el antígeno HLA del sujeto (o paciente) es HLA-A2" se refiere a que el sujeto o paciente posee homocigóticamente o heterocigóticamente el gen de antígeno HLA-A2 como la molécula de clase I del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad), y el antígeno HLA-A2 se expresa en células del sujeto o paciente como un antígeno HLA.

45 Hasta el punto de que los métodos y composiciones de la presente invención encuentran utilidad en el contexto del "tratamiento" del cáncer, un tratamiento se considera "eficaz" si conduce a beneficio clínico, tal como una disminución en el tamaño, prevalencia o potencial metastásico del cáncer en un sujeto, retardando la progresión del cáncer, alivio de un síntoma clínico del cáncer, prolongación del tiempo de supervivencia, supresión de la reaparición posoperatoria, etc. Cuando el tratamiento se aplica profilácticamente, "eficaz" significa que retarda o previene que se formen cánceres o previene o alivia un síntoma clínico del cáncer. La eficacia se determina en asociación con cualquier método conocido de diagnóstico o tratamiento del tipo de tumor particular.

50 Hasta el punto que los métodos y composiciones de la presente invención encuentran utilidad en el contexto de la "prevención" y "profilaxis" del cáncer, tales términos se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier actividad que reduce la carga de mortalidad o morbilidad de la enfermedad. La prevención y profilaxis pueden producirse "a niveles de prevención primaria, secundaria y terciaria". Aunque la prevención primaria y la profilaxis evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles de prevención secundaria y terciaria y la profilaxis engloban actividades que pretenden la prevención y profilaxis de la progresión de una enfermedad y la emergencia de síntomas, además de reducir el impacto negativo de una enfermedad ya establecida restaurando la función y reduciendo las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y profilaxis pueden incluir un amplio intervalo de terapias profilácticas que pretenden aliviar la gravedad del trastorno particular, por ejemplo reducir la proliferación y metástasis de tumores.

En el contexto de la presente invención, el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer y/o la prevención de reaparición posoperatoria del mismo incluyen cualquier actividad que conduce a, por ejemplo, los siguientes eventos, tales como la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la involución o regresión de un tumor, la inducción de remisión, la supresión de la manifestación del cáncer, la regresión tumoral, la reducción o inhibición de metástasis, la supresión de la reaparición posoperatoria del cáncer y la prolongación del tiempo de supervivencia. El tratamiento y/o profilaxis eficaz del cáncer disminuye la mortalidad y mejora el pronóstico de individuos que tienen cáncer, disminuye los niveles de marcadores tumorales en la sangre, y alivia síntomas detectables que acompañan al cáncer. Por ejemplo, la reducción o mejora de síntomas constituye tratar eficazmente y/o la profilaxis incluye 10 %, 20 %, 30 % o más de reducción, o enfermedad estable.

En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere a inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas que son específicamente reactivos con una proteína designada o péptido de la misma. Un anticuerpo puede incluir anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos fusionados con otras proteínas o radiomarcas, y fragmentos de anticuerpos. Además, un anticuerpo en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multi-específicos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, mientras que presentan la actividad biológica deseada. Un "anticuerpo" indica todos los casos (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).

II. Péptidos:

Los péptidos de la presente invención descritos en detalle a continuación pueden denominarse "péptido(s) MPHOSPH1" o "polipéptido(s) MPHOSPH1".

Para demostrar que los péptidos derivados de MPHOSPH1 funcionan como un antígeno reconocido por CTL, se analizaron péptidos derivados de MPHOSPH1 (SEQ ID NO: 126) para determinar si eran epítopes de antígeno restringidos por HLA-A2 que son alelos de HLA comúnmente encontrados (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994).

Se identificaron candidatos de péptidos de unión a HLA-A2 derivados de MPHOSPH1 basándose en sus afinidades de unión a HLA-A2.

Además, después de la estimulación *in vitro* de linfocitos T por células dendríticas (DC) pulsadas (cargadas) con estos péptidos, los CTL se establecieron satisfactoriamente estimulando las DC con cada uno de los siguientes péptidos:

MPHOSPH1-A2-9-850 (SEQ ID NO: 5),
 MPHOSPH1-A2-9-129 (SEQ ID NO: 14),
 MPHOSPH1-A2-9-846 (SEQ ID NO: 64),
 MPHOSPH1-A2-10-460 (SEQ ID NO: 73),
 MPHOSPH1-A2-10-770 (SEQ ID NO: 77),
 MPHOSPH1-A2-10-407 (SEQ ID NO: 79),
 MPHOSPH1-A2-10-923 (SEQ ID NO: 97),
 MPHOSPH1-A2-10-1484 (SEQ ID NO: 103) y
 MPHOSPH1-A2-10-282 (SEQ ID NO: 120).

Estos CTL establecidos mostraron potente actividad de CTL específica contra células diana pulsadas con péptidos respectivos. Estos resultados demuestran que MPHOSPH1 es un antígeno reconocido por CTL y que los péptidos probados son péptidos de epítipo de MPHOSPH1 restringidos por HLA-A2; y por tanto, los péptidos pueden ser eficaces como antígenos diana para citotoxicidad por CTL. Además, MPHOSPH1-A2-10-282 (SEQ ID NO: 120) indujo CTL que tienen potente actividad citotóxica contra células cancerosas que expresan tanto MPHOSPH1 y el antígeno HLA-A2 como la molécula de clase I de MHC. Este resultado sugiere que el péptido MPHOSPH1-A2-10-282 se produce naturalmente *in vivo* para ser presentado sobre células cancerosas que expresan MPHOSPH1 por el antígeno HLA-A2 (por ejemplo, HLA-A*0201 o HLA-A*0206). Según los hallazgos, un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120, o derivados, mutantes, variantes o péptidos modificados del mismo - son útiles en el contexto de terapia inmunológica para tratar un cáncer que expresa MPHOSPH1 y el antígeno HLA-A2. En ciertas realizaciones de la presente invención, el péptido compuesto de una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento puede usarse para terapia inmunológica del cáncer. Ejemplos de cánceres que van a tratarse incluyen, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal,

cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos. Sin embargo, los péptidos de la presente invención pueden aplicarse a cualquier cáncer, mientras que expresan MPHOSPH1 y el antígeno HLA-A2.

5 Como el gen MPHOSPH1 se expresa en exceso en células cancerosas tales como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos, pero no se expresa en la mayoría de los órganos normales, es una buena diana para inmunoterapia. Así, la presente divulgación se refiere a nonapéptidos (péptidos compuestos de nueve restos de aminoácidos) y decapeptidos (péptidos compuestos de diez restos de aminoácidos) de epítopes reconocidos por CTL de MPHOSPH1. Alternativamente, la presente divulgación se refiere a péptidos aislados que se unen a antígenos HLA e inducen linfocitos T citotóxicos (CTL), en los que el péptido está compuesto por un fragmento inmunológicamente activo de MPHOSPH1 (SEQ ID NO: 126). Más específicamente, la presente divulgación se refiere a péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120. El péptido de la presente invención es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.

15 Generalmente, programas de software ahora disponibles, por ejemplo, en internet, tales como aquellos descritos en Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75 y Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, pueden usarse para calcular las afinidades de unión entre diversos péptidos y antígenos HLA por ordenador. La afinidad de unión con antígenos HLA puede medirse como se describe, por ejemplo, en Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007 Oct 31; 8: 424, Buus S et al. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003, Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, y Nielsen M et al. PLoS ONE 2007; 2: e796, que se resumen en, por ejemplo, Lafuente EM et al., Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220. Métodos de determinación de la afinidad de unión se describen, por ejemplo, en Journal of Immunological Methods (1995, 185: 181-190) y Protein Science (2000, 9: 1838-1846). Por tanto, pueden utilizarse tales programas de software para seleccionar aquellos fragmentos derivados de MPHOSPH1 que tienen alta afinidad de unión con antígenos HLA. Por consiguiente, la presente invención engloba péptidos compuestos de cualquier fragmento derivado de MPHOSPH1, que se determinaría que se unen con antígenos HLA por tales programas conocidos. Además, tales péptidos pueden incluir el péptido compuesto de la secuencia de longitud completa de MPHOSPH1.

20 Los péptidos de la presente divulgación, particularmente los nonapéptidos y decapeptidos de la presente invención, pueden flanquearse con restos de aminoácidos adicionales, mientras que los péptidos retienen su inducibilidad de CTL. Los restos de aminoácidos adicionales particulares pueden estar compuestos de cualquier tipo de aminoácido mientras que no alteren la inducibilidad de CTL del péptido original. Así, la presente divulgación se refiere a péptidos que tienen inducibilidad de CTL, en los que los péptidos incluyen una secuencia de aminoácidos derivada de MPHOSPH1. Tales péptidos tienen, por ejemplo, menos de aproximadamente 40 aminoácidos, frecuentemente menos de aproximadamente 20 aminoácidos, normalmente menos de aproximadamente 15 aminoácidos.

25 Se conoce generalmente que las modificaciones de uno, dos, varios o más aminoácidos de un péptido no influyen en la función del péptido, o en algunos casos incluso potencian la función deseada del péptido original. En realidad, se ha mostrado que los péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos de una secuencia de aminoácidos modificada sustituyendo, insertando, delecionando y/o añadiendo uno, dos o varios restos de aminoácidos a una secuencia de referencia original) retienen la actividad biológica del péptido original (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13). Así, el péptido que tiene inducibilidad de CTL de la presente divulgación puede estar compuesto de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120, en la que uno, dos o varios aminoácidos están añadidos, delecionados, insertados y/o sustituidos. En otra realización, los péptidos de la presente invención pueden ser péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120, siempre que el péptido modificado retenga la inducibilidad de CTL del péptido original. El péptido de la presente divulgación puede ser un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios aminoácidos están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120, siempre que el péptido modificado retenga la inducibilidad de CTL del péptido original.

30 Aquellos expertos en la materia reconocerán que modificaciones individuales (es decir, adiciones, inserciones, deleciones y/o sustituciones) a una secuencia de aminoácidos que alteran un único aminoácido o un pequeño porcentaje de la secuencia de aminoácidos global tienden a producir la conservación de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original; así se denomina "sustitución conservativa" o "modificación conservativa", en la que la alteración de una proteína produce una proteína con funciones similares. Tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Ejemplos de propiedades de cadenas laterales de aminoácidos son aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene base (R, K, H); y una cadena lateral que

contiene grupo aromático (H, F, Y, W). Además, los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas para otros:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 5 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 10 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins 1984).

Se considera que tales péptidos conservativamente modificados también son péptidos de la presente invención. Sin embargo, el péptido de la presente invención no está restringido a éstos y puede incluir modificaciones no conservativas, mientras que el péptido modificado resultante retenga la inducibilidad de CTL del péptido no modificado original. Además, los péptidos modificados no deben excluir péptidos inducibles por CTL derivados de variantes polimórficas, homólogos entre especies, o alelos de MPHOSPH1.

Pueden insertarse, sustituirse, deleccionarse y/o añadirse restos de aminoácidos a los péptidos de la presente divulgación o, alternativamente, restos de aminoácidos pueden ser deleccionados de los mismos para lograr una afinidad de unión más alta. Para retener la inducibilidad de CTL requerida, se modifica preferentemente (inserta, delecciona, añade y/o sustituye) solo un pequeño número (por ejemplo, 1, 2 o varios) o un pequeño porcentaje de aminoácidos. En el presente documento, el término "varios" significa 5 o menos aminoácidos, por ejemplo, 4 o 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos que va a modificarse puede ser, por ejemplo, del 20 % o menos, preferentemente del 15 % o menos, más preferentemente del 10 % o menos, incluso más preferentemente del 1 al 5 %.

Cuando se usa en el contexto de la inmunoterapia contra el cáncer, el péptido de la presente invención puede presentarse sobre la superficie de una célula o exosoma como un complejo con un antígeno HLA. Por tanto, es preferible seleccionar péptidos que no solo inducen CTL, sino que también poseen alta afinidad de unión por el antígeno HLA. Para este fin, los péptidos pueden modificarse por sustitución, inserción, deleción y/o adición de restos de aminoácidos para dar un péptido modificado que tiene afinidad de unión mejorada. Además de los péptidos que son naturalmente presentados, como ya se conoce la regularidad de las secuencias de péptidos presentadas por la unión a antígenos HLA (J Immunol 1994, 152: 3913; Inmunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), pueden introducirse modificaciones basadas en tal regularidad en los péptidos inmunogénicos de la presente divulgación.

Por ejemplo, péptidos que presentan alta afinidad de unión por HLA-A2 tienden a tener el segundo aminoácido del extremo N sustituido con leucina o metionina. Asimismo, también pueden ser favorablemente usados péptidos en los que el aminoácido del extremo C está sustituido con valina o leucina. Así, se contemplan por la presente divulgación péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120 en la que el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con leucina o metionina, y/o en la que el extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con valina o leucina. La presente divulgación engloba péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos en la que el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120 está sustituido con leucina o metionina, y/o el extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con valina o leucina. Los péptidos de la presente divulgación pueden comprender una secuencia de aminoácidos en la que el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 está sustituido con leucina o metionina, y/o el extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con valina o leucina.

La presente divulgación se refiere a los péptidos que tienen inducibilidad de CTL, en la que los péptidos tienen la fórmula general seleccionada del grupo que consiste en (1) a (9) del siguiente modo:

- (1) -correspondiente a MPHOSPH1-A2-9-850 (SEQ ID NO: 5)-F[X1]LTIENE[X2],
- (2) -correspondiente a MPHOSPH1-A2-9-129 (SEQ ID NO: 14)-F[X1]GCIMQP[X2],
- 50 (3) -correspondiente a MPHOSPH1-A2-9-846 (SEQ ID NO: 64)-G[X1]RAFLLT[X2],
- (4) -correspondiente a MPHOSPH1- A2-10-460 (SEQ ID NO: 73)-Y[X1]AYDETLN[X2],

- (5) -correspondiente a MPHOSPH1-A2-10-770 (SEQ ID NO: 77)-K[X1]ICNETVE[X2]
 (6) -correspondiente a MPHOSPH1-A2-10-407 (SEQ ID NO: 79)-L[X1]TLGKCIN[X2]
 (7) -correspondiente a MPHOSPH1-A2-10-923 (SEQ ID NO: 97)-K[X1]SNEIETA[X2]
 (8) -correspondiente a MPHOSPH1- A2-10-1484 (SEQ ID NO: 103)-Q[X1]VAALEIQ[X2], y
 5 (9) -correspondiente a MPHOSPH1- A2-10-282 (SEQ ID NO: 120)-Y[X1]YDLFVPV[X2].

En la fórmula general (1)-(9), [X1] es leucina o metionina y [X2] es valina o leucina. La fórmula general puede ser (9), que se corresponde con SEQ ID NO: 120. La presente divulgación se refiere además a péptidos aislados representados por la fórmula general (1)-(9) definida anteriormente, a la que uno, dos, o varios aminoácidos se añaden en cualquiera o ambos del extremo N y extremo C de la misma. En una alternativa, la presente divulgación se refiere a péptidos aislados representados por la fórmula general (1)-(9) de la que uno, dos o varios restos de aminoácidos están delecionados en cualquiera o ambos del extremo N y extremo C de la misma. La presente divulgación también se refiere a péptido aislado representado por la fórmula general (1)-(9), a la que uno, dos o varios aminoácidos se insertan o delecionan en cualquier parte de la secuencia.

Pueden introducirse sustituciones no solo en los aminoácidos terminales, sino también en las posiciones de posibles sitios de reconocimiento de receptores de linfocitos T (TCR) de péptidos. Varios estudios han demostrado que un péptido con sustituciones de aminoácidos puede tener igual o mejor función que la del original, por ejemplo, CAP1, p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎, Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ o gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb 1;168(3):1338-47, S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 y S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

La presente divulgación también contempla la adición de uno, dos o varios aminoácidos que también pueden añadirse a cualquiera o ambos del extremo N y C de los péptidos de la presente invención. Tales péptidos modificados que retienen la inducibilidad de CTL también están incluidos en la presente divulgación.

Sin embargo, cuando la secuencia de péptidos es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, pueden inducirse efectos secundarios tales como trastornos autoinmunitarios o síntomas alérgicos contra sustancias específicas. Por tanto, puede ser deseable realizar búsquedas de homología usando bases de datos disponibles para evitar situaciones en las que la secuencia del péptido coincida con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando quede claro a partir de las búsquedas de homología que no existe péptido idéntico o que tenga una 1 o 2 diferencias de aminoácidos con respecto al péptido objetivo en la naturaleza, el péptido objetivo puede modificarse con el fin de aumentar su afinidad de unión con antígenos HLA, y/o aumentar su inducibilidad de CTL sin peligro alguno de tales efectos secundarios.

Aunque se espera que los péptidos que tienen alta afinidad de unión a los antígenos HLA como se ha descrito anteriormente sean altamente eficaces, se examinan adicionalmente los péptidos candidatos, que se seleccionan según la presencia de afinidad de unión alta como un indicador, para la presencia de inducibilidad de CTL. En el presente documento, la expresión "inducibilidad de CTL" indica la capacidad de un péptido para inducir un CTL cuando se presenta en una célula presentadora de antígeno (APC). Además, la "inducibilidad de CTL" incluye la capacidad de un péptido para inducir la activación de CTL, proliferación de CTL, promover la lisis de células diana por CTL y aumentar la producción de IFN-gamma por CTL.

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

Como resultado de examinar la inducibilidad de CTL de los péptidos como se ha descrito anteriormente, se descubrió que los nonapéptidos y decapéptidos seleccionados de entre aquellos péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos indicada por SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120 mostraron inducibilidad de CTL, además de afinidad de unión alta a un antígeno HLA.

Además, el resultado del análisis de homología demostró que tales péptidos no comparten homología significativa con péptidos derivados de cualquier otro producto de gen humano. Esto reduce la posibilidad de respuestas

inmunitarias no conocidas o no deseadas cuando se usan para inmunoterapia. Por tanto, también desde este aspecto, estos péptidos son útiles para provocar inmunidad contra MPHOSPH1 en pacientes con cáncer. Así, el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 está englobado por la presente invención.

5 Además de las modificaciones anteriormente descritas, el péptido de la presente invención puede unirse a otros péptidos, siempre que el péptido unido resultante retenga la inducibilidad de CTL del péptido original. Ejemplos de "otros" péptidos adecuados incluyen: el péptido de la presente invención o péptidos inducibles por CTL derivados de otros TAA. El péptido de la presente invención puede unirse a "otro" péptido directamente o indirectamente mediante un conector. Los conectores entre los péptidos son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Suttmuller et al., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) o K (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715).

10 Por ejemplo, también pueden usarse péptidos derivados de antígenos asociados a tumores no de MPHOSPH1 para aumentar la respuesta inmunitaria mediante la clase I y/o clase II de HLA. Es muy conocido en la técnica que células cancerosas expresan más de un gen asociado a tumor. Han sido aislados algunos péptidos inducibles por CTL derivados de tales TAA (por ejemplo, documentos WO2008/047473, WO2010/047062, WO2008/102557, WO2009/025116). Por consiguiente, ejemplos de "otros" péptidos que están asociados al péptido de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, péptidos inducibles por CTL derivados de TAA distintos de MPHOSPH1. En la presente invención, "otros" péptidos pueden no ser solo péptidos restringidos por la clase I de MHC, sino también péptido restringido por la clase II de MHC. Un experto habitual en la materia puede preparar polipéptidos que incluyen uno o más péptidos MPHOSPH1 y uno o más de los péptidos no de MPHOSPH1, o ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos, usando procedimientos de biología molecular convencionales.

15 Los péptidos unidos anteriormente descritos se denominan en el presente documento "politopes", es decir, grupos de dos o más péptidos estimulantes posiblemente inmunogénicos o de respuesta inmunitaria que pueden unirse juntos en diversas disposiciones (por ejemplo, concatenados, solapados). El politope (o ácido nucleico que codifica el politope) puede administrarse según protocolos de inmunización estándar, por ejemplo, a animales, para probar la eficacia del politope en estimular, potenciar y/o provocar una respuesta inmunitaria.

20 Los péptidos pueden unirse juntos directamente o a través del uso de secuencias flanqueantes para formar politopes, y el uso de politopes como vacunas es muy conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990). Pueden prepararse politopes que contienen diversos números y combinaciones de epítopes y probarse para el reconocimiento por CTL y para la eficacia en aumentar una respuesta inmunitaria.

25 Los péptidos de la presente invención pueden unirse además a otras sustancias, siempre que retengan la inducibilidad de CTL. Ejemplos ilustrativos de tales "otras" sustancias incluyen, pero no se limitan a: péptidos, lípidos, azúcar y cadenas de azúcar, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glucosilación, oxidación de cadenas laterales o fosforilación, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos como se describe en el presente documento. Estos tipos de modificaciones pueden realizarse para conferir funciones adicionales (por ejemplo, función de dirección y función de administración) o para estabilizar el polipéptido.

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

35 Cuando los péptidos de la presente invención incluyen un resto de cisteína, los péptidos tienden a formar dímeros mediante un enlace disulfuro entre grupos SH de los restos de cisteína.

Por tanto, los dímeros de los péptidos de la presente invención también están incluidos en los péptidos de la presente invención.

40 Además, como se observa anteriormente, entre los péptidos modificados que están sustituidos, delecionados, insertados y/o añadidos por uno, dos o varios restos de aminoácidos, pueden cribarse o seleccionar aquellos que tienen la misma actividad o más alta en comparación con los péptidos originales. La presente invención, por tanto, también proporciona el método de cribado o selección de péptidos modificados que tienen la misma actividad o más alta, en comparación con las originales. Por ejemplo, el método ilustrativo puede incluir las etapas de:

45 a: modificar (es decir, sustituir, deleccionar, insertar o añadir) al menos un resto de aminoácido de un péptido de la presente invención,

50 b: determinar la actividad del péptido modificado en la etapa (a), y

c: seleccionar el péptido que tenga la misma actividad o más alta en comparación con el péptido original.

En el presente documento, la actividad puede incluir actividad de unión a MHC e inducibilidad de APC o CTL. Preferentemente, la actividad del péptido es inducibilidad de CTL.

III. Preparación de péptidos MPHOSPH1

- 5 Los péptidos de la presente invención pueden prepararse usando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, los péptidos de la presente invención pueden prepararse sintéticamente, por tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse individualmente o como polipéptidos más largos que incluyen dos o más péptidos. Los péptidos pueden aislarse, es decir, purificarse o aislarse sustancialmente libres de otras proteínas de célula hospedadora que existen de forma natural y fragmentos de las mismas, o cualquier otra sustancia química.
- 10 Los péptidos de la presente invención pueden contener modificaciones, tales como glucosilación, oxidación de cadena lateral o fosforilación, siempre que tales modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos originales. Otras modificaciones ilustrativas incluyen incorporación de D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácidos que pueden usarse, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero de los péptidos.
- 15 Un péptido de la presente invención puede obtenerse mediante síntesis química basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Por ejemplo, métodos de síntesis de péptidos convencionales que pueden ser adoptados para la síntesis incluyen:
- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
 - (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;
 - (iii) Peptide Synthesis (en japonés), Maruzen Co., 1975;
 - 20 (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (en japonés), Maruzen Co., 1985;
 - (v) Development of Pharmaceuticals (segundo volumen) (en japonés), Vol. 14 (síntesis de péptidos), Hirokawa, 1991;
 - (vi) Documento WO99/67288; y
 - (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118.
- 25

Alternativamente, los péptidos de la presente invención pueden obtenerse adoptando cualquier método de ingeniería genética conocido para producir péptidos (por ejemplo, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.,) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, primero, se prepara un vector adecuado que alberga un polinucleótido que codifica el péptido objetivo en una forma expresable (por ejemplo, en la dirección 3' de una secuencia reguladora que se corresponde con una secuencia promotora) y se transforma en una célula hospedadora adecuada. Tales vectores y células hospedadoras también se proporcionan por la presente invención. La célula hospedadora se cultiva entonces para producir el péptido de interés. El péptido también puede producirse *in vitro* adoptando un sistema de traducción *in vitro*.

30

IV. Polinucleótidos

35 La presente invención proporciona un polinucleótido que codifica el péptido anteriormente mencionado de la presente invención. El polinucleótido de la presente invención puede incluir un polinucleótido derivado del gen MPHOSPH1 que se produce naturalmente (por ejemplo, N° de acceso de GenBank NM_001031702 (SEQ ID NO: 125)) o aquellos que tienen una secuencia de nucleótidos conservativamente modificada de los mismos. En el presente documento, la expresión "secuencia de nucleótidos conservativamente modificada" se refiere a secuencias que codifican secuencias de aminoácido idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Así, en cada posición en donde una alanina sea especificada por un codón, el codón puede ser alterado a cualquier de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico, denominadas en la materia "variaciones silenciosas", representan una especie de variante conservativamente modificada. Cada secuencia de ácidos nucleicos descrita en el presente documento como que codifica un péptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que puede modificarse cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que generalmente es el único codón para metionina, y TGG, que generalmente es el único codón para triptófano) para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada secuencia de nucleótidos que codifica péptidos desvelada representa una divulgación implícita de las variaciones silenciosas asociadas a ella.

40

45

50

El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto de ADN, ARN y derivados de los mismos. Como es muy conocido en la técnica, una molécula de ADN está adecuadamente compuesta de bases tales como las

bases que existen de forma natural A, T, C y G, y T se sustituye por U en un ARN. Un experto en la materia reconocerá que en los polinucleótidos también están incluidas bases que no existen de forma natural.

El polinucleótido de la presente invención puede codificar múltiples péptidos de la presente invención con o sin secuencias de aminoácidos intermedias. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos intermedia puede proporcionar un sitio de escisión (por ejemplo, secuencia de reconocimiento de enzimas) del polinucleótido o los péptidos traducidos. Además, el polinucleótido de la presente invención puede incluir cualquier secuencia adicional a la secuencia codificante que codifica el péptido de la presente invención. Por ejemplo, el polinucleótido de la presente invención puede ser un polinucleótido recombinante que incluye secuencias reguladoras requeridas para la expresión del péptido o puede ser un vector de expresión (plásmido) con genes marcadores y similares. En general, tales polinucleótidos recombinantes pueden prepararse por la manipulación de polinucleótidos a través de técnicas recombinantes convencionales usando, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

Pueden usarse tanto técnicas de síntesis recombinante como química para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, el polinucleótido de la presente invención puede producirse por inserción del polinucleótido que tiene la secuencia codificante del péptido de la presente invención en un vector apropiado, que puede expresarse cuando se transfecta en una célula competente. Alternativamente, el polinucleótido de la presente invención puede amplificarse usando técnicas de PCR o replicarse en un hospedador adecuado (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989). Alternativamente, el polinucleótido de la presente invención puede sintetizarse usando las técnicas en fase sólida, como se describen en Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3:801-5.

V. Exosomas

La presente invención proporciona además vesículas intracelulares, llamadas, exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de la presente invención y antígenos HLA en su superficie. Los exosomas pueden prepararse, por ejemplo, usando los métodos detallados en las publicaciones Kohyo de solicitud de patente japonesa N.º Hei 11-510507 y el documento WO99/03499, y pueden prepararse usando las APC obtenidas de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención. Los exosomas de la presente invención pueden inocularse como vacunas, similarmente a los péptidos de la presente invención.

El tipo de antígenos HLA incluidos en los complejos debe coincidir con el del sujeto que requiere el tratamiento y/o la prevención. Por ejemplo, para los japoneses, HLA-A2, particularmente HLA-A*0201 y HLA-A*0206, son frecuentemente apropiados. El uso del tipo HLA-A2, que se expresa altamente entre los japoneses y caucásicos, es favorable para obtener resultados eficaces, y encuentran uso subtipos tales como HLA-A*0201 y HLA-A*0206. Normalmente, en la clínica, el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento se investiga por adelantado, lo cual permite la selección apropiada de péptidos que tienen altos niveles de afinidad de unión por este antígeno, o que tienen inducibilidad de CTL por presentación de antígenos. Además, con el fin de obtener péptidos que muestran afinidad de unión alta e inducibilidad de CTL, pueden realizarse sustitución, delección o adición de 1, 2, o varios aminoácidos, basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido parcial MPHOSPH1 que existe de forma natural.

Cuando se usa el antígeno HLA de tipo HLA-A2 para los exosomas de la presente invención, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120 tienen utilidad particular. En algunas realizaciones, los exosomas de la presente invención son exosomas que presentan un complejo del péptido de la presente invención y antígeno HLA-A2 sobre su superficie. Ejemplos típicos del antígeno HLA-A2 contenido en tales complejos incluyen, pero no se limitan a, HLA-A*0201 y HLA-A*0206.

VI. Células presentadoras de antígeno (APC)

La presente invención también proporciona APC aisladas que presentan complejos formados con antígenos HLA y péptidos de la presente invención en su superficie. Las APC pueden derivar de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención, y pueden administrarse como vacunas por sí mismas o en combinación con otros fármacos que incluyen los péptidos, exosomas o CTL de la presente invención.

Las APC no se limitan a un tipo particular de células e incluyen células dendríticas (DC), células de Langerhans, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T activados, que son conocidas por presentar antígenos proteínicos en su superficie celular de manera que sean reconocidos por los linfocitos. Como las DC son APC representativas que tienen la actividad de inducción de CTL más fuerte de entre las APC, las DC son adecuadas para las APC de la presente invención.

Por ejemplo, las APC de la presente invención pueden obtenerse induciendo DC de monocitos de sangre periférica y entonces poniéndolas en contacto (estimulándolas) con los péptidos de la presente invención *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Cuando los péptidos de la presente invención se administran a un sujeto, las APC que presentan los péptidos de la presente invención se inducen en el cuerpo del sujeto. Por tanto, las APC de la presente invención pueden obtenerse recolectando las APC del sujeto después de administrar los péptidos de la presente invención al sujeto.

Alternativamente, las APC de la presente invención pueden obtenerse poniendo en contacto las APC recolectadas de un sujeto con el péptido de la presente invención.

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

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

El primer sujeto y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo, o pueden ser individuos diferentes. Las APC obtenidas por la etapa b pueden administrarse como una vacuna para tratar y/o prevenir cáncer, ejemplos del cual incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos.

La presente invención también proporciona un método o proceso de fabricación de una composición farmacéutica para inducir APC, en la que el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según un aspecto de la presente invención, las APC de la presente invención tienen inducibilidad de CTL. En el contexto de las APC, la expresión "que tiene inducibilidad de CTL" se refiere a que muestran mayor inducibilidad de CTL que aquellas APC puestas en contacto no con péptidos. Tales APC que tienen inducibilidad de CTL pueden prepararse por un método que incluye la etapa de transferir un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención a las APC *in vitro*, además del método mencionado anteriormente. Los genes introducidos pueden estar en forma de ADN o ARN. Ejemplos de métodos para la introducción incluyen, sin limitaciones particulares, diversos métodos convencionalmente realizados en este campo, tales como lipofección, electroporación, o puede usarse el método de fosfato de calcio. Más específicamente, puede realizarse como se describe en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161:5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; traducción japonesa publicada de la publicación internacional N.º 2000-509281. Al transferir el gen en las APC, el gen experimenta transcripción, traducción, y similares, en la célula, y entonces la proteína obtenida es procesada por clase I o clase II de MHC, y procede a través de una vía de presentación para presentar péptidos parciales.

En algunas realizaciones, las APC de la presente invención son APC que presentan complejos de antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre su superficie. Ejemplos típicos del antígeno HLA-A2 contenido en tales complejos incluyen, pero no se limitan a, HLA-A*0201 y HLA-A*0206.

VII. Linfocitos T citotóxicos (CTL)

Un CTL inducido contra cualquiera de los péptidos de la presente invención refuerza la respuesta inmunitaria que dirige las células de cáncer *in vivo* y así pueden usarse como vacunas similar a los péptidos. Así, la presente invención proporciona CTL aislados que son específicamente inducidos o activados por cualquiera de los presentes péptidos de la presente invención.

Tales CTL pueden obtenerse (1) administrando el (los) péptido(s) de la presente invención a un sujeto, (2) poniendo en contacto (estimulando) las APC derivadas del sujeto, y células CD8 positivas, o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con el (los) péptido(s) de la presente invención, (3) poniendo en contacto los linfocitos T CD8 positivos o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con las APC o exosomas que presentan un complejo de un antígeno HLA y el péptido en su superficie o (4) introduciendo un polinucleótido que codifica tanto subunidades de receptores de linfocitos T (TCR) como polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR, en el que el TCR puede unirse a un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA-A2 sobre una superficie celular. Tales APC o exosomas que van a usarse en la preparación de CTL pueden prepararse por los métodos descritos anteriormente. Detalles del método de (4) se describen más adelante en la sección "VIII. Receptor de linfocitos T (TCR)".

Los CTL de la presente invención pueden derivarse de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención, y pueden administrarse por sí mismos o en combinación con otros fármacos que incluyen los péptidos, APC o exosomas de la presente invención con el fin de efectos de regulación. Los CTL obtenidos actúan específicamente contra células diana que presentan los péptidos de la presente invención, por ejemplo, los mismos péptidos usados para la inducción. Las células diana pueden ser células que expresan endógenamente MPHOSPH1, tales como células de cáncer, o células que son transfectadas con el gen MPHOSPH1; y células que presentan un péptido de la presente invención en la superficie celular debido a estimulación por el péptido también pueden servir de dianas del ataque por CTL activado.

En algunas realizaciones, los CTL de la presente invención reconocen células que presentan complejos de antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención. En el contexto del CTL, la expresión "reconocen una célula" se refiere a la unión de un complejo de antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre la superficie celular mediante su TCR y que muestra actividad citotóxica específica contra la célula. En el presente documento, "actividad citotóxica específica" se refiere a que muestra actividad citotóxica contra la célula que presenta un complejo de antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención, pero no otras células. Ejemplos típicos del antígeno HLA-A2 contenido en tal complejo incluyen, pero no se limitan a, HLA-A*0201 y HLA-A*0206.

VIII. Receptor de linfocitos T (TCR):

La presente invención también proporciona composiciones que incluyen un polinucleótido que codifica ambos de subunidades de TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR, en las que el TCR puede unirse a un complejo de antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre una superficie celular, y métodos de uso de las mismas. Tales subunidades de TCR tienen la capacidad de formar TCR que confieren especificidad a linfocitos T contra células tumorales que expresan MPHOSPH1. Usando los métodos conocidos en la materia, pueden identificarse los polinucleótidos que codifican cada una de las cadenas alfa y beta del TCR del CTL inducido con el péptido de la presente invención (documento WO2007/032255 y Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Por ejemplo, puede usarse preferentemente el método de PCR. Los cebadores de PCR para el análisis pueden ser, por ejemplo, cebador 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgctcat-3') (SEQ ID NO: 127) como cebador del lado 5' y cebador 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID NO: 128) específico para la región C de la cadena alfa de TCR, cebador 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (SEQ ID NO: 129) específico para la región C1 de la cadena beta de TCR o cebador 3-TRbeta-C2 (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3') (SEQ ID NO: 130) específico para la región C2 de la cadena beta de TCR como cebadores del lado 3', pero no se limita a éstos. Los TCR derivados pueden unirse a células diana que presentan el péptido de la presente invención con alta avidéz, y opcionalmente median en la eficiente destrucción de células diana que presentan el péptido de la presente invención *in vivo* e *in vitro*.

El polinucleótido que codifica ambos de las subunidades de TCR o polinucleótidos que codifican cada uno las subunidades de TCR puede incorporarse en vectores adecuados, por ejemplo, vectores retrovirales. Estos vectores son muy conocidos en la técnica. Los polinucleótidos o los vectores que los incluyen pueden transferirse útilmente a un linfocito T (por ejemplo, linfocito T CD8 positivo), por ejemplo, un linfocito T de un paciente. Ventajosamente, la presente invención proporciona una composición disponible para venta que permite la rápida modificación de los propios linfocitos T de un paciente (o aquellos de otro mamífero) para producir rápidamente y fácilmente linfocitos T modificados que tienen excelentes propiedades de destrucción de células cancerosas.

TCR específicos contra los péptidos de la presente invención deben ser capaces de reconocer específicamente un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA, dando una actividad de linfocitos T específica contra una célula diana que presenta un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA cuando el TCR se presenta sobre la superficie del linfocito T. La actividad requerida puede confirmarse por cualquier método conocido de tal forma que los CTL preparados introduciendo el (los) polipéptido(s) que codifica(n) tales subunidades de TCR puedan reconocer específicamente tales células diana. Ejemplos preferidos de tales métodos incluyen, por ejemplo, análisis de tinción de multímero de HLA usando moléculas de HLA y los péptidos de la presente invención, y ensayo de ELISPOT. Realizando el ensayo de ELISPOT, puede confirmarse que los CTL preparados por los métodos anteriores pueden reconocer específicamente las células diana, y que señales generadas por tal reconocimiento pueden transmitirse intracelularmente. Además, también puede confirmarse por métodos conocidos que los CTL preparados por los métodos anteriores tienen actividad citotóxica específica contra las células diana. Ejemplos de tales métodos incluyen, por ejemplo, ensayo de liberación de Cr usando células que expresan ambos del antígeno HLA-A2 y MPHOSPH1.

En un aspecto, la presente invención proporciona CTL que se preparan por transducción con el polinucleótido que codifica ambos de las subunidades de TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR, en el que el TCR puede unirse a un complejo del péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 y antígeno HLA-A2 sobre una superficie celular.

Los CTL transducidos son capaces de albergar células cancerosas *in vivo*, y pueden expandirse por métodos de cultivo muy conocidos *in vitro* (por ejemplo, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Los CTL de la presente invención pueden usarse para formar una composición inmunogénica útil en cualquiera o ambos del tratamiento y la prevención del cáncer en un paciente en necesidad de terapia o protección (documento WO2006/031221).

IX. Composiciones farmacéuticas:

Como la expresión de MPHOSPH1 es específicamente elevada en cáncer, ejemplos del mismo incluyen, pero no se limitan necesariamente a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos, en comparación con tejidos normales, los péptidos o polinucleótidos de la presente invención pueden usarse para cualquiera o ambos del tratamiento y la profilaxis del cáncer. Así, la presente invención proporciona un agente farmacéutico o composición formulada para cualquiera o ambos del tratamiento y la profilaxis

del cáncer, incluyendo tal agente o composición uno o más péptidos, o polinucleótidos de la presente invención como principios activos. Alternativamente, cualquiera de los exosomas o APC anteriores que presentan un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA puede usarse como principios activos para agentes farmacéuticos o composiciones. Además, los CTL anteriormente mencionados que pueden reconocer una célula que presenta un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA también pueden usarse como principios activos para agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención.

5 Por consiguiente, la presente invención proporciona agentes o composiciones que incluyen al menos un principio activo seleccionado de entre:

(a) el péptido de la presente invención;

10 (b) el polinucleótido que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;

(c) una o más APC o exosomas de la presente invención; y

(d) uno o más CTL de la presente invención.

15 Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención encuentran uso como una vacuna. En el contexto de la presente invención, la expresión "vacuna" (también denominada una composición inmunogénica) se refiere a una composición que tiene la función de mejorar, potenciar y/o inducir inmunidad antitumoral tras la inoculación en animales. En otras palabras, la presente invención proporciona los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención para inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto.

20 Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden usarse para cualquiera o ambos del tratamiento y la prevención del cáncer en un sujeto. Ejemplos de tales sujetos a los que los agentes farmacéuticos o composiciones pueden aplicarse incluyen seres humanos, además de otro mamífero que incluye, pero no se limita a, ratón, rata, cobaya, conejo, gato, perro, oveja, cabra, cerdo, ganado vacuno, caballo, mono, babuino y chimpancé, particularmente un animal comercialmente importante o un animal domesticado. En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden formularse para la administración a un

25 sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2.

En otra realización, la presente invención también proporciona el uso de un principio activo en la fabricación de un agente farmacéutico o composición formulada para cualquiera o ambos del tratamiento y la prevención del cáncer o tumor, que incluye la reaparición posoperatoria del mismo, tal principio activo seleccionado de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

30 (b) un polinucleótido que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;

(c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y

(d) un linfocito T citotóxico de la presente invención.

35 Alternativamente, la presente invención proporciona además un principio activo para su uso en cualquiera o ambos del tratamiento y la prevención de un cáncer o tumor, tal principio activo seleccionado de entre:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un polinucleótido que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;

(c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y

40 (d) un linfocito T citotóxico de la presente invención.

Alternativamente, la presente invención proporciona además un método o proceso de fabricación de una composición farmacéutica o agente para cualquiera o ambos del tratamiento y la prevención de un cáncer o tumor, en el que el método o proceso incluye la etapa de formular un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable con un principio activo seleccionado de entre:

45 (a) un péptido de la presente invención;

(b) un polinucleótido que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;

(c) una APC o un exosoma de la presente invención; y

(d) un linfocito T citotóxico de la presente invención.

En otra realización, la presente invención también proporciona un método o proceso de fabricación de una composición farmacéutica o agente para cualquiera o ambos del tratamiento y la prevención de un cáncer o tumor, en el que el método o proceso incluye las etapas de mezclar un principio activo con un vehículo farmacéuticamente

- 5 o fisiológicamente aceptable, en el que el principio activo está seleccionado de entre:
- (a) un péptido de la presente invención;
 - (b) un polinucleótido que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;
 - (c) una APC o un exosoma de la presente invención; y
 - 10 (d) un linfocito T citotóxico de la presente invención.

En otra realización, la presente invención también proporciona el método para cualquiera o ambos del tratamiento y la prevención del cáncer o tumor, en el que el método comprende la etapa de administrar a un sujeto al menos un principio activo seleccionado de entre:

- (a) un péptido de la presente invención;
- 15 (b) un polinucleótido que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma de la presente invención; y
- (d) un linfocito T citotóxico de la presente invención.

Según la presente invención, se ha encontrado que péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120 son péptidos de epítipo restringido por HLA-A2 y así sirven de candidatos que pueden inducir la respuesta inmunitaria específica contra el cáncer que expresa HLA-A2 y MPHOSPH1 en un sujeto. Por tanto, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención que incluyen péptidos, con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120, son particularmente aptos para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A2. El ejemplo particularmente preferido es el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 que se confirmó que tenía la capacidad para inducir CTL que se dirigen a células cancerosas que expresan el antígeno HLA-A2 y MPHOSPH1. Por consiguiente, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención incluirán el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120, o incluirán un polinucleótido que codifica tal péptido. Lo mismo se aplica a agentes farmacéuticos o composiciones que incluyen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de la presente invención).

Los cánceres que va a tratarse por los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención incluyen cualquier cáncer en el que se expresa MPHOSPH1 (por ejemplo, se expresa en exceso), ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos.

Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden contener además de los principios activos anteriormente mencionados, tales como otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTL contra células cancerosas, otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, y similares. Ejemplos de tales "otros" péptidos que tienen la capacidad de inducir CTL contra células cancerosas incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos del cáncer (por ejemplo, TAA identificados).

Si es necesario, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como un principio activo adicional, siempre que las sustancias no inhiban el efecto antitumoral del principio de la presente invención (es decir, el péptido, polinucleótido, exosoma, APC, CTL de la presente invención). Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir sustancias antiinflamatorias, analgésicos, quimioterapéuticos y similares. Además de otras sustancias terapéuticas en el propio medicamento, los medicamentos de la presente invención también pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente con uno o varios de los otros agentes farmacológicos o composiciones. Las cantidades de medicamento y agente farmacológico o composición dependen, por ejemplo, de qué tipo de agente(s) farmacológico(s) o composición (composiciones) se use, la enfermedad que esté tratándose, y los programas y vías de administración.

Aquellos expertos en la materia reconocerán fácilmente que, además de los componentes particularmente mencionados en el presente documento, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden incluir otras sustancias convencionales en la técnica que tienen en cuenta el tipo de formulación en cuestión (por ejemplo, cargas, aglutinantes, diluyentes, excipientes, etc.).

En una realización de la presente invención, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden envasarse en artículos de fabricación, por ejemplo, como kits que contienen materiales útiles para tratar las afecciones patológicas de la enfermedad que va a tratarse, por ejemplo, cáncer. El artículo de fabricación puede incluir un recipiente de cualquier de los presentes agentes farmacéuticos o composiciones con una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen frascos, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta en el recipiente debe indicar el agente o composición que se usa para el tratamiento o la prevención de una o más condiciones de la enfermedad. La etiqueta también puede indicar indicaciones para administración, etc.

Además del recipiente descrito anteriormente, un kit que incluye un agente farmacéutico o composición de la presente invención puede incluir opcionalmente un segundo recipiente que alberga un diluyente farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden envasarse, si se desea, en un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El paquete puede incluir, por ejemplo, hoja de metal o de plástico, tal como un envase alveolado. El paquete o dispositivo dispensador pueden ir acompañados de instrucciones para la administración.

(1) Composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos como principio activo

Los péptidos de la presente invención pueden administrarse directamente como un agente farmacéutico o composición, o si fuera necesario, pueden formularse mediante métodos de formulación convencionales. En el último caso, además de los péptidos de la presente invención, pueden incluirse según convenga vehículos, excipientes, y similares que son generalmente usados para fármacos, sin limitaciones particulares. Ejemplos de tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón fosfato, líquido de cultivo y similares. Además, las sustancias farmacéuticas, agentes o composiciones pueden contener, según sea necesario, estabilizadores, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares. Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden usarse para fines contra el cáncer.

Los péptidos de la presente invención pueden prepararse en una combinación que incluye dos o más péptidos de la presente invención, para inducir CTL *in vivo*. Los péptidos pueden estar en una mezcla o pueden conjugarse entre sí usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los péptidos pueden unirse químicamente o expresarse como una secuencia de polipéptidos de fusión simple que puede tener uno o varios aminoácidos como conector (por ejemplo, Lysine linker: K. S. Kawamura et al. J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715). Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes. Al administrar los péptidos de la presente invención, los péptidos son presentados en alta densidad por los antígenos HLA en las APC, entonces se inducen los CTL que reaccionan específicamente hacia el complejo formado entre el péptido presentado y el antígeno HLA. Alternativamente, las APC (por ejemplo, DC) pueden eliminarse de un sujeto y entonces son estimuladas por los péptidos de la presente invención para obtener las APC que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención en su superficie celular. Estas APC pueden volver a ser administradas al sujeto para inducir CTL en los sujetos, y como resultado, puede aumentarse la agresividad hacia el endotelio asociado a tumor.

Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención, que incluyen cualquiera de los péptidos de la presente invención como principios activos, también pueden incluir un adyuvante de manera que se establezca eficazmente inmunidad celular. Alternativamente, el agente farmacéutico o composición de la presente invención puede administrarse con otros principios activos o puede administrarse por la formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a cualquier compuesto, sustancia o composición que potencie la respuesta inmunitaria contra la proteína cuando se administran juntas (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Un adyuvante que puede ser administrado incluye los descritos en la bibliografía (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Adyuvantes a modo de ejemplo incluyen fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina del cólera, toxina de salmonella, adyuvante incompleto de Freund (IFA), adyuvante completo de Freund (CFA), ISCOMatrix, GM-CSF, CpG, emulsión O/W y similares, aunque no se limitan a éstos. Además, pueden usarse convenientemente formulaciones de liposoma, formulaciones granulares en las que el péptido está unido a perlas de pocos micrómetros de diámetro, y formulaciones en las que un lípido se une al péptido.

En otra realización de la presente invención, los péptidos de la presente invención también pueden administrarse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos preferibles de las sales incluyen sales con un metal alcalino, sales con un metal, sales con una base orgánica, sales con una amina, sales con un ácido orgánico (ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, etc.) y sales con un ácido inorgánico (ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, etc.). Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y propiedades del compuesto y que se obtienen mediante reacción con ácidos o bases inorgánicos u orgánicos.

En algunas realizaciones, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención incluyen un componente que sensibiliza a los CTL. Se han identificado lípidos como sustancias capaces de sensibilizar a CTL *in*

vivo contra antígenos virales. Por ejemplo, pueden unirse restos de ácido palmítico a los grupos épsilon- y alfa-amino de un resto de lisina, y entonces unirse a un péptido de la presente invención. El péptido lipidado puede entonces administrarse ya sea directamente en una micela o partícula, incorporarse en un liposoma o emulsionarse en un adyuvante. Como otro ejemplo de sensibilización de lípidos de respuestas de CTL, pueden usarse lipoproteínas de *E. coli*, tal como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS) para sensibilizar CTL cuando se unen covalentemente a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).

Ejemplos de métodos adecuados de administración incluyen, pero no se limitan necesariamente a, vía oral, inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraósea, peritoneal e intravenosa, o similares, y administración sistémica o administración local en los alrededores de los sitios dirigidos (es decir, inyección directa). La administración puede realizarse mediante administración simple o reforzarse por múltiples administraciones. La dosis de péptidos de la presente invención puede ajustarse apropiadamente según la enfermedad que va a tratarse, edad del paciente, peso, método de administración y similares, y generalmente es 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo, 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 10 mg, y puede administrarse una vez en unos cuantos días hasta unos cuantos meses. Un experto en la materia determinará fácilmente dosificaciones adecuadas y óptimas.

(2) Composiciones farmacéuticas que contienen polinucleótidos como principio activo

Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención también puede incluir polinucleótidos que codifican el (los) péptido(s) desvelado(s) en el presente documento en una forma expresable. En el presente documento, la expresión "en una forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando se introduce en una célula, se expresará *in vivo* como un polipéptido que induce inmunidad antitumoral. En una realización ilustrativa, la secuencia de ácidos nucleicos del polinucleótido de interés incluye elementos reguladores necesarios para la expresión del polinucleótido. El (Los) polinucleótido(s) puede(n) equiparse de manear que se logre la inserción estable en el genoma de la célula diana (véase, por ejemplo, Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 para una descripción de los vectores de casete de recombinación homóloga. Véanse, por tanto, por ejemplo, Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; patentes de EE.UU. N.º 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y documento WO 98/04720). Ejemplos de tecnologías de administración basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", administración facilitada (mediada por bupivacaína, polímeros, péptido), complejos de lípido catiónicos y administración mediada por partículas ("pistola de genes") o presión (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.922.687).

Los péptidos de la presente invención también pueden expresarse por vectores virales o bacterianos. Ejemplos de vectores de expresión incluyen hospedadores virales atenuados tales como variolovacuna o viruela aviar. Este enfoque implica el uso de virus de la variolovacuna, por ejemplo, como un vector para expresar secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. Tras la introducción en un hospedador, el virus de la variolovacuna recombinante expresa el péptido inmunogénico, y así provoca una respuesta inmunitaria. Los vectores de la variolovacuna y métodos útiles en protocolos de inmunización se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.722.848. Otro vector es BCG (bacilo de Calmette Guerin). Vectores de BCG se describen en Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60. Serán evidentes una amplia variedad de otros vectores útiles para administración terapéutica o inmunización, por ejemplo, vectores de adenovirus y virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores de *Salmonella typhi*, vectores de toxina del carbunco desintoxicados y similares. Véanse, por ejemplo, Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85.

La administración de un polinucleótido en un paciente puede ser ya sea directa, cuyo caso el paciente se expone directamente a un vector transportador de polinucleótido, o indirecta, en cuyo caso las células se transforman primero con el polinucleótido de interés *in vitro*, entonces las células se trasplantan en el paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapias génica *in vivo* y *ex vivo*.

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

Al igual que la administración de péptidos, la administración de polinucleótidos pueden realizarse por vía oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraósea y/o peritoneal, o similares, y mediante administración sistémica o administración local en los alrededores de los sitios dirigidos. La administración puede realizarse por administración simple o reforzarse mediante múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el vehículo adecuado o las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de la presente invención pueden ajustarse apropiadamente según la enfermedad que va a tratarse, edad del paciente, peso, método de administración y similares, y generalmente es 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 10 mg, y puede administrarse una vez cada unos cuantos días, hasta una vez cada unos cuantos meses. Un experto en la materia puede seleccionar apropiadamente la dosis adecuada.

X. Métodos de uso de péptidos, exosomas, APC y CTL

Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención pueden usarse para preparar o inducir APC y CTL. Los exosomas y APC de la presente invención también pueden usarse para inducir CTL. Los péptidos, polinucleótidos, exosomas y APC pueden usarse en combinación con cualquier otro compuesto, siempre que los compuestos adicionales no inhiban la inducibilidad de CTL. Así, cualquiera de los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden usarse para inducir CTL. Además de esto, los que incluyen los péptidos y polinucleótidos también pueden usarse para inducir APC como se explica más adelante.

(1) Métodos de inducción de células presentadoras de antígeno (APC)

La presente invención proporciona métodos de inducción de APC con inducibilidad de CTL usando péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

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

a: recoger APC de un sujeto; y

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

Las APC no se limitan a un tipo particular de células e incluyen DC, células de Langerhans, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T activados, que son conocidas por presentar antígenos proteínicos en su superficie celular de manera que sean reconocidos por linfocitos. Preferentemente, pueden usarse DC que tienen la inducibilidad de CTL más fuerte entre las APC. Puede usarse un péptido cualquiera de la presente invención por sí mismo o en combinación con otros péptidos de la presente invención o péptidos inducibles por CTL derivados de TAA distintos de MPHOSPH1.

Por otra parte, cuando los péptidos de la presente invención se administran a un sujeto, las APC se ponen en contacto con los péptidos *in vivo*, y, por consiguiente, las APC con inducibilidad de CTL son inducidas en el cuerpo del sujeto. Así, el método de la presente invención incluye administrar los péptidos de la presente invención a un sujeto para inducir APC con inducibilidad de CTL en el cuerpo del sujeto. Similarmente, cuando los polinucleótidos de la presente invención se administran a un sujeto en una forma expresable, los péptidos de la presente invención se expresan y se ponen en contacto con APC *in vivo*, y, por consiguiente, las APC con inducibilidad de CTL se inducen en el cuerpo del sujeto. Así, el método de la presente invención también puede incluir administrar los polinucleótidos de la presente invención a un sujeto para inducir APC con inducibilidad de CTL en el cuerpo del sujeto. La expresión "forma expresable" se describe anteriormente en la sección "IX. Composiciones farmacéuticas, (2) Composiciones farmacéuticas que contienen polinucleótidos como el principio activo".

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

a: recoger las APC de un sujeto;

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

La etapa b puede realizarse como se ha descrito anteriormente en la sección de "VI. Células presentadoras de antígeno".

Alternativamente, la presente invención proporciona un método de preparación de una célula presentadora de antígeno (APC) que induce específicamente la actividad de CTL contra MPHOSPH1, en el que el método puede incluir una de las siguientes etapas:

(a) poner en contacto una APC con un péptido de la presente invención *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*; y

(b) introducir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en una APC.

Alternativamente, la presente invención proporciona métodos de inducción de una APC que tiene inducibilidad de CTL, en la que los métodos incluyen la etapa seleccionada de entre:

(a) poner en contacto una APC con el péptido de la presente invención;

(b) introducir el polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención en una APC.

Los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Preferentemente, los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo *in vitro* o *ex vivo*. Las APC usadas para la inducción de APC que tienen inducibilidad de CTL puede ser preferentemente APC que expresan el antígeno HLA-A2. Tales APC pueden prepararse por los métodos muy conocidos en las técnicas de las células mononucleares de sangre

5 periférica (CMSP) obtenidas de un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Las APC inducidas por el método de la presente invención pueden ser APC que presentan un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA (antígeno HLA-A2) en su superficie. Cuando las APC inducidas por el método de la presente invención se administran a un sujeto con el fin de inducir respuestas inmunitarias contra el cáncer en el sujeto, el sujeto es preferentemente el mismo del que derivaron las APC. Sin embargo, el sujeto puede ser uno diferente del donante de APC mientras que el sujeto tenga el mismo HLA con el donante de APC.

En otra realización, la presente invención proporciona agentes o composiciones para su uso en inducir una APC que tiene inducibilidad de CTL, y tales agentes o composiciones incluyen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

10 En otra realización, la presente invención proporciona el uso del péptido de la presente invención o el polinucleótido que codifica el péptido en la fabricación de un agente o composición formulada para inducir APC.

Alternativamente, la presente invención proporciona además el péptido de la presente invención o el polipéptido que codifica el péptido para su uso en inducir una APC que tiene inducibilidad de CTL.

(2) Métodos de inducción de CTL:

15 La presente invención también proporciona métodos de inducción de CTL usando los péptidos, polinucleótidos, exosomas o APC de la presente invención.

La presente invención también proporciona métodos de inducción de CTL usando un polinucleótido que codifica ambos de subunidades de TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR, en los que el TCR puede reconocer (se une a) un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA presentado sobre una superficie celular. Preferentemente, los métodos de inducción de CTL pueden incluir al menos una etapa seleccionada de entre:

- a) poner en contacto un linfocito T CD8 positivo con una célula presentadora de antígeno y/o un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención; y
- 25 b) introducir un polinucleótido que codifica ambos de subunidades de TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR en un linfocito T CD8 positivo, en los que el TCR puede reconocer (se une a) un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA presentado sobre una superficie celular.

30 Cuando los péptidos, los polinucleótidos, APC o exosomas de la presente invención se administran a un sujeto, los CTL se inducen en el cuerpo del sujeto, y se potencia la respuesta inmunitaria que se dirige a las células cancerosas que expresan MPHOSPH1. Así, los métodos de la presente invención pueden incluir la etapa de administrar los péptidos, los polinucleótidos, las APC o exosomas de la presente invención a un sujeto.

Alternativamente, los CTL también pueden ser inducidos usándolos *ex vivo* o *in vitro*, y después de inducir los CTL, los CTL activados pueden ser devueltos al sujeto. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

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

40 Las APC que van a co-cultivarse con las células T CD8 positivas en la etapa c anterior también se pueden prepararse transfiriendo un polinucleótido de la presente invención en APC como se ha descrito anteriormente en la sección "VI. Células presentadoras de antígeno", aunque la presente invención no se limita a esto, y, por tanto, engloba cualquier APC que presente eficazmente sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención.

45 Opcionalmente pueden utilizarse exosomas que presentan en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención en lugar de las APC anteriormente mencionadas. Concretamente, la presente invención puede incluir la etapa de co-cultivar exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención. Tales exosomas pueden prepararse por los métodos descritos anteriormente en la sección "V. Exosomas".

Las APC o exosomas usados para la inducción de CTL pueden ser preferentemente APC o exosomas que presentan sobre su superficie un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA-A2.

50 Además, puede inducirse un CTL introduciendo un polinucleótido que codifica ambos de las subunidades de TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR en un linfocito T CD8 positivo, en los que el TCR puede unirse a un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA presentado sobre una superficie celular. Tal transducción puede realizarse como se ha descrito anteriormente en la sección "VIII. Receptor de linfocitos T (TCR)".

Los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Preferentemente, los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo *in vitro* o *ex vivo*. Pueden prepararse linfocitos T CD8 positivos usados para la inducción de CTL por métodos muy conocidos en la materia a partir de CMSP obtenidas de un sujeto. En realizaciones preferidas, un donante para linfocitos T CD8 positivos puede ser un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Los CTL inducidos por los métodos de la presente invención pueden ser CTL que pueden reconocer células que presentan un complejo del péptido de la presente invención y un antígeno HLA sobre su superficie. Cuando los CTL inducidos por el método de la presente invención se administran a un sujeto con el fin de inducir respuestas inmunitarias contra el cáncer en el sujeto, el sujeto es preferentemente el mismo del que derivan los linfocitos T CD8. Sin embargo, el sujeto puede ser uno diferente del donante de linfocitos T CD8 positivo mientras que el sujeto tenga el mismo tipo de HLA con el donante de linfocitos T CD8 positivos.

Además, la presente invención proporciona un método o proceso para la fabricación de un agente farmacéutico o composición para inducir CTL, en el que el método o proceso incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la presente invención proporciona un agente o composición para inducir CTL, en la que el agente o composición comprende uno o más péptidos, uno o más polinucleótidos, o una o más APC o exosomas de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona el uso del péptido, polinucleótido, o APC o exosoma de la presente invención en la fabricación de un agente o composición formulada para inducir un CTL.

Alternativamente, la presente invención proporciona además el péptido, polinucleótido, o APC o exosoma de la presente invención para su uso en inducir un CTL.

(3) Métodos de inducción de la respuesta inmunitaria

Además, la presente invención proporciona métodos de inducción de una respuesta inmunitaria contra enfermedades relacionadas con MPHOSPH1. Enfermedades contempladas incluyen cáncer, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos.

Los métodos de la presente invención pueden incluir la etapa de administrar a un sujeto agente(s) o composición (composiciones) que contienen cualquiera de los péptidos de la presente invención o polinucleótidos que los codifican. El método de la presente invención puede también contemplar la administración de exosomas o APC que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención. Para detalles, véase el punto de "IX. Composiciones farmacéuticas", particularmente la parte que describe el uso de los agentes farmacéuticos y las composiciones de la presente invención como vacunas. Además, los exosomas y APC que pueden emplearse para los presentes métodos de inducción de respuesta inmunitaria se describen en detalle en los puntos de "V. Exosomas", "VI. Células presentadoras de antígeno (APC)", y (1) y (2) de "X. Métodos usando péptidos, exosomas, APC y CTL", arriba.

En realizaciones preferidas, los sujetos tratados por el método de la presente invención pueden ser sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A2.

La presente invención también proporciona un método o proceso de fabricación de un agente farmacéutico o composición que induce respuesta inmunitaria, en la que el método puede incluir la etapa de mezclar o formular un polipéptido o polinucleótido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, el método de la presente invención puede incluir la etapa de administrar una vacuna o una composición farmacéutica de la presente invención que contiene:

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un ácido nucleico (polinucleótido) que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; o
- (d) un CTL de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, un cáncer que expresa MPHOSPH1 puede tratarse con estos principios activos. Ejemplos de tal cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos. Por consiguiente, antes de la administración de las vacunas o composiciones farmacéuticas que incluyen los principios activos, es preferible confirmar si el nivel de expresión de MPHOSPH1 en las células o tejidos que va a tratarse se potencia en comparación con células normales del mismo órgano. Así, en una realización, la presente invención proporciona un método de tratamiento del cáncer que expresa MPHOSPH1, método que puede incluir las etapas de:

i) determinar el nivel de expresión de MPHOSPH1 en células o tejido(s) obtenidos de un sujeto con el cáncer que va a tratarse;

ii) comparar el nivel de expresión de MPHOSPH1 con control normal; y

5 iii) administrar al menos un componente seleccionado de entre las etapas (a) a (d) descritas anteriormente a un sujeto con cáncer que expresan en exceso MPHOSPH1 en comparación con el control normal.

10 Alternativamente, la presente invención también proporciona una vacuna o composición farmacéutica que incluye al menos un componente seleccionado de entre (a) a (d) descrito anteriormente, para su uso en administrar a un sujeto que tiene cáncer que expresa en exceso MPHOSPH1. En otras palabras, la presente invención proporciona además un método de identificación de un sujeto que va a tratarse con el polipéptido MPHOSPH1 de la presente invención, incluyendo tal método la etapa de determinar un nivel de expresión de MPHOSPH1 en células derivadas de sujeto o tejido(s), en la que un aumento del nivel en comparación con un nivel de control normal del gen indica que el sujeto puede tener cáncer que puede tratarse con el polipéptido MPHOSPH1 de la presente invención. El método de identificación de un sujeto que va a tratarse con cáncer de la presente invención se describe más abajo en más detalle.

15 Cualquier célula o tejido derivado de sujeto puede usarse para la determinación de la expresión de MPHOSPH1 mientras que incluye el producto de transcripción o traducción objetivo de MPHOSPH1. Ejemplos de muestras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, tejidos y fluidos corporales, tales como sangre, esputo y orina. Preferentemente, la muestra de células o tisular derivada del sujeto contiene una población de células que incluye una célula epitelial, más preferentemente una célula epitelial cancerosa o una célula epitelial derivada de tejido que se sospecha que es canceroso. Además, si fuera necesario, la célula puede purificarse a partir de los tejidos y fluidos corporales obtenidos, y entonces se usa como la muestra derivada de sujeto.

20 Un sujeto que va a tratarse por el presente método es preferentemente un mamífero. Mamíferos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ser humano, primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo y vaca.

25 Según la presente invención, puede determinarse el nivel de expresión de MPHOSPH1 en células o tejidos obtenidos de un sujeto. El nivel de expresión puede determinarse al nivel de productos de transcripción (ácido nucleico), usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARNm de MPHOSPH1 puede cuantificarse usando sondas por métodos de hibridación (por ejemplo, hibridación Northern). La detección puede llevarse a cabo sobre un chip, una matriz, o similar. El uso de una matriz puede ser preferible para detectar el nivel de expresión de MPHOSPH1. Aquellos expertos en la materia pueden preparar tales sondas utilizando la información de secuencias de MPHOSPH1. Por ejemplo, puede usarse el ADNc de MPHOSPH1 como sondas. Si fuera necesario, las sondas pueden marcarse con una marca adecuada, tal como colorantes, sustancias fluorescentes e isótopos, y el nivel de expresión del gen puede detectarse como la intensidad de las marcas hibridadas.

35 Además, el producto de transcripción de MPHOSPH1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 125) puede cuantificarse usando cebadores por métodos de detección basados en amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Tales cebadores pueden prepararse basándose en la información de secuencia disponible del gen. Específicamente, una sonda o cebador usado para el presente método se hibrida bajo condiciones rigurosas, moderadamente rigurosas o de baja rigurosidad para el ARNm de MPHOSPH1. Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones (de hibridación) rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda o cebador se hibridará con su secuencia diana, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes bajo diferentes circunstancias. Se observa hibridación específica de secuencias más largas a temperaturas más altas que las secuencias más cortas. Generalmente, la temperatura de una condición rigurosa se selecciona para ser aproximadamente 5 °C más baja que el punto de fusión térmico (T_m) para una secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias a su secuencia diana se hibridan con la secuencia objetivo en equilibrio. Como las secuencias diana generalmente están presentes en exceso, a T_m, el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio. Normalmente, condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sales es inferior a ión de sodio aproximadamente 1,0 M, normalmente ión de sodio aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para sondas o cebadores cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas o cebadores más largos. También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de sustancias desestabilizantes, tales como formamida.

45 Una sonda o cebador de la presente invención normalmente es un oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido normalmente incluye una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 o 25, la secuencia de nucleótidos de hebra codificante consecutiva de un ácido nucleico que incluye MPHOSPH1, o una secuencia de nucleótidos de hebra no codificante de un ácido nucleico que incluye MPHOSPH1, o de un mutante que existe de forma natural de estas secuencias. En particular, por ejemplo, en una realización preferida, puede usarse un oligonucleótido que tiene 5-50 de longitud como cebador para amplificar los genes, que va a detectarse. Más preferentemente, el ARNm o ADNc de un gen MPHOSPH1 puede detectarse con sonda de oligonucleótidos o

cebador de un tamaño específico, generalmente 15-30 b de longitud. El tamaño puede oscilar de al menos 10 nucleótidos, al menos 12 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos y las sondas y cebadores pueden oscilar en tamaño de 5-10 nucleótidos, 10-15 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-25 nucleótidos y 25-30 nucleótidos. En realizaciones preferidas, la longitud de la sonda de oligonucleótidos o cebador puede seleccionarse de 15-25. Procedimientos de ensayo, dispositivos o reactivos para la detección del gen usando tal sonda de oligonucleótidos o cebador son muy conocidos (por ejemplo, micromatriz de oligonucleótidos o PCR). En estos ensayos, sondas o cebadores también pueden incluir secuencias de marca o conectoras. Además, pueden modificarse sondas o cebadores con marca detectable o ligando de afinidad que va a capturar. Alternativamente, en los procedimientos de detección basados en hibridación, también puede usarse un polinucleótido que tiene algunos centenares de bases (por ejemplo, aproximadamente 100-200) a algunos millares de bases (por ejemplo, aproximadamente 1000-2000) de longitud para una sonda (por ejemplo, ensayo de transferencia Northern o análisis de micromatrices de ADNc).

Alternativamente, el producto de traducción puede ser detectado para el diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, puede determinarse la cantidad de proteína MPHOSPH1 (SEQ ID NO: 126) o el fragmento inmunológico de la misma. Métodos de determinación de la cantidad de proteína como el producto de traducción incluyen métodos de inmunoensayo que usan un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Además, puede usarse cualquier fragmento o modificación (por ejemplo, anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo para la detección, siempre que el fragmento o anticuerpo modificado retenga la capacidad de unión a la proteína MPHOSPH1. También se proporcionan tales anticuerpos contra los péptidos de la presente invención y los fragmentos de los mismos en la presente invención. Métodos de preparación de estos tipos de anticuerpos para la detección de proteínas son bien conocidos en la técnica, y puede emplearse cualquier método en la presente invención para preparar tales anticuerpos y equivalentes de los mismos.

Como otro método de detección del nivel de expresión del gen MPHOSPH1 basado en su producto de traducción, puede medirse la intensidad de tinción mediante análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo contra la proteína MPHOSPH1. Concretamente, en esta medición, tinción fuerte indica la presencia/nivel elevado de la proteína, y al mismo tiempo, alto nivel de expresión del gen MPHOSPH1.

Puede determinarse si el nivel de expresión de un gen diana, por ejemplo, el gen MPHOSPH1, en células de cáncer es elevado si el nivel aumenta a partir del nivel de control (por ejemplo, el nivel en células normales) del gen diana, por ejemplo, 10 %, 25 %, o 50 %; o aumenta a más de 1,1 veces, más de 1,5 veces, más de 2,0 veces, más de 5,0 veces, más de 10,0 veces, o más.

El nivel de control puede determinarse al mismo tiempo que las células de cáncer usando una muestra(s) previamente recolectada(s) y almacenada(s) en un sujeto(s) cuyo estado(s) de enfermedad (canceroso o no canceroso) es/son conocidos. Además, pueden usarse células normales obtenidas de regiones no cancerosas de un órgano que tiene el cáncer que va a tratarse como el control normal. Alternativamente, puede determinarse el nivel de control por un método estadístico basado en los resultados obtenidos analizando nivel(es) de expresión previamente determinado(s) del gen MPHOSPH1 en muestras de sujetos cuyos estados de enfermedad son conocidos. Además, el nivel de control puede derivarse de una base de datos de patrones de expresión de células previamente probadas. Además, según un aspecto de la presente invención, puede compararse el nivel de expresión del gen MPHOSPH1 en una muestra biológica con los niveles de control múltiples determinados a partir de muestras de referencia múltiples. Se prefiere usar un nivel de control determinado de una muestra de referencia derivada de un tipo de tejido similar al de la muestra biológica derivada del sujeto. Además, se prefiere usar el valor estándar de los niveles de expresión del gen MPHOSPH1 en una población con un estado de enfermedad conocido. El valor estándar puede obtenerse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un intervalo de media +/- 2 D.E. o media +/- 3 D.E. como valor estándar.

En el contexto de la presente invención, un nivel de control determinado de una muestra biológica que se sabe que no es cancerosa se denomina un "nivel de control normal". Por otra parte, si el nivel de control se determina a partir de una muestra biológica cancerosa, se denomina un "nivel de control canceroso". La diferencia entre un nivel de expresión de muestra y un nivel de control puede normalizarse al nivel de expresión de ácidos nucleicos de control, por ejemplo, genes de mantenimiento, cuyos niveles de expresión son conocidos por no diferenciarse dependiendo del estado canceroso o no canceroso de la célula. Genes de control a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, beta-actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y proteína P1 ribosómica.

Cuando el nivel de expresión del gen MPHOSPH1 aumenta en comparación con el nivel de control normal, o es similar/equivalente al nivel de control canceroso, el sujeto puede ser diagnosticado con el cáncer que va a tratarse.

La presente divulgación también se refiere a un método de (i) diagnosticar si un sujeto del que se sospecha que tiene el cáncer que va a tratarse y/o (ii) seleccionar un sujeto para tratamiento del cáncer, método que puede incluir las etapas de:

- a) determinar el nivel de expresión de MPHOSPH1 en células o tejido(s) obtenidos de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que va a tratarse;

- b) comparar el nivel de expresión de MPHOSPH1 con un nivel de control normal;
- c) diagnosticar al sujeto como que tiene el cáncer que va a tratarse, si el nivel de expresión de MPHOSPH1 aumenta en comparación con el nivel de control normal; y
- d) seleccionar al sujeto para el tratamiento del cáncer, si el sujeto es diagnosticado como que tiene el cáncer que va a tratarse, en la etapa c).

Alternativamente, un método tal puede incluir las etapas de:

- a) determinar el nivel de expresión de MPHOSPH1 en células o tejido(s) obtenidos de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que va a tratarse;
- b) comparar el nivel de expresión de MPHOSPH1 con un nivel de control canceroso;
- c) diagnosticar el sujeto como que tiene el cáncer que va a tratarse, si el nivel de expresión de MPHOSPH1 es similar o equivalente al nivel de control canceroso; y
- d) seleccionar al sujeto para el tratamiento del cáncer, si el sujeto es diagnosticado como que tiene el cáncer que va a tratarse, en la etapa c).

La presente divulgación también se refiere a un kit de diagnóstico para diagnosticar o determinar un sujeto que está o se sospecha de está padeciendo o en riesgo de desarrollar cáncer que puede tratarse con el polipéptido MPHOSPH1 de la presente invención, que puede también encontrar uso en la evaluación y/o monitorización de la eficacia o aplicabilidad de una inmunoterapia contra el cáncer. Preferentemente, el cáncer incluye, pero no se limita a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos. Más particularmente, el kit puede incluir preferentemente al menos un reactivo para detectar la expresión del gen MPHOSPH1 en una célula derivada de sujeto, reactivo que puede seleccionarse del grupo de:

- (a) un reactivo para detectar un ARNm del gen MPHOSPH1;
- (b) un reactivo para detectar la proteína MPHOSPH1 o el fragmento inmunológico del mismo; y
- (c) un reactivo para detectar la actividad biológica de la proteína MPHOSPH1.

Ejemplos de reactivos adecuados para la detección de ARNm del gen MPHOSPH1 pueden incluir ácidos nucleicos que se unen específicamente a o identifican el ARNm de MPHOSPH1, tal como oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a una porción del ARNm de MPHOSPH1. Estos tipos de oligonucleótidos se ejemplifican por cebadores y sondas que son específicos para el ARNm de MPHOSPH1. Estos tipos de oligonucleótidos pueden prepararse basándose en métodos muy conocidos en la técnica. Si es necesario, el reactivo para detectar el ARNm de MPHOSPH1 puede ser inmovilizado en una matriz sólida. Además, puede estar incluido en el kit más de un reactivo para detectar el ARNm de MPHOSPH1.

Por otra parte, ejemplos de reactivos adecuados para la detección de la proteína MPHOSPH1 o el fragmento inmunológico de la misma pueden incluir anticuerpos para la proteína MPHOSPH1 o el fragmento inmunológico de la misma. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Además, puede usarse cualquier fragmento o modificación (por ejemplo, anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo como el reactivo, siempre que el fragmento o anticuerpo modificado retengan la capacidad de unión a la proteína MPHOSPH1 o el fragmento inmunológico de la misma. Métodos de preparación de estos tipos de anticuerpos para la detección de proteínas son muy conocidos en la técnica, y puede emplearse cualquier método en la presente invención para preparar anticuerpos y equivalentes de los mismos. Además, el anticuerpo puede marcarse con moléculas de generación de señal a través de enlace directo o una técnica de marcado indirecto. Marcas y métodos de marcado de anticuerpos y detección de la unión de los anticuerpos a sus dianas son muy conocidos en la técnica, y puede emplearse cualquier marca y método para la presente invención. Además, puede incluirse en el kit más de un reactivo para detectar la proteína MPHOSPH1.

El kit puede contener más de uno de los reactivos anteriormente mencionados. El kit puede incluir además una matriz sólida y un reactivo para unir una sonda contra un gen MPHOSPH1 o anticuerpo contra un péptido MPHOSPH1, un medio y recipiente para cultivar células, reactivos de control positivo y negativo, y un anticuerpo secundario para detectar un anticuerpo contra un péptido MPHOSPH1. Por ejemplo, las muestras de tejido obtenidas de los sujetos sin cáncer o que padecen cáncer pueden servir de reactivos de control útiles. Un kit de la presente invención puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluye tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos (por ejemplo, por escrito, cinta, CD-ROM, etc.) con instrucciones para uso. Estos reactivos y similares pueden ser retenidos en un recipiente con una etiqueta. Recipientes adecuados pueden incluir botellas, frascos y tubos de ensayo. Los recipientes pueden ser formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

5 Cuando el reactivo es una sonda contra el ARNm de MPHOSPH1, el reactivo puede ser inmovilizado en una matriz sólida, tal como una tira porosa, para formar al menos un sitio de detección. La región de medición o de detección de la tira porosa puede incluir una pluralidad de sitios, conteniendo cada uno un ácido nucleico (sonda). Una tira reactiva también puede contener sitios para controles negativos y/o positivos. Alternativamente, los sitios de control pueden localizarse en una tira separada de la tira reactiva. Opcionalmente, los diferentes sitios de detección pueden contener diferentes cantidades de ácidos nucleicos inmovilizados, es decir, una mayor cantidad en el primer sitio de detección y cantidades menores en sitios posteriores. Tras la adición de una muestra de prueba, el número de sitios que presentan una señal detectable proporciona una indicación cuantitativa de la cantidad de ARNm de MPHOSPH1 presente en la muestra. Los sitios de detección pueden estar configurados en cualquier forma adecuadamente detectable y normalmente están en forma de una barra o punto que abarca la anchura de una tira reactiva.

10 El kit de la presente divulgación puede además incluir una muestra de control positivo o una muestra estándar de MPHOSPH1. La muestra de control positivo de la presente invención puede prepararse recolectando muestras MPHOSPH1 positivas y posteriormente ensayando sus niveles de MPHOSPH1. Alternativamente, puede añadirse una proteína MPHOSPH1 purificada o polinucleótido a las células que no expresan MPHOSPH1 para formar la muestra positiva o la muestra estándar de MPHOSPH1. En el contexto de la presente divulgación, la MPHOSPH1 purificada puede ser una proteína recombinante. El nivel de MPHOSPH1 de la muestra de control positiva es, por ejemplo, superior al valor de corte.

15 La presente divulgación se refiere además a un kit de diagnóstico que incluye una proteína o una proteína parcial de la misma capaz de ser específicamente reconocida por el anticuerpo de la presente divulgación o el fragmento inmunogénico de la misma.

20 Ejemplos de péptidos parciales de la presente divulgación incluyen polipéptidos compuestos de al menos 8, preferentemente 15 y más preferentemente 20 aminoácidos contiguos en la secuencia de polipéptidos de una proteína de la presente invención. El cáncer puede ser diagnosticado detectando un anticuerpo en una muestra (por ejemplo, sangre, tejidos) usando una proteína o un péptido (polipéptido) de la presente invención. El método de preparación de la proteína de la presente invención y péptidos son como se describieron anteriormente.

25 Los métodos de diagnóstico de cáncer de la presente invención pueden realizarse determinando la diferencia entre la cantidad de anticuerpo anti-MPHOSPH1 y aquella en la muestra de control correspondiente, como se describió anteriormente. Se sospecha que el sujeto padece cáncer si las células o tejidos del sujeto contienen anticuerpos contra los productos de expresión (MPHOSPH1) del gen y se determina que la cantidad del anticuerpo anti-MPHOSPH1 es superior al valor de corte en nivel en comparación con aquella del control normal.

30 En otra realización, un kit de diagnóstico de la presente divulgación puede incluir el péptido de la presente invención y una molécula HLA que se une al mismo. Ya se ha establecido el método de detección de CTL específicos de antígeno usando péptidos antigénicos y moléculas HLA (por ejemplo, Altman JD et al., Science, 1996, 274(5284): 94-6). Así, el complejo del péptido de la presente invención y la molécula HLA puede aplicarse al método de detección para detectar CTL específicos de antígeno de tumor, permitiendo así la detección temprana, reaparición y/o metástasis de cáncer. Además, puede emplearse para la selección de sujetos aplicables con los productos farmacéuticos que incluyen el péptido de la presente invención como principio activo, o la evaluación del efecto del tratamiento de los productos farmacéuticos.

35 Particularmente, según el método conocido (véase, por ejemplo, la publicación de Altman JD et al., Science, 1996, 274(5284): 94-6), puede prepararse el complejo de oligómero, tal como tetrámero de la molécula HLA radiomarcada y el péptido de la presente invención. Con el uso del complejo puede hacerse el diagnóstico, por ejemplo, cuantificando los CTL específicos de péptido de antígeno en los linfocitos de sangre periférica derivados del sujeto que se sospecha que padece cáncer.

40 La presente divulgación proporciona además métodos y agentes de diagnóstico para evaluar la respuesta inmunológica del sujeto usando epítopes de péptido como se describen en el presente documento. En una realización de la invención, los péptidos restringidos por HLA-A2 como se describen en el presente documento pueden usarse como reactivos para evaluar o predecir una respuesta inmunitaria de un sujeto. La respuesta inmunitaria que va a evaluarse puede ser inducida poniendo en contacto un inmunogén con células inmunocompetentes *in vitro* o *in vivo*. En ciertas realizaciones, cualquier sustancia o composición que pueda producir la producción de CTL específicos de antígeno que reconocen y se una al (a los) epítope(s) del péptido puede ser empleada como reactivo. Los reactivos de péptidos pueden no necesitar ser usados como el inmunogén. Los sistemas de ensayo que se usan para un análisis tal incluyen desarrollos técnicos relativamente recientes tales como tetrámeros, tinción para linfocinas intracelulares y ensayos de liberación de interferón, o ensayos ELISPOT. En realizaciones preferidas, las células inmunocompetentes para evaluar una respuesta inmunológica pueden seleccionarse de entre sangre periférica, linfocito de sangre periférica (PBL) y célula mononuclear de sangre periférica (CMSP). Métodos de recogida o aislamiento de tales células inmunocompetentes son muy conocidos en las técnicas. En una realización preferida alternativa, las células inmunocompetentes que van a ponerse en contacto con el reactivo de péptido incluyen células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas.

Por ejemplo, los péptidos de la presente invención pueden usarse en ensayos de tinción con tetrámero para evaluar células mononucleares de sangre periférica para la presencia de CTL específicos de antígeno tras la exposición a un antígeno de célula tumoral o un inmunogén. El complejo tetrámero de HLA puede usarse para visualizar directamente los CTL específicos de antígeno (véanse, por ejemplo, Ogg et al., Science 279: 2103-2106, 1998; y Altman et al., Science 174: 94-6, 1996) y determinar la frecuencia de la población de CTL específicos de antígeno en una muestra de células mononucleares de sangre periférica. Puede generarse un reactivo de tetrámero, tal como se describe más adelante, usando un péptido de la invención.

Un péptido que se une a una molécula HLA vuelve a plegarse en presencia de la cadena pesada de HLA correspondiente y beta-2-microglobulina para generar un complejo trimolecular. En el complejo, el extremo carboxilo de la cadena pesada se biotinila en un sitio que fue previamente modificado en la proteína. Entonces, se añade estreptavidina al complejo para formar un tetrámero compuesto del complejo trimolecular y estreptavidina. Por medio de la estreptavidina fluorescentemente marcada, el tetrámero puede usarse para teñir células específicas de antígeno. Las células pueden entonces ser identificadas, por ejemplo, por citometría de flujo. Un análisis tal puede usarse con fines de diagnóstico o pronóstico. Las células mediante el procedimiento también pueden usarse para fines terapéuticos.

La presente divulgación también se refiere a reactivos para evaluar las respuestas de memoria inmunitarias (véanse, por ejemplo, Bertoni et al., J. Clin. Invest. 100: 503-513, 1997 y Penna et al., J Exp. Med. 174: 1565-1570, 1991) que incluyen los péptidos de la presente invención. Por ejemplo, pueden analizarse muestras de CMSP de pacientes obtenidas de individuos con cáncer que van a tratarse para la presencia de CTL específicos de antígeno usando péptidos específicos. Puede evaluarse una muestra de sangre que contiene células mononucleares cultivando las CMSP y estimulando las células con un péptido de la invención. Después de un período de cultivo adecuado, puede analizarse la población de células expandida, por ejemplo, para actividad de CTL.

Los péptidos también pueden usarse como reactivos para evaluar la eficacia de una vacuna. Pueden analizarse las CMSP obtenidas de un paciente vacunado con un inmunogén usando, por ejemplo, cualquier de los métodos descritos anteriormente. El paciente es tipificado HLA, y se seleccionan los reactivos de epítipo del péptido que reconocen las moléculas específicas de alelo presentes en el paciente para análisis. La inmunogenicidad de la vacuna indicarse por la presencia de los CTL específicos de epítipo en la muestra de CMSP. Los péptidos de la invención también pueden usarse para producir anticuerpos, usando técnicas muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; y Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), que pueden tener uso como reactivos para diagnosticar, detectar o monitorizar el cáncer. Tales anticuerpos pueden incluir aquellos que reconocen un péptido en el contexto de una molécula de HLA, es decir, anticuerpos que se unen a un complejo de péptido-MHC.

Los péptidos y composiciones de la presente invención tienen varios usos adicionales, algunos de los cuales se describen en el presente documento. Por ejemplo, la presente invención proporciona un método de diagnóstico o detección de un trastorno caracterizado por la cantidad de un polipéptido inmunogénico MPHOSPH1. Estos métodos implican determinar la cantidad de un péptido MPHOSPH1, o un complejo de un péptido MPHOSPH1 y una molécula de clase I de HLA en una muestra biológica. La expresión de un péptido o complejo de péptido y una molécula de clase I de HLA puede determinarse o detectarse ensayando con un componente de unión para el péptido o complejo. En una realización preferida, un componente de unión para el péptido o complejo puede ser un anticuerpo que reconozca y se una específicamente al péptido. También puede probarse la expresión de MPHOSPH1 en una muestra biológica, tal como una biopsia de tumor, por protocolos de amplificación por PCR estándar usando cebadores de MPHOSPH1. Se presenta en el presente documento un ejemplo de expresión de tumor y la divulgación adicional de las condiciones y cebadores a modo de ejemplo para la amplificación de MPHOSPH1 puede encontrarse en el documento WO003/27322.

Preferentemente, los métodos de diagnóstico preferidos implican poner en contacto una muestra biológica aislada de un sujeto con un agente específico para el péptido MPHOSPH1 para detectar la presencia del péptido MPHOSPH1 en la muestra biológica. Como se usa en el presente documento, "poner en contacto" significa colocar la muestra biológica en proximidad suficiente al agente y bajo condiciones apropiadas de, por ejemplo, concentración, temperatura, tiempo, fuerza iónica, para permitir la interacción específica entre el agente y el péptido MPHOSPH1 que están presentes en la muestra biológica. En general, las condiciones para poner en contacto el agente con la muestra biológica son condiciones conocidas por aquellos expertos habituales en la materia para facilitar una interacción específica entre una molécula y su análogo (por ejemplo, una proteína y su análogo de receptor, un anticuerpo y su análogo de antígeno de proteína, un ácido nucleico y su análogo de secuencia complementaria) en una muestra biológica. Condiciones óptimas para facilitar una interacción específica entre una molécula y su análogo se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.108.921, concedida a Low et al.

El método de diagnóstico de la presente invención puede realizarse en cualquiera o tanto *in vivo* como *in vitro*. Por consiguiente, la muestra biológica puede localizarse *in vivo* o *in vitro* en la presente invención. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser un tejido *in vivo* y el agente específico para el polipéptido inmunogénico MPHOSPH1 puede usarse para detectar la presencia de tales moléculas en el tejido. Alternativamente, la muestra biológica puede ser recolectada o aislada *in vitro* (por ejemplo, una muestra de sangre, biopsia de tumor, extracto de tejido). En una realización particularmente preferida, la muestra biológica puede ser una muestra que contiene células, más

preferentemente, una muestra que contiene células tumorales recolectadas de un sujeto que va a diagnosticarse o tratarse.

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

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método de diagnóstico o evaluación de una respuesta inmunológica de un sujeto administrado al menos uno de los péptidos MPHOSPH1 de la presente invención, incluyendo el método las etapas de:

- 15 (a) poner en contacto un inmunogén con células inmunocompetentes bajo condición adecuada para la inducción de CTL específico para el inmunogén;
- (b) detectar o determinar el nivel de inducción del CTL inducido en la etapa (a); y
- (c) correlacionar la respuesta inmunológica del sujeto con el nivel de inducción de CTL.

En el contexto de la presente divulgación, el inmunogén incluye preferentemente al menos uno de (a) un péptido MPHOSPH1 seleccionado de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120 y (b) péptidos que tienen tales secuencias de aminoácidos de las que tales secuencias de aminoácidos se han modificado con sustitución (sustituciones) de 1, 2 o más aminoácidos. Mientras tanto, condiciones adecuadas de inducción de CTL específico de inmunogén son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden cultivarse células inmunocompetentes *in vitro* bajo la presencia de inmunogén (inmunogenes) para inducir CTL específico de inmunogén. Con el fin de inducir CTL específicos de inmunogén, puede añadirse cualquier factor estimulante al cultivo celular. Por ejemplo, IL-2 es factores estimulantes preferibles para la inducción de CTL.

En algunas realizaciones, la etapa de monitorizar o evaluar la respuesta inmunológica de un sujeto que va a tratarse con terapia del cáncer con péptidos puede realizarse antes, durante y/o después del tratamiento. En general, durante el protocolo de la terapia del cáncer, se administran péptidos inmunogénicos repetidamente a un sujeto que va a tratarse. Por ejemplo, pueden administrarse péptidos inmunogénicos cada semana durante 3-10 semanas. Por consiguiente, la respuesta inmunológica del sujeto puede evaluarse o monitorizarse durante el protocolo de la terapia del cáncer. Alternativamente, la etapa de evaluación o monitorización de la respuesta inmunológica a la terapia del cáncer puede ser al final del protocolo de terapia.

Según la presente invención, inducción potenciada de CTL específico de inmunogén en comparación con un control indica que el sujeto que va a evaluarse o diagnosticarse respondió inmunológicamente al inmunogén (a los inmunogenes) que ha/han sido administrado/s. Controles adecuados para evaluar la respuesta inmunológica pueden incluir, por ejemplo, un nivel de inducción de CTL cuando las células inmunocompetentes se ponen en contacto con no péptido, o péptido(s) de control que tienen secuencias de aminoácidos distintas de cualquier péptido MPHOSPH1 (por ejemplo, secuencia de aminoácidos aleatoria). En una realización preferida, la respuesta inmunológica del sujeto se evalúa en un modo específico de secuencia, comparando con una respuesta inmunológica entre cada inmunogén administrado al sujeto. En particular, incluso cuando una mezcla de algunos tipos de péptidos MPHOSPH1 se administra al sujeto, la respuesta inmunológica podría variar dependiendo de los péptidos. En ese caso, por comparación de la respuesta inmunológica entre cada péptido, pueden identificarse péptidos a los que el sujeto muestra mayor respuesta.

45 XI. Anticuerpos:

La presente divulgación se refiere además a anticuerpos que se unen a péptidos de la presente invención. Anticuerpos preferidos se unen específicamente a un péptido de la presente invención y no se unirán (o se unirán débilmente) a otro péptido. Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse a péptidos de la invención, además de a los homólogos de los mismos. Anticuerpos contra péptidos de la invención pueden encontrar uso en ensayos de diagnóstico y pronóstico del cáncer, además de metodologías de obtención de imagen. Similarmente, tales anticuerpos pueden encontrar uso en el tratamiento, diagnóstico y/o pronóstico de otros cánceres, hasta el punto que MPHOSPH1 también se expresa o expresa exceso en un paciente con cáncer. Además, los anticuerpos intracelularmente expresados (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios) pueden encontrar uso terapéuticamente en el tratamiento de cánceres en los que la expresión de MPHOSPH1 participa, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos.

La presente divulgación también se refiere a diversos ensayos inmunológicos para la detección y/o cuantificación de una proteína MPHOSPH1 (SEQ ID NO: 126) o un fragmento de la misma, que incluye un polipéptido compuesto de secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120. Tales ensayos pueden incluir uno o más anticuerpos anti-MPHOSPH1 capaces de reconocer u unirse a la proteína MPHOSPH1 o fragmentos de la misma, según convenga. En el contexto de la presente invención, los anticuerpos anti-MPHOSPH1 que se unen a un polipéptido MPHOSPH1 reconocerán preferentemente un polipéptido compuesto de secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120 hasta la exclusión de otros péptidos. La especificidad de unión del anticuerpo puede confirmarse por medio de una prueba de inhibición. Es decir, cuando la unión entre un anticuerpo que va a analizarse y la longitud completa del polipéptido MPHOSPH1 se inhibe bajo presencia de cualquier polipéptido de fragmento que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120, se considera que el anticuerpo se une específicamente al fragmento. En el contexto de la presente invención, tales ensayos inmunológicos se realizan dentro de diversos formatos de ensayos inmunológicos muy conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, diversos tipos de radioinmunoensayos, técnica inmunocromatográfica, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), enzimoimmunoanálisis de fluorescencia (ELIFA), y similares.

Ensayos inmunológicos relacionados, pero no de anticuerpo, de la invención también pueden incluir ensayos de inmunogenicidad de linfocitos T (inhibidores o estimulantes), además de ensayos de unión de MHC. Además, también se proporcionan métodos de obtención de imagen inmunológicos capaces de detectar cánceres que expresan MPHOSPH1 por la invención, que incluyen, pero no se limitan a, métodos de obtención de imagen radioescintigráficos usando anticuerpos marcados de la presente invención. Tales ensayos pueden encontrar uso clínicamente en la detección, monitorización y pronóstico de cánceres que expresan MPHOSPH1, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos.

La presente divulgación también se refiere a anticuerpos que se unen a un péptido de la presente invención. Un anticuerpo de la presente invención puede ser usado en cualquier forma, tal como anticuerpos monoclonales o policlonales, e incluyen antisero obtenido inmunizando un animal, tal como un conejo con el péptido de la invención, todas las clases de anticuerpos policlonales o monoclonales, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados producidos por recombinación genética.

Un péptido de la presente invención usado como un antígeno para obtener un anticuerpo puede derivarse de cualquier especie de animal, pero preferentemente deriva de un mamífero tal como un ser humano, ratón o rata, más preferentemente de un ser humano. Un péptido derivado de un ser humano puede obtenerse de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos desveladas en el presente documento.

Según la presente invención, péptidos completos y parciales de una proteína pueden servir de agente de inmunización. Ejemplos de péptidos parciales adecuados pueden incluir, por ejemplo, el fragmento del extremo amino (N) o extremo carboxi (C) de un péptido de la presente invención.

En el presente documento, un anticuerpo se define como una proteína que reacciona ya sea con la longitud completa o un fragmento de un péptido MPHOSPH1. En una realización preferida, un anticuerpo de la presente invención reconocerá péptidos de fragmento de MPHOSPH1 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, 14, 64, 73, 77, 79, 97, 103 y 120. Métodos de síntesis de un oligopéptido son muy conocidos en la técnica. Después de la síntesis, los péptidos pueden ser opcionalmente purificados antes de usarse como un inmunogén. En la presente invención, el oligopéptido (por ejemplo, 9- o 10-mero) puede conjugarse o unirse a vehículos para potenciar la inmunogenicidad. La hemocianina de lapa californiana (KLH) es muy conocida como el vehículo. El método para conjugar KLH y el péptido también es muy conocido en la técnica.

Alternativamente, un gen que codifica un péptido de la presente invención o fragmento del mismo puede insertarse en un vector de expresión conocido, que entonces se usa para transformar una célula hospedadora como se describe en el presente documento. El péptido deseado o fragmento del mismo puede recuperarse del interior o exterior de las células hospedadoras por cualquier método convencional, y puede usarse posteriormente como antígeno. Alternativamente, pueden usarse como antígeno células completas que expresan el péptido o sus lisados o un péptido químicamente sintetizado.

Puede inmunizarse cualquier animal mamífero con el antígeno, aunque preferentemente se tiene en cuenta la compatibilidad con las células parentales usadas para la fusión celular. En general, pueden usarse animales de la familia Rodentia, Lagomorpha o Primate. Animales de la familia Rodentia incluyen, por ejemplo, ratón, rata y hámster. Animales de la familia Lagomorpha incluyen, por ejemplo, conejo. Animales de la familia de Primates incluyen, por ejemplo, un mono catarrino (mono del viejo mundo) tal como *Macaca fascicularis*, mono Rhesus, babuino sagrado y chimpancés.

Se conocen en la técnica métodos de inmunización de animales con antígenos. La inyección intraperitoneal o inyección subcutánea de antígenos es un método convencional para la inmunización de mamíferos. Más específicamente, los antígenos pueden diluirse y suspenderse en una cantidad apropiada de solución salina

tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, etc. Si se desea, la suspensión de antígeno puede mezclarse con una cantidad apropiada de un adyuvante estándar, tal como adyuvante completo de Freud, convertirse en emulsión y posteriormente administrarse a animales mamíferos. Preferentemente, es seguido por varias administraciones de antígeno mezclado con una cantidad apropiada de adyuvante incompleto de Freud durante 4 a 21 días. También puede usarse un vehículo apropiado para la inmunización. Después de la inmunización como antes, el suero puede examinarse por un método convencional para un aumento en la cantidad de anticuerpos deseados.

Pueden prepararse anticuerpos policlonales contra los péptidos de la presente invención recolectando sangre del mamífero inmunizado examinado para el aumento de anticuerpos deseados en el suero, y separando el suero de la sangre por cualquier método convencional. Los anticuerpos policlonales incluyen un suero que contiene los anticuerpos policlonales, así como la fracción que contiene los anticuerpos policlonales puede ser aislada del suero. Puede prepararse inmunoglobulina G o M a partir de una fracción que reconoce únicamente el péptido de la presente invención usando, por ejemplo, una columna de afinidad acoplada con el péptido de la presente invención, y adicionalmente purificando esta fracción usando la columna de proteína A o proteína G.

Para preparar anticuerpos monoclonales para su uso en el contexto de la presente invención, se recolectan células inmunitarias de un mamífero inmunizado con el antígeno y se comprueba para el aumento del nivel de anticuerpos deseados en el suero, como se ha descrito anteriormente, y se someten a fusión celular. Las células inmunitarias usadas para la fusión celular pueden obtenerse preferentemente del bazo. Otras células parenterales preferidas que van a fusionarse con el inmunocito anterior incluyen, por ejemplo, células de mieloma de mamíferos, y más preferentemente células de mieloma que tienen una propiedad adquirida para la selección de células fusionadas por fármacos. El inmunocito anterior y las células de mieloma pueden fusionarse según métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein et al. (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).

Pueden seleccionarse hibridomas resultantes obtenidos por fusión celular cultivándolos en un medio de selección estándar, tal como medio HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo celular normalmente continúa en el medio HAT durante varios días a varias semanas, siendo el tiempo suficiente para permitir que todas las otras células, con la excepción del hibridoma deseado (células no fusionadas), mueran. Entonces, puede realizarse dilución limitante estándar para cribar y clonar una célula de hibridoma que produce el anticuerpo deseado.

Además del método anterior, en el que un animal no humano se inmuniza con un antígeno para preparar un hibridoma, linfocitos humanos tales como aquellos infectados por el virus EB pueden inmunizarse con un péptido, péptido que expresa células o sus lisados *in vitro*. Entonces, los linfocitos inmunizados pueden fusionarse con células de mieloma derivadas de ser humano que son capaces de dividirse indefinidamente, tal como U266, dando un hibridoma que produce un anticuerpo humano deseado que es capaz de unirse al péptido (solicitud de patente japonesa publicada no examinada N.º Sho 63-17688).

Los hibridomas obtenidos pueden entonces trasplantarse posteriormente en la cavidad abdominal de un ratón y se extrae la ascitis. Los anticuerpos monoclonales obtenidos pueden purificarse, por ejemplo, por precipitación con sulfato de amonio, una columna de proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico DEAE o una columna de afinidad a la que se acopla el péptido de la presente invención. Un anticuerpo de la presente invención puede usarse no solo para la purificación y detección de un péptido de la presente invención, sino también como un candidato para agonistas y antagonistas de un péptido de la presente invención.

Alternativamente, una célula inmunitaria, tal como un linfocito inmunizado, que produce anticuerpos puede ser inmortalizada por un oncogén y usarse para preparar anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales así obtenidos también pueden prepararse recombinantemente usando técnicas de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck and Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1990)). Por ejemplo, un ADN que codifica un anticuerpo puede clonarse a partir de una célula inmunitaria, tal como un hibridoma o un linfocito inmunizado que produce el anticuerpo, insertarse en un vector apropiado e introducirse en células hospedadoras para preparar un anticuerpo recombinante. La presente invención también proporciona anticuerpos recombinantes preparados como se ha descrito anteriormente.

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

Un anticuerpo puede modificarse por conjugación con una variedad de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). La presente invención proporciona tales anticuerpos modificados. El anticuerpo modificado puede obtenerse modificando químicamente un anticuerpo. Estos métodos de modificación son convencionales en el campo.

5 Alternativamente, un anticuerpo de la presente divulgación puede obtenerse como un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de un anticuerpo no humano y la región constante derivada del anticuerpo humano, o como un anticuerpo humanizado, que incluye la región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de un anticuerpo no humano, la región estructural (FR) y la región constante derivada de anticuerpo humano. Tales anticuerpos pueden prepararse según la tecnología conocida. La humanización puede realizarse sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536 (1988)). Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

15 También pueden usarse anticuerpos completamente humanos que incluyen regiones variables humanas, además de la región estructural humana y regiones constantes. Tales anticuerpos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas. Por ejemplo, los métodos *in vitro* implican el uso de genotecas recombinantes de fragmentos de anticuerpo humano presentados en bacteriófago (por ejemplo, Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)). Similarmente, pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 6.150.584, 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016.

20 Los anticuerpos obtenidos anteriormente pueden purificarse hasta homogeneidad. Por ejemplo, la separación y purificación del anticuerpo puede realizarse según los métodos de separación y purificación usados para proteínas generales. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse y aislarse por el uso apropiadamente seleccionado y combinado de cromatografías en columna, tales como cromatografía de afinidad, filtro, ultrafiltración, precipitación por sales, diálisis, electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida e isoelectroenfoque (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero no están limitadas a lo anterior. Pueden usarse una columna de proteína A y una columna de proteína G como la columna de afinidad. Columnas de proteína A a modo de ejemplo que van a usarse incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharose F.F. (Farmacia).

25 Ejemplos de técnicas de cromatografía adecuadas, con la excepción de la afinidad, incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración de gel, cromatografía de fase de reversa, cromatografía de adsorción y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Los procedimientos cromatográficos pueden llevarse a cabo mediante cromatografía de fase líquida, tal como HPLC y FPLC.

30 Por ejemplo, puede usarse la medición de absorbancia, ensayo inmunoanalítico de adsorción (ELISA), ensayo enzimático (EIA), radioensayo (RIA) y/o inmunofluorescencia para medir la actividad de unión al antígeno del anticuerpo de la invención. En el ELISA, el anticuerpo de la presente invención se inmoviliza en una placa, un péptido de la invención se aplica a la placa, y entonces se aplica una muestra que contiene un anticuerpo deseado, tal como un sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpo o anticuerpos purificados. Entonces, se aplica un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario y se marca con una enzima tal como fosfatasa alcalina, y se incuba la placa. A continuación, después de lavar, se añade a la placa un sustrato de enzima, tal como fosfato de p-nitrofenilo, y se mide la absorbancia para evaluar la actividad de unión al antígeno de la muestra. Puede usarse un fragmento del péptido, tal como un fragmento del extremo C o extremo N como el antígeno para evaluar la actividad de unión del anticuerpo. Puede usarse BIAcore (Farmacia) para evaluar la actividad del anticuerpo según la presente invención.

35 Los métodos anteriores permiten la detección o medición del péptido de la invención, exponiendo el anticuerpo de la invención a una muestra que se supone contiene el péptido de la invención, y detectando o midiendo el inmunocomplejo formado por el anticuerpo y el péptido.

40 Debido a que el método de detección o medición del péptido según la invención puede detectar o medir específicamente un péptido, el método puede encontrar uso en una variedad de experimentos en los que se usa el péptido.

XII. Vectores y células hospedadoras

45 La presente divulgación también se refiere a vectores que codifican un péptido de la presente invención y células hospedadoras en las que se introduce un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención. Un vector de la presente invención encuentra utilidad como vehículo de polinucleótido, especialmente un ADN, de la presente invención en célula hospedadora, para expresar el péptido de la presente invención, o administrar el polinucleótido de la presente invención para terapia génica.

50 Cuando se selecciona *E. coli* como la célula hospedadora y el vector se amplifica y produce una gran cantidad en *E. coli* (por ejemplo, JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1Blue), el vector debe tener un "ori" adecuado para amplificación en

E. coli y un gen marcador adecuado para seleccionar *E. coli* transformada (por ejemplo, un gen de resistencia a fármaco seleccionado por un fármaco tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol o similares). Por ejemplo, pueden usarse los vectores de la serie M13, vectores de la serie pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, etc. Además, también pueden usarse pGEM-T, pDIRECT y pT7 para subclonar y extraer el ADNc, así además de los vectores descritos anteriormente. Cuando se usa un vector para producir la proteína de la presente invención, puede encontrarse un vector de expresión. Por ejemplo, un vector de expresión que va a expresarse en *E. coli* debe tener las características anteriores para ser amplificado en *E. coli*. Cuando *E. coli* se usa como una célula hospedadora, tal como JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1 Blue, el vector debe tener un promotor, por ejemplo, promotor lacZ (Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), promotor araB (Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)), promotor T7 o similares, que pueden expresar eficientemente el gen deseado en *E. coli*. En ese respecto, pueden usarse pGEX-5X-1 (Pharmacia), el "sistema QIAexpress" (Qiagen), pEGFP y pET (en este caso, el hospedador es preferentemente BL21 que expresa la ARN polimerasa T7), por ejemplo, en lugar de los vectores anteriores. Adicionalmente, el vector también puede contener una secuencia señal para la secreción de péptido. Una secuencia señal a modo de ejemplo que dirige el péptido que va a secretarse al periplasma de *E. coli* es la secuencia señal pelB (Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987)). Medios para introducir los vectores en las células hospedadoras diana incluyen, por ejemplo, el método de cloruro de calcio, y el método de electroporación.

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

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

En lo sucesivo, la presente invención se describe en más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, aunque los siguientes materiales, métodos y ejemplos pueden servir para ayudar a un experto habitual en la preparación y el uso de ciertas realizaciones de la presente invención, solo está previsto ilustrar aspectos de la presente invención y así de ninguna forma limitar el alcance de la presente invención. Como un experto habitual en la materia reconocerá fácilmente, pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención.

[Ejemplos]

Materiales y métodos

40 Líneas celulares

Se compraron T2, línea celular linfoblastoide B HLA-A*0201-positiva, línea celular linfoblastoide B HLA-A*0206-positiva, HT1376, J82, COS7 y UM-UC3 de ATCC. MKN-45 se compró de JCRB.

Selección de péptidos candidatos derivados de MPHOSPH1

Se predijeron péptidos 9-meros y 10-meros derivados de MPHOSPH1 que se unen a la molécula HLA-A*0201 usando el software de predicción de uniones "BIMAS" (http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker et al., J Immunol 1994, 152(1): 163-75; Kuzushima et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81). Estos péptidos se sintetizaron por Biosynthesis (Lewisville, Texas) según un método de síntesis en fase sólida estándar y se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa. La pureza (>90 %) y la identidad de los péptidos se determinaron por HPLC analítica y análisis de espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en sulfóxido de dimetilo a 20 mg/ml y se guardaron a -80 °C.

Inducción de CTL *in vitro*

Se usaron células dendríticas derivadas de monocito (DC) como las células presentadoras de antígeno para inducir linfocito T citotóxico (CTL) que responde a péptidos presentados sobre el antígeno leucocitario humano (HLA). Las DC se generaron *in vitro* como se describe en cualquier parte (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8). Específicamente, se separaron células mononucleares de sangre periférica aisladas de un voluntario normal (HLA-A*0201 positivo) por disolución de Ficoll-Paque Plus (Pharmacia) por adherencia a una placa de cultivo de tejido de plástico (Becton Dickinson) de manera que se enriquecieran como la fracción de monocitos. La

población enriquecida en monocitos se cultivó en presencia de 1000 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (R&D Systems) y 1000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D Systems) en medio AIM-V (Invitrogen) que contenía 2 % de suero autólogo inactivado por calor (AS). Después de 7 días de cultivo, las DC inducidas por citocina se pulsaron con 20 microgramos/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en presencia de 3 microgramos/ml de beta-2-microglobulina durante 3 h a 37 °C en medio AIM-V. Pareció que las células generadas expresaban moléculas asociadas a DC, tales como CD80, CD83, CD86 y clase II de HLA, sobre sus superficies celulares (datos no mostrados). Estas DC pulsadas con péptido se inactivaron entonces por irradiación con rayos X (20 Gy) y se mezclaron a una relación 1:20 con linfocitos T CD8⁺ autólogos, obtenidos por selección positiva con el kit CD8 Positive Isolation (Dyna). Estos cultivos se dispusieron en placas de 48 pocillos (Corning); cada pocillo contuvo 1,5 X 10⁴ DC pulsadas con péptido, 3 X 10⁵ linfocitos T CD8⁺ y 10 ng/ml de IL-7 (R&D Systems) en 0,5 ml de medio AIM-V/2 % de AS. Tres días después, estos cultivos se complementaron con IL-2 (CHIRON) a una concentración final de 20 UI/ml. En el día 7 y 14, los linfocitos T se estimularon adicionalmente con las DC pulsadas con péptido autólogo. Las DC se prepararon cada vez por la misma forma descrita anteriormente. CTL se probó contra células T2 pulsadas con péptido después de la 3^a ronda de estimulación de péptido en el día 21 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

Procedimiento de expansión de CTL

Se expandieron CTL en cultivo usando el método similar al descrito por Riddell et al. (Walteran EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23). Se suspendieron un total de 5 x 10⁶ CTL en 25 ml de medio AIM-V/5 % de AS con 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas, inactivadas por mitomicina C, en presencia de 40 ng/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen). Un día después de iniciar los cultivos, se añadieron 120 UI/ml de IL-2 a los cultivos. Los cultivos se alimentaron con medio AIM-V/5 % de AS fresco que contenía 30 UI/ml de IL-2 en los días 5, 8 y 11 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

Establecimiento de clones de CTL

Se hicieron diluciones para tener 0,3, 1 y 3 CTL/pocillo en placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo (Nalge Nunc International). Los CTL se cultivaron con 1 X 10⁴ células/pocillo de 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas, 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 y 125 U/ml de IL-2 en un total de 150 microlitros/pocillo de medio AIM-V que contenía 5 % de AS. Se añadieron 50 microlitros/pocillo de IL-2 al medio 10 días después para alcanzar una concentración final de 125 U/ml de IL-2. Se probó la actividad de CTL en el 14^o día, y los clones de CTL se expandieron usando el mismo método que se ha descrito anteriormente (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

Actividad de CTL específica

Para examinar la actividad de CTL específica, se realizaron ensayo de inmunotransferencia asociada a enzima (ELISPOT) de interferón (IFN)-gamma y ensayo de inmunoenzimático de adsorción (ELISA) de IFN-gamma. Se prepararon T2 pulsadas con péptido (1 x 10⁴/pocillo) como células estimuladoras. Se usaron células cultivadas en placa de 48 pocillos, líneas de CTL y clones de CTL como células respondedoras. Se realizaron ensayo de ELISPOT de IFN-gamma y ensayo de ELISA de IFN-gamma según el procedimiento de fabricación.

Capacidad de CTL para reconocer la línea celular diana que expresó endógenamente MPHOSPH1 y HLA-A*0201

Se examinó el clon de CTL para su capacidad para reconocer la célula diana que expresó endógenamente MPHOSPH1 y HLA-A*0201. Se cultivó el clon de CTL establecido con líneas celulares diana (5 X 10⁴/pocillo) durante dos noches. Después de la incubación, se midió IFN-gamma en los medios de cultivo por ELISA. Se realizó ELISA de IFN-gamma según el procedimiento del fabricante.

Actividad citotóxica

Se examinaron los clones de CTL para su capacidad para destruir las células tumorales endógenamente que expresan MPHOSPH1 y HLA-A*0201. Se marcaron células diana (líneas de células tumorales) con 100 micro-Ci de Na₂⁵¹CrO₄ (Perkin Elmer) durante 1 h en estufa de incubación de CO₂. Se prepararon células diana pulsadas con péptido incubando las células con 20 microgramos/ml del péptido durante 16 h antes del marcado. Se aclararon las células diana marcadas con ⁵¹Cr y se mezclaron con los clones de CTL en un volumen final de 200 microlitros en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo. Las placas se centrifugaron (4 minutos a 800 rpm) para aumentar el contacto célula con célula y se dispusieron en estufa de incubación de CO₂. Después de 4 h de incubación, se recogieron 50 microlitros del sobrenadante de cada pocillo y se determinó la radiactividad con un contador gamma (PerkinElmer). El porcentaje de citotoxicidad específica se determinó calculando el porcentaje de liberación específica de ⁵¹Cr por la siguiente fórmula: {(cpm de la liberación de muestra de prueba - cpm de la

liberación espontánea) / (cpm de la liberación máxima - cpm de de la liberación espontánea)} X 100. La liberación espontánea se determinó incubando las células diana solas, en ausencia de células efectoras. La liberación máxima se obtuvo incubando las dianas con HCl 1 N. Todas las mediciones se hicieron por duplicado.

Establecimiento de células que expresan forzosamente cualquiera o ambos del gen diana y HLA-A*0206

5 Se amplificó por PCR el ADNc que codifica un marco de lectura abierto de genes diana o HLA-A*0206. El producto amplificado por PCR se clonó en el vector de expresión. Los plásmidos se transfectaron en COS7, que es el gen diana y la línea HLA-A*0206-nula, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según el procedimiento del fabricante. Después de 2 días de la transfección, las células transfectadas se recogieron con Versene (Invitrogen) y se usaron como células estimuladoras (5×10^4 células/pocillo) para el ensayo de actividad de CTL.

10 Capacidad de CTL para reconocer la línea celular diana que expresó endógenamente MPHOSPH1 y HLA-A*0206

Se examinó el clon de CTL para su capacidad para reconocer la célula diana que expresó endógenamente MPHOSPH1 y HLA-A*0206. Se cultivaron la línea y el clon de CTL establecidos con líneas celulares diana (5×10^4 /pocillo) durante dos noches. Después de la incubación, se midió por ELISA IFN-gamma en los medios de cultivo. Se realizó ELISA de IFN-gamma según el procedimiento del fabricante.

15 Resultados

Expresión potenciada de MPHOSPH1 en cánceres

Los datos de perfiles de expresión génica completa obtenidos de diversos cánceres usando micromatriz de ADNc revelaron que la expresión de MPHOSPH1 (Nº de acceso de GenBank NM_016195; SEQ ID NO: 125) se elevó específicamente en tejidos de cáncer en comparación con tejido normal correspondiente. La expresión de MPHOSPH1 se elevó válidamente en 30 de los 31 cánceres de vejiga, 8 de los 36 cánceres de mama, 18 de los 18 cánceres de cuello uterino, 5 de los 17 carcinomas colangiocelulares, 25 de los 31 LMC, 6 de los 11 cánceres colorrectales, 6 de los 14 cánceres gástricos, 5 de los 5 CPCNP, 7 de los 7 linfomas, 6 de los 10 osteosarcomas, 7 de los 22 cánceres de próstata, 10 de los 18 cánceres renales y 15 de los 21 tumores de tejidos blando (Tabla 1).

[Tabla 1]

25 **Relación de casos de regulación por incremento obtenida de MPHOSPH1 en tejido canceroso en comparación con tejido normal correspondiente**

Cancer/Tumor	Relación
Cáncer de vejiga	30/31
Cáncer de mama	8/36
Cáncer de cuello uterino	18/18
Carcinoma colangiocelular	5/17
LMC	25/31
Cáncer colorrectal	6/11
Cáncer gástrico	6/14
CPCNP	5/5
Linfoma	7/7
Osteosarcoma	6/10
Cáncer de próstata	7/22
Cáncer renal	10/18
Tumor de tejido blando	15/21

ES 2 647 900 T3

Predicción de péptidos de unión a HLA-A02 derivados de MPHOSPH1

La Tablas 2a y 2b muestran los péptidos 9-meros y 10-meros de unión a HLA-A02 de MPHOSPH1 en el orden de alta afinidad de unión. Se seleccionaron un total de 47 péptidos que tenían posible capacidad de unión a HLA-A02 y se examinaron para determinar los péptidos de epítipo.

5

[Tabla 2a]

Péptidos 9-meros de unión a HLA-A02 derivados de MPHOSPH1

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	puntuación	SEQ ID NO
575	KLLDLIEDL	1278,3	1
282	YIYDLFVPV	1096,6	2
298	KMLRLSQDV	650,5	3
218	ALLRQIKEV	591,9	4
850	FLLTIENEL	363,6	5
1108	ALSELTQGV	285,2	6
331	KLGIKHQSV	243,4	7
1689	TLQKFGDFL	218,8	8
1251	KLTDAKKQI	149,7	9
638	RLAIFKDLV	129,5	10
1467	QLTEKSDSL	87,6	11
1195	NLQDMKHLL	87,6	12
270	SVWVSFFEI	83,5	13
129	FQGCIMQPV	74,6	14
839	VLQENNEGL	73,0	15
1094	TLDVQIQHV	64,0	16
1019	AIWEECKEI	48,8	17
1696	FLQHSPSIL	40,3	18
528	DLMEDEDLV	38,8	19
406	SLLTLGKCI	38,6	20
1400	KLTNLQDEL	36,6	21
170	GILPRTLNV	35,4	22
171	ILPRTLNVL	34,2	23
786	KICSERKRV	33,5	24
880	SLSEKKNLT	30,6	25
944	LMHTKIDEL	29,6	26
1422	WLEEKMMLI	29,0	27
466	TLNVLKFSA	28,8	28
1539	KLQTEPLST	26,1	29

ES 2 647 900 T3

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	puntuación	SEQ ID NO
132	CIMQPVKDL	25,0	30
1260	KQVQKEVSV	24,7	31
1184	KLKEEITQL	24,7	32
888	TLSKEVQQI	24,0	33
280	NEYIYDLFV	23,8	34
552	LLDEDLDKT	23,4	35
461	LAYDETLNV	21,5	36
980	NLPNTQLDL	21,4	37
409	TLGKCINVL	20,1	38
175	TLNVLFDSL	19,9	39
923	KLSNEIETA	19,6	40
1389	KEHENNTDV	19,4	41
987	DLLGNDYLV	19,3	42
920	KIMKLSNEI	18,6	43
1703	ILQSKAKKI	17,7	44
512	ILNVKRATI	17,7	45
1124	KELETILET	17,7	46
453	IVNISQCYL	17,5	47
771	LICNETVEV	16,3	48
623	TLLQEREIL	15,9	49
560	TLEENKAFI	15,1	50
1415	YNADRKKWL	14,5	51
307	KGYSFIKDL	13,7	52
133	IMQPVKDLL	12,9	53
1594	KMAVKHPGC	12,6	54
365	SEMSRVIRV	11,5	55
1191	QLTNNLQDM	11,4	56
871	QIVHFQQEL	11,2	57
245	NISEFEESI	11,0	58
484	TLNSSQEKL	10,5	59
764	SLIINNKLI	10,4	60
587	LINEKKEKL	10,0	61
263	MANSIKFSV	9,525	62
1354	VLEAKLEEV	8,528	63

ES 2 647 900 T3

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	puntuación	SEQ ID NO
846	GLRAFLLLTI	6,93	64
83	ILDSQTVVL	5,956	65
1562	VLDSCEVST	5,067	66
15	YVFSADPIA	3,033	67
1741	YTSEISSPI	2,733	68
959	SQISNIDLL	2,441	69
82	HILDSQTVV	2,022	70

[Tabla 2b]

Péptidos 10-meros de unión a HLA-A02 derivados de MPHOSPH1

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	puntuación	SEQ ID NO
1274	KLLRiKINEL	636,3	71
551	KLLDeDLDKT	445,9	72
460	YLAYdETLNV	319,9	73
943	KLMHtKIDEL	311,8	74
262	NMANsIKFSV	291,3	75
178	VLFDSLQERL	269,9	76
770	KLICnETVEV	243,4	77
34	KLDLsHEFSL	173,5	78
407	LLTLgKCINV	118,2	79
1714	TMSSsKLSNV	115,5	80
1353	QVLEaKLEEV	104,0	81
880	SLSEkKNLTL	87,6	82
235	TLYGslTNSL	68,4	83
1019	AIWEeCKEIV	65,4	84
552	LLDEdLDKTL	59,6	85
1093	VTLDvQIQHV	57,3	86
559	KTLEeNKAFI	42,3	87
1332	KIIEdMRMTL	42,2	88
152	GLTNsGKTYT	41,0	89
830	NIAEiEDIRV	39,2	90
586	KLINeKKEKL	36,6	91
182	SLQErLYTKM	30,6	92
1043	QQIEkLQAEV	28,9	93

ES 2 647 900 T3

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	puntuación	SEQ ID NO
870	KQIVhFQQEL	28,8	94
1318	QQYErACKDL	28,4	95
452	MIVNiSQCYL	27,5	96
923	KLSNeIETAT	26,1	97
1257	KQIKqVQKEV	24,7	98
980	NLPNtQLDLL	24,1	99
985	QLDLIGNDYL	23,0	100
1427	MMLItQAKEA	22,6	101
1523	QIMDiKPKRI	21,8	102
1484	QLVAaLEIQL	21,4	103
466	TLNVIKFSAI	19,8	104
511	KILNvKRATI	18,6	105
1340	TLEEqEQTQV	18,3	106
372	RVSEISLCDL	17,6	107
1561	WLDsCEVST	16,8	108
309	YSFIKDLQWI	14,7	109
353	SIFTvKILQI	12,2	110
1094	TLDVqIQHVV	11,4	111
1688	GTLQkFGDFL	11,2	112
311	FIKDIQWIQV	10,7	113
1079	TLIQqLKEEL	10,5	114
1128	TILEtQKVEC	10,4	115
1487	AALEiQLKAL	10,4	116
170	GILPrtLNVL	10,2	117
503	SLDSNSNSKI	4,173	118
1107	RALSELTQGV	3,574	119
282	YIYDLFVPVS	2,216	120
160	YTFQGTEENI	1,208	121
174	RTLNVLFDSL	1,022	122
82	HILDSQTVVL	0,621	123
128	FFQGCIMQPV	0,511	124

Posición inicial indica el número de resto de aminoácido desde el extremo N de MPHOSPH1.

Puntuación de unión deriva de "BIMAS".

Inducción de CTL con los péptidos predichos de MPHOSPH1 restringidos por HLA-A*0201

Se generaron CTL para aquellos péptidos derivados de MPHOSPH1 según los protocolos que se describen en "Materiales y métodos". Se detectó actividad de CTL específica de péptido por ensayo ELISPOT de IFN-gamma (Figura 1). El número de pocillo N.º 7 estimulado con MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5) (a), N.º 5 estimulado con MPHOSPH1-A02-9-129 (SEQ ID NO: 14) (b), N.º 5 estimulado con MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64) (c), N.º 2 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73) (d), N.º 1 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77) (e), N.º 1 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-407 (SEQ ID NO: 79) (f), N.º 4 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-923 (SEQ ID NO: 97) (g), N.º 5 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-1484 (SEQ ID NO: 103) (h) y N.º 8 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) (i) demostró potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica por estimulación con otros péptidos mostrados en la Tabla 2 a y b, a pesar de que aquellos péptidos tenían posible actividad de unión con HLA-A*0201. Como un caso típico de datos negativos, no se observó producción de IFN-gamma específica a partir del CTL estimulado con MPHOSPH1-A02-9-575 (SEQ ID NO: 1) (j). Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que los 10 péptidos seleccionados derivados de MPHOSPH1 podrían inducir potentes CTL.

Establecimiento de línea y clon de CTL contra el péptido derivado de MPHOSPH1

Las células en el número de pocillo N.º 7 estimulado con MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5) (a), N.º 5 estimulado con MPHOSPH1-A02-9-129 (SEQ ID NO: 14) (b), N.º 5 estimulado con MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64) (c), N.º 2 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73) (d), N.º 1 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77) (e), N.º 1 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-407 (SEQ ID NO: 79) (f), N.º 4 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-923 (SEQ ID NO: 97) (g), N.º 5 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-1484 (SEQ ID NO: 103) (h) y N.º 8 estimulado con MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) (i), que mostraron actividad de CTL específica de péptido en el ensayo ELISPOT de IFN-gamma, expandieron y establecieron las líneas de CTL (Figura 2). La actividad de CTL de estas líneas de CTL se midió por ELISA de IFN-gamma. Líneas de CTL demostraron la potente producción de IFN-gamma contra células T2 pulsadas con el péptido correspondiente en comparación con células T2 sin pulso de péptido. Además, los clones de CTL se establecieron por dilución limitante de las líneas de CTL como se describe en "Materiales y métodos", y se midió la producción de IFN-gamma de los clones de CTL contra células T2 pulsadas con péptido correspondiente por ELISA de IFN-gamma. Se observó potente producción de IFN-gamma de los clones de CTL estimulados con MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5) (a), MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64) (b), MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73) (c), MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77) (d) y MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) (e) (Figura 3).

Actividad de CTL específica contra células diana que expresan MPHOSPH1 y HLA-A*0201

Se examinó el clon de CTL establecido para la capacidad para reconocer células diana que expresan MPHOSPH1 y molécula de HLA-A*0201. El clon de CTL estimulado con MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) mostró potente actividad de CTL contra células J82 que expresaron ambos de MPHOSPH1 y HLA-A*0201. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica significativa contra células HT1376 que expresaron MPHOSPH1 pero no HLA-A*0201 y células T2 que expresaron HLA-A*0201 pero no MPHOSPH1 (Figura 4). Así, estos datos demuestran claramente que el péptido MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) se procesó endógenamente y se expresó en las células diana con la molécula HLA-A*0201 y fue reconocido por los CTL.

Actividad citotóxica contra la línea de células tumorales que expresan MPHOSPH1 y HLA-A*0201

Se examinaron los clones de CTL establecidos para su capacidad para reconocer y destruir líneas de células tumorales que expresaron MPHOSPH1 y HLA-A*0201. El clon de CTL estimulado con MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) mostró potente actividad citotóxica contra células UMUC-3 que expresan ambos de MPHOSPH1 y HLA-A*0201. Por otra parte, no se detectó actividad citotóxica significativa con ambos clones de CTL contra células MKN45 que expresan MPHOSPH1 pero no HLA-A*0201 y células T2 que expresan HLA-A*0201 pero no MPHOSPH1 (Figura 5). Estos resultados indican que el péptido MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) derivado de MPHOSPH1 puede estar disponible para aplicar las vacunas para el cáncer para pacientes con MPHOSPH1 que expresan tumores.

Actividad de CTL específica contra células diana que expresan MPHOSPH1 y HLA-A*0206

Se examinó la línea de CTL establecida producida contra el péptido MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) para la capacidad para reconocer células diana que expresan MPHOSPH1 y la molécula HLA-A*0206. Se prepararon células COS7 transfectadas con tanto la longitud completa de MPHOSPH1 como el gen HLA-A*0206 (un modelo específico para las células diana que expresan MPHOSPH1 y el gen HLA-A*0206) como células estimuladoras, y se usaron células COS7 transfectadas con cualquier longitud completa de MPHOSPH1 o HLA-A*0206 como controles. En la Figura 6, el clon de CTL estimulado con MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) mostró potente actividad de CTL contra células COS7 que expresan ambos de MPHOSPH1 y HLA-A*0206. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica significativa contra los controles. Así, estos datos demuestran

claramente que el péptido MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) se procesa y expresa endógenamente sobre las células diana con la molécula HLA-A*0206 y fue reconocido por los CTL.

Análisis de homología de péptidos de antígeno

5 Los CTL estimulados con MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5), MPHOSPH1-A02-9-129 (SEQ ID NO: 14), MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64), MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73), MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77), MPHOSPH1-A02-10-407 (SEQ ID NO: 79), MPHOSPH1-A02-10-923 (SEQ ID NO: 97), MPHOSPH1-A02-10-1484 (SEQ ID NO: 103) y MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) mostraron actividad de CTL significativa y específica. Este resultado puede ser debido al hecho de que la secuencia de MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5), MPHOSPH1-A02-9-129 (SEQ ID NO: 14), MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64), MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73), MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77), MPHOSPH1-A02-10-407 (SEQ ID NO: 79), MPHOSPH1-A02-10-923 (SEQ ID NO: 97), MPHOSPH1-A02-10-1484 (SEQ ID NO: 103) y MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) son homólogas al péptido derivado de otras moléculas que son conocidas por sensibilizar el sistema inmunitario humano. Para excluir esta posibilidad, se realizaron análisis de homología para estas secuencias de péptidos usando como búsquedas el algoritmo de BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) que reveló ninguna secuencia con homología significativa. Los resultados de los análisis de homología indican que la secuencia de MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5), MPHOSPH1-A02-9-129 (SEQ ID NO: 14), MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64), MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73), MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77), MPHOSPH1-A02-10-407 (SEQ ID NO: 79), MPHOSPH1-A02-10-923 (SEQ ID NO: 97), MPHOSPH1-A02-10-1484 (SEQ ID NO: 103) y MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) son únicas y así, hay poca posibilidad, a nuestro leal saber, de que estas moléculas produzcan una respuesta inmunológica involuntaria a alguna molécula no relacionada.

En conclusión, los novedosos péptidos de epítipo HLA-A*0201 derivados de MPHOSPH1 identificados en el presente documento pueden encontrar utilidad en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer.

[Aplicabilidad industrial]

25 La presente invención proporciona nuevos TAA, particularmente aquellos derivados de MPHOSPH1, que pueden inducir respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas y así tener aplicabilidad para una amplia variedad de tipos de cáncer. Tales TAA pueden encontrar uso como vacunas de péptido contra enfermedades asociadas a MPHOSPH1, por ejemplo, cáncer, más particularmente, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, LMC, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, CPCNP, linfoma, osteosarcoma, 30 cáncer de próstata, cáncer renal y tumor de tejidos blandos.

[Listado de secuencias]

ONC-A1108Psq.txt

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDOS MPHOSPH1 Y VACUNAS QUE INCLUYEN LOS MISMOS

<130> ONC-A1108P

40 <150>US 61/522.991

<151> 12-08-2011

<160> 130

45 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 1

10 **Lys Leu Leu Asp Leu Ile Glu Asp Leu**
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20 <400> 2

Tyr Ile Tyr Asp Leu Phe Val Pro Val
1 5

<210> 3

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 3

Lys Met Leu Arg Leu Ser Gln Asp Val
1 5

35

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 4

10

Ala Leu Leu Arg Gln Ile Lys Glu Val
1 5

<210> 5

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 5

Phe Leu Leu Thr Ile Glu Asn Glu Leu
1 5

25

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 6

35

Ala Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gly Val
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 7

10

Lys Leu Gly Ile Lys His Gln Ser Val
1 5

<210> 8

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 8

Thr Leu Gln Lys Phe Gly Asp Phe Leu
1 5

25

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 9

35

Lys Leu Thr Asp Ala Lys Lys Gln Ile
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 10

10

Arg Leu Ala Ile Phe Lys Asp Leu Val
1 5

<210> 11

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 11

Gln Leu Thr Glu Lys Asp Ser Asp Leu
1 5

25

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 12

35

Asn Leu Gln Asp Met Lys His Leu Leu
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 13

10

Ser Val Trp Val Ser Phe Phe Glu Ile
1 5

<210> 14

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 14

Phe Gln Gly Cys Ile Met Gln Pro Val
1 5

25

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 15

35

Val Leu Gln Glu Asn Asn Glu Gly Leu
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 16

10

Thr Leu Asp Val Gln Ile Gln His Val
1 5

<210> 17

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 17

Ala Ile Trp Glu Glu Cys Lys Glu Ile
1 5

25

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 18

35

Phe Leu Gln His Ser Pro Ser Ile Leu
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 19

10

Asp Leu Met Glu Asp Glu Asp Leu Val
1 5

<210> 20

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 20

Ser Leu Leu Thr Leu Gly Lys Cys Ile
1 5

25

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 21

35

Lys Leu Thr Asn Leu Gln Asp Glu Leu
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 22

10

Gly Ile Leu Pro Arg Thr Leu Asn Val
1 5

<210> 23

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 23

Ile Leu Pro Arg Thr Leu Asn Val Leu
1 5

25

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 24

35

Lys Ile Cys Ser Glu Arg Lys Arg Val
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 25

10

Ser Leu Ser Glu Lys Lys Asn Leu Thr
1 5

<210> 26

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 26

Leu Met His Thr Lys Ile Asp Glu Leu
1 5

25

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 27

35

Trp Leu Glu Glu Lys Met Met Leu Ile
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 28

10

Thr Leu Asn Val Leu Lys Phe Ser Ala
1 5

<210> 29

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 29

Lys Leu Gln Thr Glu Pro Leu Ser Thr
1 5

25

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 30

35

Cys Ile Met Gln Pro Val Lys Asp Leu
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 31

10

Lys Gln Val Gln Lys Glu Val Ser Val
1 5

<210> 32

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 32

Lys Leu Lys Glu Glu Ile Thr Gln Leu
1 5

25

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 33

35

Thr Leu Ser Lys Glu Val Gln Gln Ile
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 34

10

Asn Glu Tyr Ile Tyr Asp Leu Phe Val
1 5

<210> 35

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 35

Leu Leu Asp Glu Asp Leu Asp Lys Thr
1 5

25

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 36

35

Leu Ala Tyr Asp Glu Thr Leu Asn Val
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 37

10

Asn Leu Pro Asn Thr Gln Leu Asp Leu
1 5

<210> 38

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 38

Thr Leu Gly Lys Cys Ile Asn Val Leu
1 5

25

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 39

35

Thr Leu Asn Val Leu Phe Asp Ser Leu
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 40

10

Lys Leu Ser Asn Glu Ile Glu Thr Ala
1 5

<210> 41

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 41

Lys Glu His Glu Asn Asn Thr Asp Val
1 5

25

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 42

35

Asp Leu Leu Gly Asn Asp Tyr Leu Val
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 43

10

Lys Ile Met Lys Leu Ser Asn Glu Ile
1 5

<210> 44

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 44

Ile Leu Gln Ser Lys Ala Lys Lys Ile
1 5

25

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 45

35

Ile Leu Asn Val Lys Arg Ala Thr Ile
1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 46

10

Lys Glu Leu Glu Thr Ile Leu Glu Thr
1 5

<210> 47

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 47

Ile Val Asn Ile Ser Gln Cys Tyr Leu
1 5

25

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 48

35

Leu Ile Cys Asn Glu Thr Val Glu Val
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 49

10

Thr Leu Leu Gln Glu Arg Glu Ile Leu
1 5

<210> 50

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 50

Thr Leu Glu Glu Asn Lys Ala Phe Ile
1 5

25

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 51

35

Tyr Asn Ala Asp Arg Lys Lys Trp Leu
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 52

10

Lys Gly Tyr Ser Phe Ile Lys Asp Leu
1 5

<210> 53

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 53

Ile Met Gln Pro Val Lys Asp Leu Leu
1 5

25

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 54

35

Lys Met Ala Val Lys His Pro Gly Cys
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 55

10

Ser Glu Met Ser Arg Val Ile Arg Val
1 5

<210> 56

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 56

Gln Leu Thr Asn Asn Leu Gln Asp Met
1 5

25

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 57

35

Gln Ile Val His Phe Gln Gln Glu Leu
1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 58

10

Asn Ile Ser Glu Phe Glu Glu Ser Ile
1 5

<210> 59

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 59

Thr Leu Asn Ser Ser Gln Glu Lys Leu
1 5

25

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 60

35

Ser Leu Ile Ile Asn Asn Lys Leu Ile
1 5

ES 2 647 900 T3

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 61

10

Leu Ile Asn Glu Lys Lys Glu Lys Leu
1 5

<210> 62

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 62

Met Ala Asn Ser Ile Lys Phe Ser Val
1 5

25

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 63

35

Val Leu Glu Ala Lys Leu Glu Glu Val
1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 64

10

Gly Leu Arg Ala Phe Leu Leu Thr Ile
1 5

<210> 65

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 65

Ile Leu Asp Ser Gln Thr Val Val Leu
1 5

25

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 66

35

Val Leu Asp Ser Cys Glu Val Ser Thr
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 67

10

Tyr Val Phe Ser Ala Asp Pro Ile Ala
1 5

<210> 68

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 68

Tyr Thr Ser Glu Ile Ser Ser Pro Ile
1 5

25

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 69

35

Ser Gln Ile Ser Asn Ile Asp Leu Leu
1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 70

10

His Ile Leu Asp Ser Gln Thr Val Val
1 5

<210> 71

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 71

Lys Leu Leu Arg Ile Lys Ile Asn Glu Leu
1 5 10

25

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 72

35

Lys Leu Leu Asp Glu Asp Leu Asp Lys Thr
1 5 10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 73

10

Tyr Leu Ala Tyr Asp Glu Thr Leu Asn Val
1 5 10

<210> 74

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 74

Lys Leu Met His Thr Lys Ile Asp Glu Leu
1 5 10

25

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 75

35

Asn Met Ala Asn Ser Ile Lys Phe Ser Val
1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 76

10

Val Leu Phe Asp Ser Leu Gln Glu Arg Leu
1 5 10

<210> 77

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 77

Lys Leu Ile Cys Asn Glu Thr Val Glu Val
1 5 10

25

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 78

35

Lys Leu Asp Leu Ser His Glu Phe Ser Leu
1 5 10

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 79

10

Leu Leu Thr Leu Gly Lys Cys Ile Asn Val
1 5 10

<210> 80

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 80

Thr Met Ser Ser Ser Lys Leu Ser Asn Val
1 5 10

25

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 81

35

Gln Val Leu Glu Ala Lys Leu Glu Glu Val
1 5 10

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 82

10

Ser Leu Ser Glu Lys Lys Asn Leu Thr Leu
1 5 10

<210> 83

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 83

Thr Leu Tyr Gly Ser Leu Thr Asn Ser Leu
1 5 10

25

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 84

35

Ala Ile Trp Glu Glu Cys Lys Glu Ile Val
1 5 10

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 85

10

Leu Leu Asp Glu Asp Leu Asp Lys Thr Leu
1 5 10

<210> 86

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 86

Val Thr Leu Asp Val Gln Ile Gln His Val
1 5 10

25

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 87

35

Lys Thr Leu Glu Glu Asn Lys Ala Phe Ile
1 5 10

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 88

10

Lys Ile Ile Glu Asp Met Arg Met Thr Leu
1 5 10

<210> 89

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 89

Gly Leu Thr Asn Ser Gly Lys Thr Tyr Thr
1 5 10

25

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 90

35

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

<210> 91

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 91

10

Lys Leu Ile Asn Glu Lys Lys Glu Lys Leu
1 5 10

<210> 92

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 92

Ser Leu Gln Glu Arg Leu Tyr Thr Lys Met
1 5 10

25

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 93

35

Gln Gln Ile Glu Lys Leu Gln Ala Glu Val
1 5 10

ES 2 647 900 T3

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 94

10

Lys	Gln	Ile	Val	His	Phe	Gln	Gln	Glu	Leu
1				5					10

<210> 95

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 95

Gln	Gln	Tyr	Glu	Arg	Ala	Cys	Lys	Asp	Leu
1				5					10

25

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 96

35

Met	Ile	Val	Asn	Ile	Ser	Gln	Cys	Tyr	Leu
1				5					10

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 97

10

Lys Leu Ser Asn Glu Ile Glu Thr Ala Thr
1 5 10

<210> 98

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 98

Lys Gln Ile Lys Gln Val Gln Lys Glu Val
1 5 10

25

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 99

35

Asn Leu Pro Asn Thr Gln Leu Asp Leu Leu
1 5 10

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 100

10

Gln Leu Asp Leu Leu Gly Asn Asp Tyr Leu
1 5 10

<210> 101

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 101

Met Met Leu Ile Thr Gln Ala Lys Glu Ala
1 5 10

25

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 102

35

Gln Ile Met Asp Ile Lys Pro Lys Arg Ile
1 5 10

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 103

10

Gln	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Ile	Gln	Leu
1				5					10

<210> 104

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 104

Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Lys	Phe	Ser	Ala	Ile
1				5					10

25

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 105

35

Lys	Ile	Leu	Asn	Val	Lys	Arg	Ala	Thr	Ile
1				5					10

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 106

10

Thr Leu Glu Glu Gln Glu Gln Thr Gln Val
1 5 10

<210> 107

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 107

Arg Val Ser Glu Leu Ser Leu Cys Asp Leu
1 5 10

25

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 108

35

Val Val Leu Asp Ser Cys Glu Val Ser Thr
1 5 10

<210> 109

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 109

10

Tyr Ser Phe Ile Lys Asp Leu Gln Trp Ile
1 5 10

<210> 110

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 110

Ser Ile Phe Thr Val Lys Ile Leu Gln Ile
1 5 10

25

<210> 111

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 111

35

Thr Leu Asp Val Gln Ile Gln His Val Val
1 5 10

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 112

10

Gly	Thr	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Asp	Phe	Leu
1				5					10

<210> 113

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 113

Phe	Ile	Lys	Asp	Leu	Gln	Trp	Ile	Gln	Val
1				5					10

25

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 114

35

Thr	Leu	Ile	Gln	Gln	Leu	Lys	Glu	Glu	Leu
1				5					10

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 115

10

Thr Ile Leu Glu Thr Gln Lys Val Glu Cys
1 5 10

<210> 116

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 116

Ala Ala Leu Glu Ile Gln Leu Lys Ala Leu
1 5 10

25

<210> 117

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 117

35

Gly Ile Leu Pro Arg Thr Leu Asn Val Leu
1 5 10

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 118

10

Ser Leu Asp Ser Asn Ser Asn Ser Lys Ile
1 5 10

<210> 119

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 119

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

25

<210> 120

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 120

35

Tyr Ile Tyr Asp Leu Phe Val Pro Val Ser
1 5 10

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 121

10

Tyr Thr Phe Gln Gly Thr Glu Glu Asn Ile
1 5 10

<210> 122

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

20

<400> 122

Arg Thr Leu Asn Val Leu Phe Asp Ser Leu
1 5 10

25

<210> 123

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 123

35

His Ile Leu Asp Ser Gln Thr Val Val Leu
1 5 10

ES 2 647 900 T3

<210> 124

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de MPHOSPH1

<400> 124

10

Phe	Phe	Gln	Gly	Cys	Ile	Met	Gln	Pro	Val
1				5					10

<210> 125

<211> 6319

15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

20

<222> (73)..(5415)

<400> 125

attgtttgaa ttgaaaacg gtaacatcgc agtgctgctc gcgggtctgg ctagtcaggc

60

ES 2 647 900 T3

gaagtttgca ga atg gaa tct aat ttt aat caa gag gga gta cct oga cca	111
Met Glu Ser Asn Phe Asn Gln Glu Gly Val Pro Arg Pro	
1 5 10	
tct tat gtt ttt agt gct gac cca att gca agg cct tca gaa ata aat	159
Ser Tyr Val Phe Ser Ala Asp Pro Ile Ala Arg Pro Ser Glu Ile Asn	
15 20 25	
ttc gat ggc att aag ctt gat ctg tct cat gaa ttt tcc tta gtt gct	207
Phe Asp Gly Ile Lys Leu Asp Leu Ser His Glu Phe Ser Leu Val Ala	
30 35 40 45	
cca aat act gag gca aac agt ttc gaa tct aaa gat tat ctc cag gtt	255
Pro Asn Thr Glu Ala Asn Ser Phe Glu Ser Lys Asp Tyr Leu Gln Val	
50 55 60	
tgt ctt cga ata aga cca ttt aca cag tca gaa aaa gaa ctt gag tct	303
Cys Leu Arg Ile Arg Pro Phe Thr Gln Ser Glu Lys Glu Leu Glu Ser	
65 70 75	
gag ggc tgt gtg cat att ctg gat tca cag act gtt gtg ctg aaa gag	351
Glu Gly Cys Val His Ile Leu Asp Ser Gln Thr Val Val Leu Lys Glu	
80 85 90	
cct caa tgc atc ctt ggt cgg tta agt gaa aaa agc tca ggg cag atg	399
Pro Gln Cys Ile Leu Gly Arg Leu Ser Glu Lys Ser Ser Gly Gln Met	
95 100 105	
gca cag aaa ttc agt ttt tcc aag gtt ttt ggc cca gca act aca cag	447
Ala Gln Lys Phe Ser Phe Ser Lys Val Phe Gly Pro Ala Thr Thr Gln	
110 115 120 125	
aag gaa ttc ttt cag ggt tgc att atg caa cca gta aaa gac ctc ttg	495
Lys Glu Phe Phe Gln Gly Cys Ile Met Gln Pro Val Lys Asp Leu Leu	
130 135 140	
aaa gga cag agt cgt ctg att ttt act tac ggg cta acc aat tca gga	543
Lys Gly Gln Ser Arg Leu Ile Phe Thr Tyr Gly Leu Thr Asn Ser Gly	
145 150 155	
aaa aca tat aca ttt caa ggg aca gaa gaa aat att ggc att ctg cct	591
Lys Thr Tyr Thr Phe Gln Gly Thr Glu Glu Asn Ile Gly Ile Leu Pro	
160 165 170	
cga act ttg aat gta tta ttt gat agt ctt caa gaa aga ctg tat aca	639
Arg Thr Leu Asn Val Leu Phe Asp Ser Leu Gln Glu Arg Leu Tyr Thr	
175 180 185	
aag atg aac ctt aaa cca cat aga tcc aga gaa tac tta agg tta tca	687
Lys Met Asn Leu Lys Pro His Arg Ser Arg Glu Tyr Leu Arg Leu Ser	
190 195 200 205	
tca gaa caa gag aaa gaa gaa att gct agc aaa agt gca ttg ctt cgg	735
Ser Glu Gln Glu Lys Glu Glu Ile Ala Ser Lys Ser Ala Leu Leu Arg	
210 215 220	
caa att aaa gag gtt act gtg cat aat gat agt gat gat act ctt tat	783
Gln Ile Lys Glu Val Thr Val His Asn Asp Ser Asp Asp Thr Leu Tyr	
225 230 235	
gga agt tta act aac tct ttg aat atc tca gag ttt gaa gaa tcc ata	831
Gly Ser Leu Thr Asn Ser Leu Asn Ile Ser Glu Phe Glu Glu Ser Ile	
240 245 250	

ES 2 647 900 T3

aaa gat tat gaa caa gcc aac ttg aat atg gct aat agt ata aaa ttt	879
Lys Asp Tyr Glu Gln Ala Asn Leu Asn Met Ala Asn Ser Ile Lys Phe	
255 260 265	
tct gtg tgg gtt tct ttc ttt gaa att tac aat gaa tat att tat gac	927
Ser Val Trp Val Ser Phe Phe Glu Ile Tyr Asn Glu Tyr Ile Tyr Asp	
270 275 280 285	
tta ttt gtt cct gta tca tct aaa ttc caa aag aga aag atg ctg cgc	975
Leu Phe Val Pro Val Ser Ser Lys Phe Gln Lys Arg Lys Met Leu Arg	
290 295 300	
ctt tcc caa gac gta aag ggc tat tct ttt ata aaa gat cta caa tgg	1023
Leu Ser Gln Asp Val Lys Gly Tyr Ser Phe Ile Lys Asp Leu Gln Trp	
305 310 315	
att caa gta tct gat tcc aaa gaa gcc tat aga ctt tta aaa cta gga	1071
Ile Gln Val Ser Asp Ser Lys Glu Ala Tyr Arg Leu Leu Lys Leu Gly	
320 325 330	
ata aag cac cag agt gtt gcc ttc aca aaa ttg aat aat gct tcc agt	1119
Ile Lys His Gln Ser Val Ala Phe Thr Lys Leu Asn Asn Ala Ser Ser	
335 340 345	
aga agt cac agc ata ttc act gtt aaa ata tta cag att gaa gat tct	1167
Arg Ser His Ser Ile Phe Thr Val Lys Ile Leu Gln Ile Glu Asp Ser	
350 355 360 365	
gaa atg tct cgt gta att cga gtc agt gaa tta tct tta tgt gat ctt	1215
Glu Met Ser Arg Val Ile Arg Val Ser Glu Leu Ser Leu Cys Asp Leu	
370 375 380	
gct ggt tca gaa cga act atg aag aca cag aat gaa ggt gaa agg tta	1263
Ala Gly Ser Glu Arg Thr Met Lys Thr Gln Asn Glu Gly Glu Arg Leu	
385 390 395	
aga gag act ggg aat atc aac act tct tta ttg act ctg gga aag tgt	1311
Arg Glu Thr Gly Asn Ile Asn Thr Ser Leu Leu Thr Leu Gly Lys Cys	
400 405 410	
att aac gtc ttg aag aat agt gaa aag tca aag ttt caa cag cat gtg	1359
Ile Asn Val Leu Lys Asn Ser Glu Lys Ser Lys Phe Gln Gln His Val	
415 420 425	
cct ttc cgg gaa agt aaa ctg act cac tat ttt caa agt ttt ttt aat	1407
Pro Phe Arg Glu Ser Lys Leu Thr His Tyr Phe Gln Ser Phe Phe Asn	
430 435 440 445	
ggt aaa ggg aaa att tgt atg att gtc aat atc agc caa tgt tat tta	1455
Gly Lys Gly Lys Ile Cys Met Ile Val Asn Ile Ser Gln Cys Tyr Leu	
450 455 460	
gcc tat gat gaa aca ctc aat gta ttg aag ttc tcc gcc att gca caa	1503
Ala Tyr Asp Glu Thr Leu Asn Val Leu Lys Phe Ser Ala Ile Ala Gln	
465 470 475	
aaa gtt tgt gtc cca gac act tta aat tcc tct caa gag aaa tta ttt	1551
Lys Val Cys Val Pro Asp Thr Leu Asn Ser Ser Gln Glu Lys Leu Phe	
480 485 490	
gga cct gtc aaa tct tct caa gat gta tca cta gac agt aat tca aac	1599
Gly Pro Val Lys Ser Ser Gln Asp Val Ser Leu Asp Ser Asn Ser Asn	

ES 2 647 900 T3

495	500	505	
agt aaa ata tta aat gta	aaa aga gcc acc att tca	ttg gaa aat agt	1647
Ser Lys Ile Leu Asn Val	Lys Arg Ala Thr Ile Ser	Trp Glu Asn Ser	
510	515	520 525	
cta gaa gat ttg atg gaa	gac gag gat ttg gtt gag	gag cta gaa aac	1695
Leu Glu Asp Leu Met	Glu Asp Glu Thr Leu Val	Glu Glu Leu Glu Asn	
	530	535 540	
gct gaa gaa act caa aat	gtg gaa act aaa ctt ctt	gat gaa gat cta	1743
Ala Glu Glu Thr	Gln Asn Val Glu Thr	Lys Leu Leu Asp Glu Asp	Leu
	545	550 555	
gat aaa aca tta gag gaa	aat aag gct ttc att agc	cac gag gag aaa	1791
Asp Lys Thr Leu Glu	Glu Asn Lys Ala Phe Ile	Ser His Glu Glu Lys	
	560	565 570	
aga aaa ctg ttg gac tta	ata gaa gac ttg aaa aaa	aaa ctg ata aat	1839
Arg Lys Leu Leu Asp	Leu Ile Glu Asp Leu Lys	Lys Lys Leu Ile Asn	
	575	580 585	
gaa aaa aag gaa aaa tta	acc ttg gaa ttt aaa att	cga gaa gaa gtt	1887
Glu Lys Lys Glu Lys	Leu Thr Leu Glu Phe	Lys Ile Arg Glu Glu Val	
	595	600 605	
aca cag gag ttt act	cag tat ttg gct caa cgg	gaa gct gac ttt aag	1935
Thr Gln Glu Phe Thr	Gln Tyr Trp Ala Gln Arg	Glu Ala Asp Phe Lys	
	610	615 620	
gag act ctg ctt caa gaa	cga gag ata tta gaa gaa	aat gct gaa cgt	1983
Glu Thr Leu Leu Gln	Glu Arg Glu Ile Leu Glu	Glu Asn Ala Glu Arg	
	625	630 635	
cgt ttg gct atc ttc aag	gat ttg gtt ggt aaa tgt	gac act cga gaa	2031
Arg Leu Ala Ile Phe	Lys Asp Leu Val Gly Lys	Cys Asp Thr Arg Glu	
	640	645 650	
gaa gca gcg aaa gac att	tgt gcc aca aaa gtt gaa	act gaa gaa gct	2079
Glu Ala Ala Lys Asp	Ile Cys Ala Thr Lys Val	Glu Thr Glu Glu Ala	
	655	660 665	
act gct tgt tta gaa cta	aag ttt aat caa att aaa	gct gaa tta gct	2127
Thr Ala Cys Leu Glu	Leu Lys Phe Asn Gln Ile	Lys Ala Glu Leu Ala	
	670 675	680 685	
aaa acc aaa gga gaa tta	atc aaa acc aaa gaa gag	tta aaa aag aga	2175
Lys Thr Lys Gly Glu	Leu Ile Lys Thr Lys Glu	Glu Leu Lys Lys Arg	
	690	695 700	
gaa aat gaa tca gat tca	ttg att caa gag ctt gag	aca tct aat aag	2223
Glu Asn Glu Ser Asp	Ser Leu Ile Gln Glu Leu	Glu Thr Ser Asn Lys	
	705	710 715	
aaa ata att aca cag aat	caa aga att aaa gaa ttg	ata aat ata att	2271
Lys Ile Ile Thr Gln	Asn Gln Arg Ile Lys Glu	Leu Ile Asn Ile Ile	
	720	725 730	
gat caa aaa gaa gat act	atc aac gaa ttt cag aac	cta aag tct cat	2319
Asp Gln Lys Glu Asp	Thr Ile Asn Glu Phe Gln	Asn Leu Lys Ser His	
	735	740 745	
atg gaa aac aca ttt aaa	tgc aat gac aag gct gat	aca tct tct tta	2367

ES 2 647 900 T3

Met	Glu	Asn	Thr	Phe	Lys	Cys	Asn	Asp	Lys	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Leu		
750					755					760					765		
ata	ata	aac	aat	aaa	ttg	att	tgt	aat	gaa	aca	gtt	gaa	gta	cct	aag	2415	
Ile	Ile	Asn	Asn	Lys	Leu	Ile	Cys	Asn	Glu	Thr	Val	Glu	Val	Pro	Lys		
				770					775					780			
gac	agc	aaa	tct	aaa	atc	tgt	tca	gaa	aga	aaa	aga	gta	aat	gaa	aat	2463	
Asp	Ser	Lys	Ser	Lys	Ile	Cys	Ser	Glu	Arg	Lys	Arg	Val	Asn	Glu	Asn		
			785					790					795				
gaa	ctt	cag	caa	gat	gaa	cca	cca	gca	aag	aaa	ggg	tct	atc	cat	gtt	2511	
Glu	Leu	Gln	Gln	Asp	Glu	Pro	Pro	Ala	Lys	Lys	Gly	Ser	Ile	His	Val		
		800					805					810					
agt	tca	gct	atc	act	gaa	gac	caa	aag	aaa	agt	gaa	gaa	gtg	cga	ccg	2559	
Ser	Ser	Ala	Ile	Thr	Glu	Asp	Gln	Lys	Lys	Ser	Glu	Glu	Val	Arg	Pro		
	815					820					825						
aac	att	gca	gaa	att	gaa	gac	atc	aga	gtt	tta	caa	gaa	aat	aat	gaa	2607	
Asn	Ile	Ala	Glu	Ile	Glu	Asp	Ile	Arg	Val	Leu	Gln	Glu	Asn	Asn	Glu		
	830				835				840						845		
gga	ctg	aga	gca	ttt	tta	ctc	act	att	gag	aat	gaa	ctt	aaa	aat	gaa	2655	
Gly	Leu	Arg	Ala	Phe	Leu	Leu	Thr	Ile	Glu	Asn	Glu	Leu	Lys	Asn	Glu		
				850					855					860			
aag	gaa	gaa	aaa	gca	gaa	tta	aat	aaa	cag	att	gtt	cat	ttt	cag	cag	2703	
Lys	Glu	Glu	Lys	Ala	Glu	Leu	Asn	Lys	Gln	Ile	Val	His	Phe	Gln	Gln		
			865					870					875				
gaa	ctt	tct	ctt	tct	gaa	aaa	aag	aat	tta	act	tta	agt	aaa	gag	gtc	2751	
Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Asn	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Glu	Val		
		880					885					890					
caa	caa	att	cag	tca	aat	tat	gat	att	gca	att	gct	gaa	tta	cat	gtg	2799	
Gln	Gln	Ile	Gln	Ser	Asn	Tyr	Asp	Ile	Ala	Ile	Ala	Glu	Leu	His	Val		
		895				900					905						
cag	aaa	agt	aaa	aat	caa	gaa	cag	gag	gaa	aag	atc	atg	aaa	ttg	tca	2847	
Gln	Lys	Ser	Lys	Asn	Gln	Glu	Gln	Glu	Glu	Lys	Ile	Met	Lys	Leu	Ser		
	910				915					920				925			
aat	gag	ata	gaa	act	gct	aca	aga	agc	att	aca	aat	aat	gtt	tca	caa	2895	
Asn	Glu	Ile	Glu	Thr	Ala	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Asn	Asn	Val	Ser	Gln		
				930					935					940			
ata	aaa	tta	atg	cac	acg	aaa	ata	gac	gaa	cta	cgt	act	ctt	gat	tca	2943	
Ile	Lys	Leu	Met	His	Thr	Lys	Ile	Asp	Glu	Leu	Arg	Thr	Leu	Asp	Ser		
			945					950						955			
gtt	tct	cag	att	tca	aac	ata	gat	ttg	ctc	aat	ctc	agg	gat	ctg	tca	2991	
Val	Ser	Gln	Ile	Ser	Asn	Ile	Asp	Leu	Leu	Asn	Leu	Arg	Asp	Leu	Ser		
		960					965						970				
aat	ggt	tct	gag	gag	gat	aat	ttg	cca	aat	aca	cag	tta	gac	ctt	tta	3039	
Asn	Gly	Ser	Glu	Glu	Asp	Asn	Leu	Pro	Asn	Thr	Gln	Leu	Asp	Leu	Leu		
	975					980					985						
ggt	aat	gat	tat	ttg	gta	agt	aag	caa	gtt	aaa	gaa	tat	cga	att	caa	3087	
Gly	Asn	Asp	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Gln	Val	Lys	Glu	Tyr	Arg	Ile	Gln		
	990				995					1000					1005		

ES 2 647 900 T3

gaa ccc aat agg gaa aat tct ttc cac tct agt att gaa gct att Glu Pro Asn Arg Glu Asn Ser Phe His Ser Ser Ile Glu Ala Ile 1010 1015 1020	3132
tgg gaa gaa tgt aaa gag att gtg aag gcc tct tcc aaa aaa agt Trp Glu Glu Cys Lys Glu Ile Val Lys Ala Ser Ser Lys Lys Ser 1025 1030 1035	3177
cat cag att gag gaa ctg gaa caa caa att gaa aaa ttg cag gca His Gln Ile Glu Glu Leu Glu Gln Gln Ile Glu Lys Leu Gln Ala 1040 1045 1050	3222
gaa gta aaa gcc tat aag gat gaa aac aat aga cta aag gag aag Glu Val Lys Gly Tyr Lys Asp Glu Asn Asn Arg Leu Lys Glu Lys 1055 1060 1065	3267
gag cat aaa aac caa gat gac cta cta aaa gaa aaa gaa act ctt Glu His Lys Asn Gln Asp Asp Leu Leu Lys Glu Lys Glu Thr Leu 1070 1075 1080	3312
ata cag cag ctg aaa gaa gaa ttg caa gaa aaa aat gtt act ctt Ile Gln Gln Leu Lys Glu Glu Leu Gln Glu Lys Asn Val Thr Leu 1085 1090 1095	3357
gat gtt caa ata cag cat gta gtt gaa gga aag aga gcg ctt tca Asp Val Gln Ile Gln His Val Val Glu Gly Lys Arg Ala Leu Ser 1100 1105 1110	3402
gaa ctt aca caa ggt gtt act tgc tat aag gca aaa ata aag gaa Glu Leu Thr Gln Gly Val Thr Cys Tyr Lys Ala Lys Ile Lys Glu 1115 1120 1125	3447
ctt gaa aca att tta gag act cag aaa gtt gaa tgt agt cat tca Leu Glu Thr Ile Leu Glu Thr Gln Lys Val Glu Cys Ser His Ser 1130 1135 1140	3492
gcc aag tta gaa caa gac att ttg gaa aag gaa tct atc atc tta Ala Lys Leu Glu Gln Asp Ile Leu Glu Lys Glu Ser Ile Ile Leu 1145 1150 1155	3537
aag cta gaa aga aat ttg aag gaa ttt caa gaa cat ctt cag gat Lys Leu Glu Arg Asn Leu Lys Glu Phe Gln Glu His Leu Gln Asp 1160 1165 1170	3582
tct gtc aaa aac acc aaa gat tta aat gta aag gaa ctc aag ctg Ser Val Lys Asn Thr Lys Asp Leu Asn Val Lys Glu Leu Lys Leu 1175 1180 1185	3627
aaa gaa gaa atc aca cag tta aca aat aat ttg caa gat atg aaa Lys Glu Glu Ile Thr Gln Leu Thr Asn Asn Leu Gln Asp Met Lys 1190 1195 1200	3672
cat tta ctt caa tta aaa gaa gaa gaa gaa gaa acc aac agg caa His Leu Leu Gln Leu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Thr Asn Arg Gln 1205 1210 1215	3717
gaa aca gaa aaa ttg aaa gag gaa ctc tct gca agc tct gct cgt Glu Thr Glu Lys Leu Lys Glu Glu Leu Ser Ala Ser Ser Ala Arg 1220 1225 1230	3762
acc cag aat ctg aaa gca gat ctt cag agg aag gaa gaa gat tat Thr Gln Asn Leu Lys Ala Asp Leu Gln Arg Lys Glu Glu Asp Tyr 1235 1240 1245	3807

ES 2 647 900 T3

gct gac ctg aaa gag	aaa ctg act gat gcc	aaa aag cag att aag	3852
Ala Asp Leu Lys Glu	Lys Leu Thr Asp Ala	Lys Lys Gln Ile Lys	
	1250	1255 1260	
caa gta cag aaa gag	gta tct gta atg cgt	gat gag gat aaa tta	3897
Gln Val Gln Lys Glu	Val Ser Val Met Arg	Asp Glu Asp Lys Leu	
	1265	1270 1275	
ctg agg att aaa att	aat gaa ctg gag aaa	aag aaa aac cag tgt	3942
Leu Arg Ile Lys Ile	Asn Glu Leu Glu Lys	Lys Lys Asn Gln Cys	
	1280	1285 1290	
tct cag gaa tta gat	atg aaa cag cga acc	att cag caa ctc aag	3987
Ser Gln Glu Leu Asp	Met Lys Gln Arg Thr	Ile Gln Gln Leu Lys	
	1295	1300 1305	
gag cag tta aat aat	cag aaa gtg gaa gaa	gct ata caa cag tat	4032
Glu Gln Leu Asn Asn	Gln Lys Val Glu Glu	Ala Ile Gln Gln Tyr	
	1310	1315 1320	
gag aga gca tgc aaa	gat cta aat gtt aaa	gag aaa ata att gaa	4077
Glu Arg Ala Cys Lys	Asp Leu Asn Val Lys	Glu Lys Ile Ile Glu	
	1325	1330 1335	
gac atg cga atg aca	cta gaa gaa cag gaa	caa act cag gta gaa	4122
Asp Met Arg Met Thr	Leu Glu Glu Gln Glu	Gln Thr Gln Val Glu	
	1340	1345 1350	
cag gat caa gtg ctt	gag gct aaa tta gag	gaa gtt gaa agg ctg	4167
Gln Asp Gln Val Leu	Glu Ala Lys Leu Glu	Glu Val Glu Arg Leu	
	1355	1360 1365	
gcc aca gaa ttg gaa	aaa tgg aag gaa aaa	tgc aat gat ttg gaa	4212
Ala Thr Glu Leu Glu	Lys Trp Lys Glu Lys	Cys Asn Asp Leu Glu	
	1370	1375 1380	
acc aaa aac aat caa	agg tca aat aaa gaa	cat gag aac aac aca	4257
Thr Lys Asn Asn Gln	Arg Ser Asn Lys Glu	His Glu Asn Asn Thr	
	1385	1390 1395	
gat gtg ctt gga aag	ctc act aat ctt caa	gat gag tta cag gag	4302
Asp Val Leu Gly Lys	Leu Thr Asn Leu Gln	Asp Glu Leu Gln Glu	
	1400	1405 1410	
tct gaa cag aaa tat	aat gct gat aga aag	aaa tgg tta gaa gaa	4347
Ser Glu Gln Lys Tyr	Asn Ala Asp Arg Lys	Lys Trp Leu Glu Glu	
	1415	1420 1425	
aaa atg atg ctt atc	act caa gcg aaa gaa	gca gag aat ata cga	4392
Lys Met Met Leu Ile	Thr Gln Ala Lys Glu	Ala Glu Asn Ile Arg	
	1430	1435 1440	
aat aaa gag atg aaa	aaa tat gct gag gac	agg gag cgt ttt ttt	4437
Asn Lys Glu Met Lys	Lys Tyr Ala Glu Asp	Arg Glu Arg Phe Phe	
	1445	1450 1455	
aag caa cag aat gaa	atg gaa ata ctg aca	gcc cag ctg aca gag	4482
Lys Gln Gln Asn Glu	Met Glu Ile Leu Thr	Ala Gln Leu Thr Glu	
	1460	1465 1470	
aaa gat agt gac ctt	caa aag tgg cga gaa	gaa cga gat caa ctg	4527
Lys Asp Ser Asp Leu	Gln Lys Trp Arg Glu	Glu Arg Asp Gln Leu	

ES 2 647 900 T3

1475					1480					1485					
gtt	gca	gct	tta	gaa	ata	cag	cta	aaa	gca	ctg	ata	tcc	agt	aat	4572
Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Ile	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Ile	Ser	Ser	Asn	
				1490					1495					1500	
gta	cag	aaa	gat	aat	gaa	att	gaa	caa	cta	aaa	agg	atc	ata	tca	4617
Val	Gln	Lys	Asp	Asn	Glu	Ile	Glu	Gln	Leu	Lys	Arg	Ile	Ile	Ser	
				1505					1510					1515	
gag	act	tct	aaa	ata	gaa	aca	caa	atc	atg	gat	atc	aag	ccc	aaa	4662
Glu	Thr	Ser	Lys	Ile	Glu	Thr	Gln	Ile	Met	Asp	Ile	Lys	Pro	Lys	
				1520					1525					1530	
cgt	att	agt	tca	gca	gat	cct	gac	aaa	ctt	caa	act	gaa	cct	cta	4707
Arg	Ile	Ser	Ser	Ala	Asp	Pro	Asp	Lys	Leu	Gln	Thr	Glu	Pro	Leu	
				1535					1540					1545	
tcg	aca	agt	ttt	gaa	att	tcc	aga	aat	aaa	ata	gag	gat	gga	tct	4752
Ser	Thr	Ser	Phe	Glu	Ile	Ser	Arg	Asn	Lys	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	
				1550					1555					1560	
gta	gtc	ctt	gac	tct	tgt	gaa	gtg	tca	aca	gaa	aat	gat	caa	agc	4797
Val	Val	Leu	Asp	Ser	Cys	Glu	Val	Ser	Thr	Glu	Asn	Asp	Gln	Ser	
				1565					1570					1575	
act	cga	ttt	cca	aaa	cct	gag	tta	gag	att	caa	ttt	aca	cct	tta	4842
Thr	Arg	Phe	Pro	Lys	Pro	Glu	Leu	Glu	Ile	Gln	Phe	Thr	Pro	Leu	
				1580					1585					1590	
cag	cca	aac	aaa	atg	gca	gtg	aaa	cac	cct	ggt	tgt	acc	aca	cca	4887
Gln	Pro	Asn	Lys	Met	Ala	Val	Lys	His	Pro	Gly	Cys	Thr	Thr	Pro	
				1595					1600					1605	
gtg	aca	gtt	aag	att	ccc	aag	gct	cgg	aag	agg	aag	agt	aat	gaa	4932
Val	Thr	Val	Lys	Ile	Pro	Lys	Ala	Arg	Lys	Arg	Lys	Ser	Asn	Glu	
				1610					1615					1620	
atg	gag	gag	gac	ttg	gtg	aaa	tgt	gaa	aat	aag	aag	aat	gct	aca	4977
Met	Glu	Glu	Asp	Leu	Val	Lys	Cys	Glu	Asn	Lys	Lys	Asn	Ala	Thr	
				1625					1630					1635	
ccc	aga	act	aat	ttg	aaa	ttt	cct	att	tca	gat	gat	aga	aat	tct	5022
Pro	Arg	Thr	Asn	Leu	Lys	Phe	Pro	Ile	Ser	Asp	Asp	Arg	Asn	Ser	
				1640					1645					1650	
tct	gtc	aaa	aag	gaa	caa	aag	gtt	gcc	ata	cgt	cca	tca	tct	aag	5067
Ser	Val	Lys	Lys	Glu	Gln	Lys	Val	Ala	Ile	Arg	Pro	Ser	Ser	Lys	
				1655					1660					1665	
aaa	aca	tat	tct	tta	cgg	agt	cag	gca	tcc	ata	att	ggt	gta	aac	5112
Lys	Thr	Tyr	Ser	Leu	Arg	Ser	Gln	Ala	Ser	Ile	Ile	Gly	Val	Asn	
				1670					1675					1680	
ctg	gcc	act	aag	aaa	aaa	gaa	gga	aca	cta	cag	aaa	ttt	gga	gac	5157
Leu	Ala	Thr	Lys	Lys	Lys	Glu	Gly	Thr	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Asp	
				1685					1690					1695	
ttc	tta	caa	cat	tct	ccc	tca	att	ctt	caa	tca	aaa	gca	aag	aag	5202
Phe	Leu	Gln	His	Ser	Pro	Ser	Ile	Leu	Gln	Ser	Lys	Ala	Lys	Lys	
				1700					1705					1710	
ata	att	gaa	aca	atg	agc	tct	tca	aag	ctc	tca	aat	gta	gaa	gca	5247

ES 2 647 900 T3

Ile Ile Glu Thr Met	Ser Ser Ser Lys Leu	Ser Asn Val Glu Ala	
1715	1720	1725	
agt aaa gaa aat gtg	tct caa cca aaa cga	gcc aaa cgg aaa tta	5292
Ser Lys Glu Asn Val	Ser Gln Pro Lys Arg	Ala Lys Arg Lys Leu	
1730	1735	1740	
tac aca agt gaa att	tca tct cct att gat	ata tca ggc caa gtg	5337
Tyr Thr Ser Glu Ile	Ser Ser Pro Ile Asp	Ile Ser Gly Gln Val	
1745	1750	1755	
att tta atg gac cag	aaa atg aag gag agt	gat cac cag att atc	5382
Ile Leu Met Asp Gln	Lys Met Lys Glu Ser	Asp His Gln Ile Ile	
1760	1765	1770	
aaa cga cga ctt cga	aca aaa aca gcc aaa	taa atcacttatg	5425
Lys Arg Arg Leu Arg	Thr Lys Thr Ala Lys		
1775	1780		
gaaatgttta atataaattt tatagtcata gtcattggaa cttgcatcct gtattgtaaa 5485			
tataaatgta tatattatgc attaaatcac tctgcatata gattgctggt ttatacatag 5545			
tataatttta attcaataaa tgagtcaaaa tttgtatatt tttataaggc tttttataa 5605			
tagcttcttt caaactgtat tccctatta tctcagacat tggatcagtg aagatcctag 5665			
gaaagaggct gttattctca tttatittgc tatacaggat gtaataggtc aggtatttgg 5725			
tttacttata tttacaatg tcttatgaat ttttttact ttatctgta tacaactgat 5785			
ttacatatc tgtttggatt atagctagga tttggagaat aagtgtgtac agatcacaaa 5845			
acatgtatat acattattta gaaaagatct caagtcttta attagaatgt ctcacttatt 5905			
ttgtaaacat tttgtgggta catagtacat gtatatattt acggggtatg tgagatgttt 5965			
tgacacaggc atgcaatgtg aaatacgtgt atcatggaga atgaggtatc catcccctca 6025			
agcatttttc ctttgaatta cagataatcc aattacattc tttagatcat ttaaaaatat 6085			
acaagtaagt tattattgat tatagtcact ctattgtgct atcagatagt agatcattct 6145			
ttttatctta tttgtttttg taccattaa ccatcccac ctcccctgc aaccgtcagt 6205			
acccttacca gccactggta accattcttc tactctgtat gcccatgagg tcaattgatt 6265			
ttatTTTTtag atcccataaa taaatgagaa catgcagtct ttgtcaaaaa aaaa 6319			

<210> 126

<211> 1780

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Met Glu Ser Asn Phe Asn Gln Glu Gly Val Pro Arg Pro Ser Tyr Val
1 5 10 15

Phe Ser Ala Asp Pro Ile Ala Arg Pro Ser Glu Ile Asn Phe Asp Gly
20 25 30

10

ES 2 647 900 T3

Ile Lys Leu Asp Leu Ser His Glu Phe Ser Leu Val Ala Pro Asn Thr
 35 40 45

Glu Ala Asn Ser Phe Glu Ser Lys Asp Tyr Leu Gln Val Cys Leu Arg
 50 55 60

Ile Arg Pro Phe Thr Gln Ser Glu Lys Glu Leu Glu Ser Glu Gly Cys
 65 70 75 80

Val His Ile Leu Asp Ser Gln Thr Val Val Leu Lys Glu Pro Gln Cys
 85 90 95

Ile Leu Gly Arg Leu Ser Glu Lys Ser Ser Gly Gln Met Ala Gln Lys
 100 105 110

Phe Ser Phe Ser Lys Val Phe Gly Pro Ala Thr Thr Gln Lys Glu Phe
 115 120 125

Phe Gln Gly Cys Ile Met Gln Pro Val Lys Asp Leu Leu Lys Gly Gln
 130 135 140

Ser Arg Leu Ile Phe Thr Tyr Gly Leu Thr Asn Ser Gly Lys Thr Tyr
 145 150 155 160

Thr Phe Gln Gly Thr Glu Glu Asn Ile Gly Ile Leu Pro Arg Thr Leu
 165 170 175

Asn Val Leu Phe Asp Ser Leu Gln Glu Arg Leu Tyr Thr Lys Met Asn
 180 185 190

Leu Lys Pro His Arg Ser Arg Glu Tyr Leu Arg Leu Ser Ser Glu Gln
 195 200 205

Glu Lys Glu Glu Ile Ala Ser Lys Ser Ala Leu Leu Arg Gln Ile Lys
 210 215 220

Glu Val Thr Val His Asn Asp Ser Asp Asp Thr Leu Tyr Gly Ser Leu
 225 230 235 240

Thr Asn Ser Leu Asn Ile Ser Glu Phe Glu Glu Ser Ile Lys Asp Tyr
 245 250 255

Glu Gln Ala Asn Leu Asn Met Ala Asn Ser Ile Lys Phe Ser Val Trp
 260 265 270

Val Ser Phe Phe Glu Ile Tyr Asn Glu Tyr Ile Tyr Asp Leu Phe Val

ES 2 647 900 T3

275		280		285
Pro Val Ser Ser Lys Phe Gln Lys Arg Lys Met Leu Arg Leu Ser Gln 290		295		300
Asp Val Lys Gly Tyr Ser Phe Ile Lys Asp Leu Gln Trp Ile Gln Val 305		310		315
Ser Asp Ser Lys Glu Ala Tyr Arg Leu Leu Lys Leu Gly Ile Lys His 325		330		335
Gln Ser Val Ala Phe Thr Lys Leu Asn Asn Ala Ser Ser Arg Ser His 340		345		350
Ser Ile Phe Thr Val Lys Ile Leu Gln Ile Glu Asp Ser Glu Met Ser 355		360		365
Arg Val Ile Arg Val Ser Glu Leu Ser Leu Cys Asp Leu Ala Gly Ser 370		375		380
Glu Arg Thr Met Lys Thr Gln Asn Glu Gly Glu Arg Leu Arg Glu Thr 385		390		395
Gly Asn Ile Asn Thr Ser Leu Leu Thr Leu Gly Lys Cys Ile Asn Val 405		410		415
Leu Lys Asn Ser Glu Lys Ser Lys Phe Gln Gln His Val Pro Phe Arg 420		425		430
Glu Ser Lys Leu Thr His Tyr Phe Gln Ser Phe Phe Asn Gly Lys Gly 435		440		445
Lys Ile Cys Met Ile Val Asn Ile Ser Gln Cys Tyr Leu Ala Tyr Asp 450		455		460
Glu Thr Leu Asn Val Leu Lys Phe Ser Ala Ile Ala Gln Lys Val Cys 465		470		475
Val Pro Asp Thr Leu Asn Ser Ser Gln Glu Lys Leu Phe Gly Pro Val 485		490		495
Lys Ser Ser Gln Asp Val Ser Leu Asp Ser Asn Ser Asn Ser Lys Ile 500		505		510
Leu Asn Val Lys Arg Ala Thr Ile Ser Trp Glu Asn Ser Leu Glu Asp 515		520		525

ES 2 647 900 T3

Leu Met Glu Asp Glu Asp Leu Val Glu Glu Leu Glu Asn Ala Glu Glu
530 535 540

Thr Gln Asn Val Glu Thr Lys Leu Leu Asp Glu Asp Leu Asp Lys Thr
545 550 555 560

Leu Glu Glu Asn Lys Ala Phe Ile Ser His Glu Glu Lys Arg Lys Leu
565 570 575

Leu Asp Leu Ile Glu Asp Leu Lys Lys Lys Leu Ile Asn Glu Lys Lys
580 585 590

Glu Lys Leu Thr Leu Glu Phe Lys Ile Arg Glu Glu Val Thr Gln Glu
595 600 605

Phe Thr Gln Tyr Trp Ala Gln Arg Glu Ala Asp Phe Lys Glu Thr Leu
610 615 620

Leu Gln Glu Arg Glu Ile Leu Glu Glu Asn Ala Glu Arg Arg Leu Ala
625 630 635 640

Ile Phe Lys Asp Leu Val Gly Lys Cys Asp Thr Arg Glu Glu Ala Ala
645 650 655

Lys Asp Ile Cys Ala Thr Lys Val Glu Thr Glu Glu Ala Thr Ala Cys
660 665 670

Leu Glu Leu Lys Phe Asn Gln Ile Lys Ala Glu Leu Ala Lys Thr Lys
675 680 685

Gly Glu Leu Ile Lys Thr Lys Glu Glu Leu Lys Lys Arg Glu Asn Glu
690 695 700

Ser Asp Ser Leu Ile Gln Glu Leu Glu Thr Ser Asn Lys Lys Ile Ile
705 710 715 720

Thr Gln Asn Gln Arg Ile Lys Glu Leu Ile Asn Ile Ile Asp Gln Lys
725 730 735

Glu Asp Thr Ile Asn Glu Phe Gln Asn Leu Lys Ser His Met Glu Asn
740 745 750

Thr Phe Lys Cys Asn Asp Lys Ala Asp Thr Ser Ser Leu Ile Ile Asn
755 760 765

Asn Lys Leu Ile Cys Asn Glu Thr Val Glu Val Pro Lys Asp Ser Lys
770 775 780

ES 2 647 900 T3

Ser Lys Ile Cys Ser Glu Arg Lys Arg Val Asn Glu Asn Glu Leu Gln
785 790 795 800

Gln Asp Glu Pro Pro Ala Lys Lys Gly Ser Ile His Val Ser Ser Ala
805 810 815

Ile Thr Glu Asp Gln Lys Lys Ser Glu Glu Val Arg Pro Asn Ile Ala
820 825 830

Glu Ile Glu Asp Ile Arg Val Leu Gln Glu Asn Asn Glu Gly Leu Arg
835 840 845

Ala Phe Leu Leu Thr Ile Glu Asn Glu Leu Lys Asn Glu Lys Glu Glu
850 855 860

Lys Ala Glu Leu Asn Lys Gln Ile Val His Phe Gln Gln Glu Leu Ser
865 870 875 880

Leu Ser Glu Lys Lys Asn Leu Thr Leu Ser Lys Glu Val Gln Gln Ile
885 890 895

Gln Ser Asn Tyr Asp Ile Ala Ile Ala Glu Leu His Val Gln Lys Ser
900 905 910

Lys Asn Gln Glu Gln Glu Glu Lys Ile Met Lys Leu Ser Asn Glu Ile
915 920 925

Glu Thr Ala Thr Arg Ser Ile Thr Asn Asn Val Ser Gln Ile Lys Leu
930 935 940

Met His Thr Lys Ile Asp Glu Leu Arg Thr Leu Asp Ser Val Ser Gln
945 950 955 960

Ile Ser Asn Ile Asp Leu Leu Asn Leu Arg Asp Leu Ser Asn Gly Ser
965 970 975

Glu Glu Asp Asn Leu Pro Asn Thr Gln Leu Asp Leu Leu Gly Asn Asp
980 985 990

Tyr Leu Val Ser Lys Gln Val Lys Glu Tyr Arg Ile Gln Glu Pro Asn
995 1000 1005

Arg Glu Asn Ser Phe His Ser Ser Ile Glu Ala Ile Trp Glu Glu
1010 1015 1020

Cys Lys Glu Ile Val Lys Ala Ser Ser Lys Lys Ser His Gln Ile
1025 1030 1035

ES 2 647 900 T3

Glu Glu Leu Glu Gln Gln Ile Glu Lys Leu Gln Ala Glu Val Lys
 1040 1045 1050
 Gly Tyr Lys Asp Glu Asn Asn Arg Leu Lys Glu Lys Glu His Lys
 1055 1060 1065
 Asn Gln Asp Asp Leu Leu Lys Glu Lys Glu Thr Leu Ile Gln Gln
 1070 1075 1080
 Leu Lys Glu Glu Leu Gln Glu Lys Asn Val Thr Leu Asp Val Gln
 1085 1090 1095
 Ile Gln His Val Val Glu Gly Lys Arg Ala Leu Ser Glu Leu Thr
 1100 1105 1110
 Gln Gly Val Thr Cys Tyr Lys Ala Lys Ile Lys Glu Leu Glu Thr
 1115 1120 1125
 Ile Leu Glu Thr Gln Lys Val Glu Cys Ser His Ser Ala Lys Leu
 1130 1135 1140
 Glu Gln Asp Ile Leu Glu Lys Glu Ser Ile Ile Leu Lys Leu Glu
 1145 1150 1155
 Arg Asn Leu Lys Glu Phe Gln Glu His Leu Gln Asp Ser Val Lys
 1160 1165 1170
 Asn Thr Lys Asp Leu Asn Val Lys Glu Leu Lys Leu Lys Glu Glu
 1175 1180 1185
 Ile Thr Gln Leu Thr Asn Asn Leu Gln Asp Met Lys His Leu Leu
 1190 1195 1200
 Gln Leu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Thr Asn Arg Gln Glu Thr Glu
 1205 1210 1215
 Lys Leu Lys Glu Glu Leu Ser Ala Ser Ser Ala Arg Thr Gln Asn
 1220 1225 1230
 Leu Lys Ala Asp Leu Gln Arg Lys Glu Glu Asp Tyr Ala Asp Leu
 1235 1240 1245
 Lys Glu Lys Leu Thr Asp Ala Lys Lys Gln Ile Lys Gln Val Gln
 1250 1255 1260
 Lys Glu Val Ser Val Met Arg Asp Glu Asp Lys Leu Leu Arg Ile

ES 2 647 900 T3

1265		1270		1275
Lys Ile Asn Glu Leu Glu	Lys Lys Lys Asn Gln	Cys Ser Gln Glu		
1280	1285	1290		
Leu Asp Met Lys Gln Arg	Thr Ile Gln Gln Leu	Lys Glu Gln Leu		
1295	1300	1305		
Asn Asn Gln Lys Val Glu	Glu Ala Ile Gln Gln	Tyr Glu Arg Ala		
1310	1315	1320		
Cys Lys Asp Leu Asn Val	Lys Glu Lys Ile Ile	Glu Asp Met Arg		
1325	1330	1335		
Met Thr Leu Glu Glu Gln	Glu Gln Thr Gln Val	Glu Gln Asp Gln		
1340	1345	1350		
Val Leu Glu Ala Lys Leu	Glu Glu Val Glu Arg	Leu Ala Thr Glu		
1355	1360	1365		
Leu Glu Lys Trp Lys Glu	Lys Cys Asn Asp Leu	Glu Thr Lys Asn		
1370	1375	1380		
Asn Gln Arg Ser Asn Lys	Glu His Glu Asn Asn	Thr Asp Val Leu		
1385	1390	1395		
Gly Lys Leu Thr Asn Leu	Gln Asp Glu Leu Gln	Glu Ser Glu Gln		
1400	1405	1410		
Lys Tyr Asn Ala Asp Arg	Lys Lys Trp Leu Glu	Glu Lys Met Met		
1415	1420	1425		
Leu Ile Thr Gln Ala Lys	Glu Ala Glu Asn Ile	Arg Asn Lys Glu		
1430	1435	1440		
Met Lys Lys Tyr Ala Glu	Asp Arg Glu Arg Phe	Phe Lys Gln Gln		
1445	1450	1455		
Asn Glu Met Glu Ile Leu	Thr Ala Gln Leu Thr	Glu Lys Asp Ser		
1460	1465	1470		
Asp Leu Gln Lys Trp Arg	Glu Glu Arg Asp Gln	Leu Val Ala Ala		
1475	1480	1485		
Leu Glu Ile Gln Leu Lys	Ala Leu Ile Ser Ser	Asn Val Gln Lys		
1490	1495	1500		

ES 2 647 900 T3

Asp Asn Glu Ile Glu Gln Leu Lys Arg Ile Ile Ser Glu Thr Ser
 1505 1510 1515

Lys Ile Glu Thr Gln Ile Met Asp Ile Lys Pro Lys Arg Ile Ser
 1520 1525 1530

Ser Ala Asp Pro Asp Lys Leu Gln Thr Glu Pro Leu Ser Thr Ser
 1535 1540 1545

Phe Glu Ile Ser Arg Asn Lys Ile Glu Asp Gly Ser Val Val Leu
 1550 1555 1560

Asp Ser Cys Glu Val Ser Thr Glu Asn Asp Gln Ser Thr Arg Phe
 1565 1570 1575

Pro Lys Pro Glu Leu Glu Ile Gln Phe Thr Pro Leu Gln Pro Asn
 1580 1585 1590

Lys Met Ala Val Lys His Pro Gly Cys Thr Thr Pro Val Thr Val
 1595 1600 1605

Lys Ile Pro Lys Ala Arg Lys Arg Lys Ser Asn Glu Met Glu Glu
 1610 1615 1620

Asp Leu Val Lys Cys Glu Asn Lys Lys Asn Ala Thr Pro Arg Thr
 1625 1630 1635

Asn Leu Lys Phe Pro Ile Ser Asp Asp Arg Asn Ser Ser Val Lys
 1640 1645 1650

Lys Glu Gln Lys Val Ala Ile Arg Pro Ser Ser Lys Lys Thr Tyr
 1655 1660 1665

Ser Leu Arg Ser Gln Ala Ser Ile Ile Gly Val Asn Leu Ala Thr
 1670 1675 1680

Lys Lys Lys Glu Gly Thr Leu Gln Lys Phe Gly Asp Phe Leu Gln
 1685 1690 1695

His Ser Pro Ser Ile Leu Gln Ser Lys Ala Lys Lys Ile Ile Glu
 1700 1705 1710

Thr Met Ser Ser Ser Lys Leu Ser Asn Val Glu Ala Ser Lys Glu
 1715 1720 1725

Asn Val Ser Gln Pro Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Tyr Thr Ser
 1730 1735 1740

Glu Ile Ser Ser Pro Ile Asp Ile Ser Gly Gln Val Ile Leu Met
 1745 1750 1755

Asp Gln Lys Met Lys Glu Ser Asp His Gln Ile Ile Lys Arg Arg
 1760 1765 1770

Leu Arg Thr Lys Thr Ala Lys
 1775 1780

<210> 127
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Una secuencia de cebador

<400> 127
10 gtctaccagg cattcgcttc at 22

<210> 128
<211> 24
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Una secuencia de cebador

20 <400> 128
tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 129
<211> 21
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Una secuencia de cebador

30 <400> 129
tcagaaatcc ttctcttga c 21

<210> 130
35 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de cebador

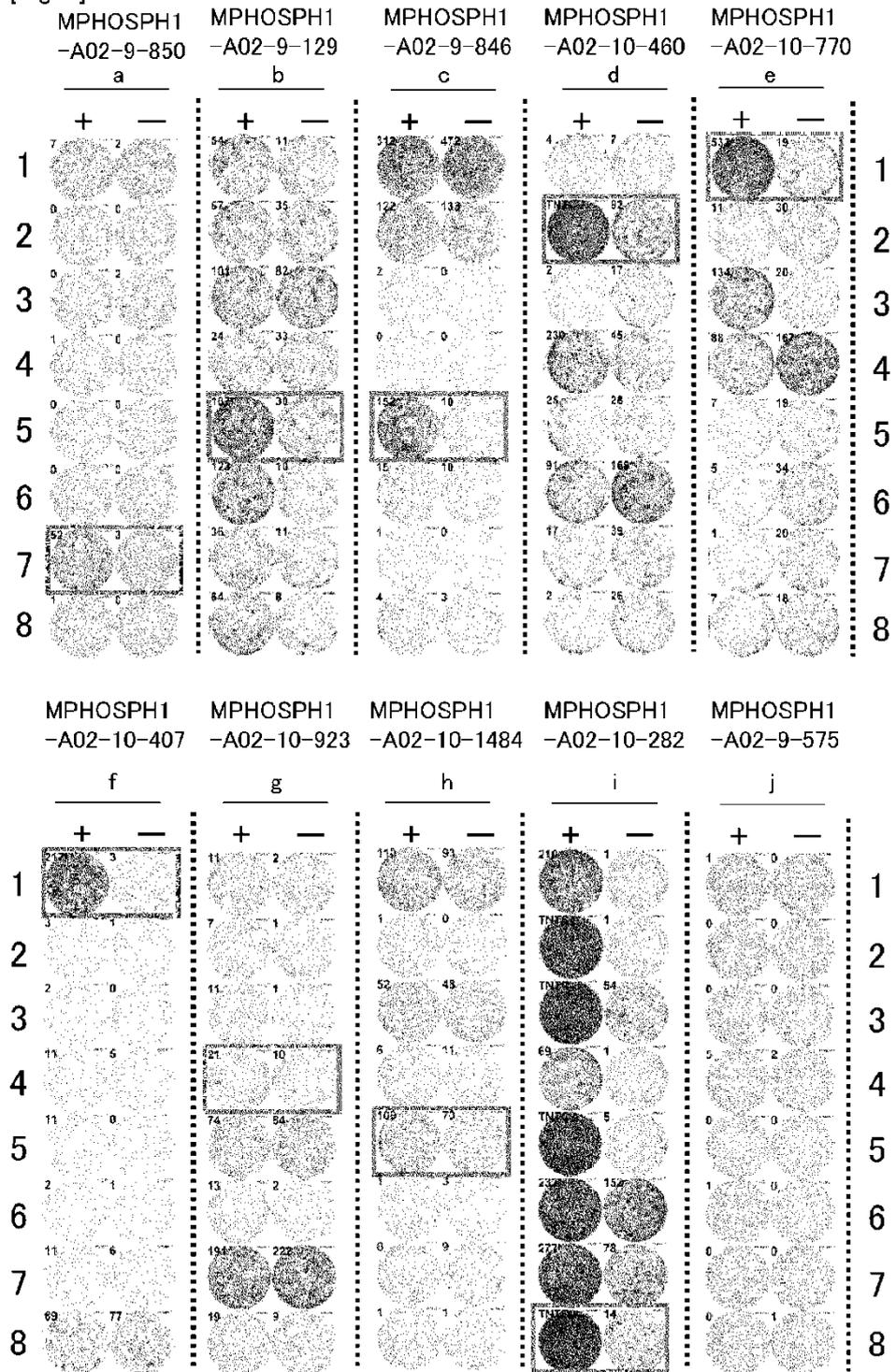
<400> 130

5 ctagcctctg gaatccttc tctt 24

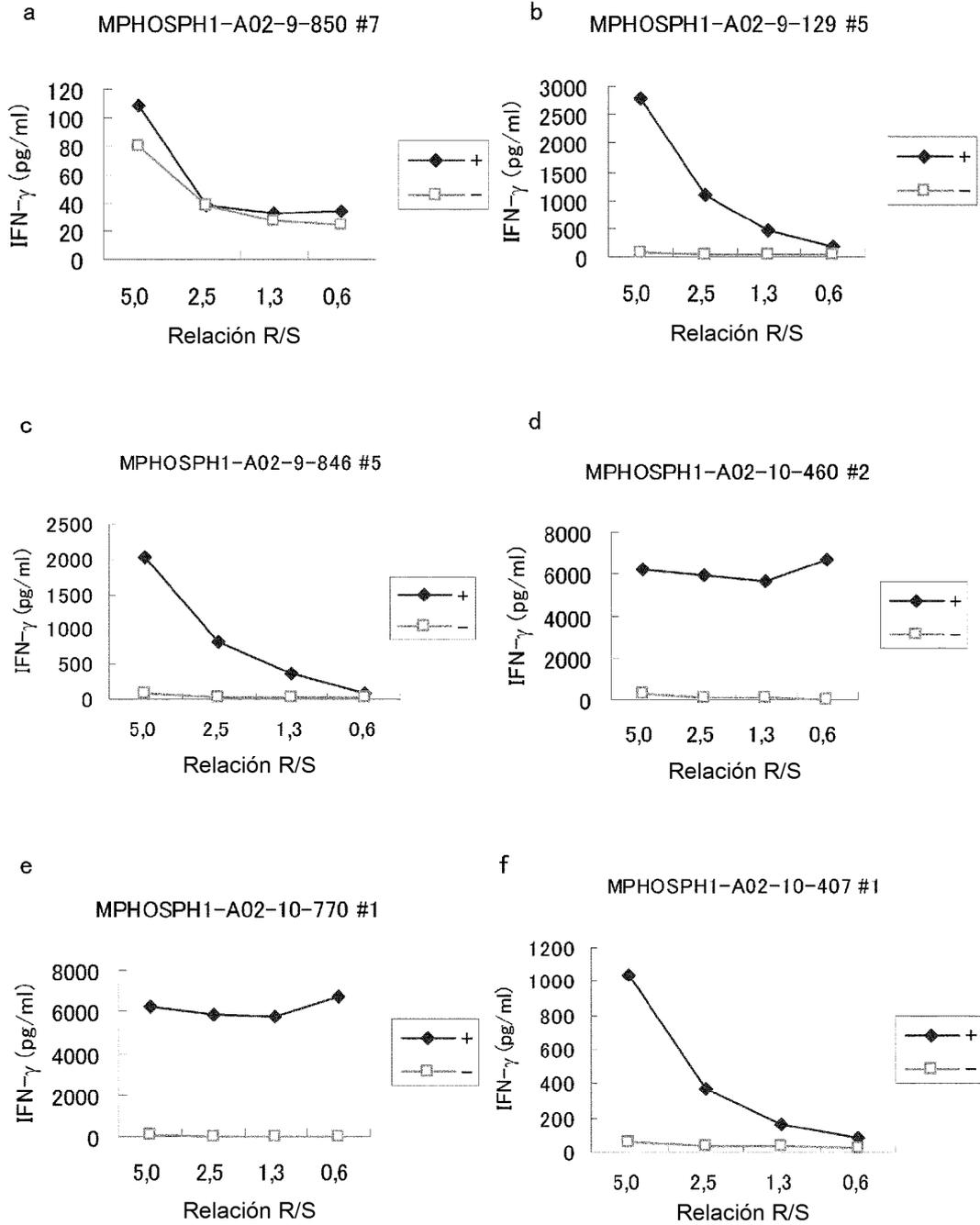
REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.
2. Un polinucleótido aislado que consiste en un polinucleótido que codifica el péptido de la reivindicación 1.
- 5 3. Una composición para inducir un linfocito T citotóxico (CTL) o una composición para inducir una célula presentadora de antígeno (APC) que tiene inducibilidad de CTL, en la que la composición comprende el péptido de la reivindicación 1, o el polinucleótido de la reivindicación 2.
4. Un método *in vitro* de inducción de una célula presentadora de antígeno (APC) que tiene inducibilidad de CTL, comprendiendo dicho método una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) poner en contacto una APC con el péptido de la reivindicación 1, y
 - 10 (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de la reivindicación 1 en una APC.
5. Un método *in vitro* de inducción de un CTL, comprendiendo dicho método una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la reivindicación 1; y
 - 15 (b) co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la reivindicación 1.
6. Una composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) el péptido de la reivindicación 1;
 - 20 (b) el polinucleótido que codifica el péptido de la reivindicación 1;
 - (c) una APC que presenta un complejo del péptido de la reivindicación 1 y un antígeno HLA sobre su superficie; y
 - (d) un exosoma que presenta un complejo del péptido de la reivindicación 1 y un antígeno HLA sobre su superficie.
- 25 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento del cáncer, la profilaxis del cáncer o inducción de una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en la que la composición farmacéutica se formula para ser administrada a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2.
- 30 9. Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la reivindicación 1.
10. La APC de la reivindicación 9, que se induce por el método de la reivindicación 4.

[Fig. 1]



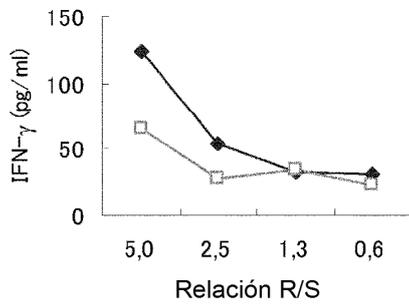
[Fig. 2a-f]



[Fig. 2g-i]

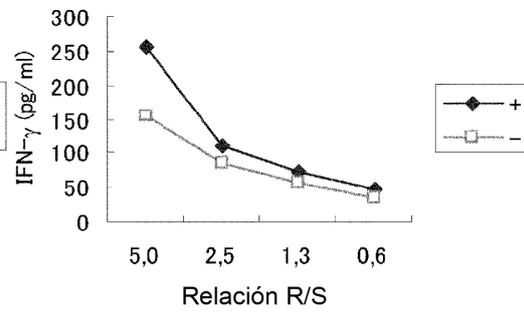
g

MPHOSPH1-A02-10-923 #4



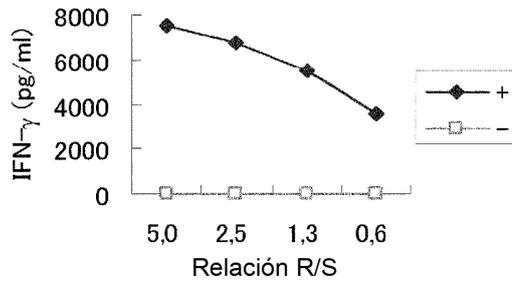
h

MPHOSPH1-A02-10-1484 #5

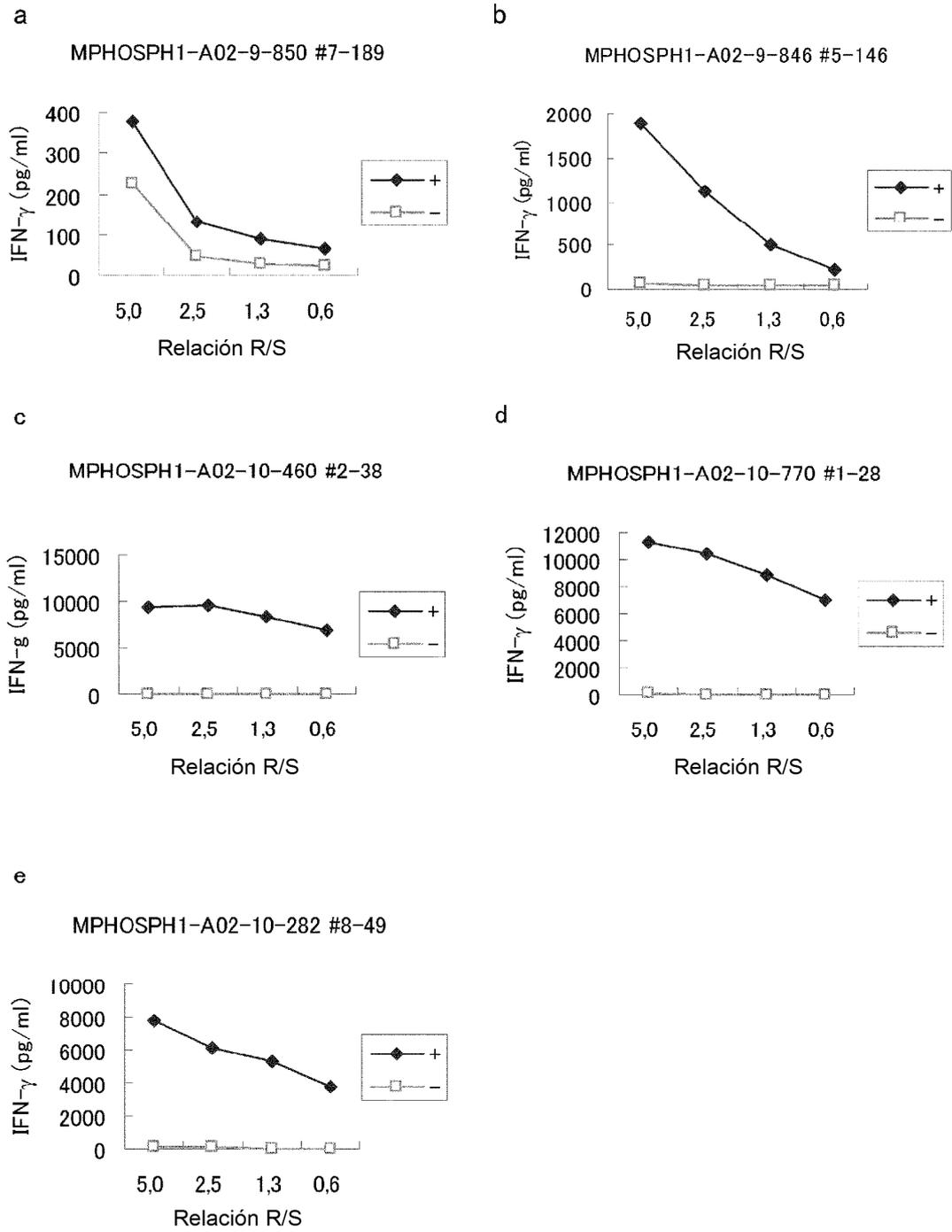


i

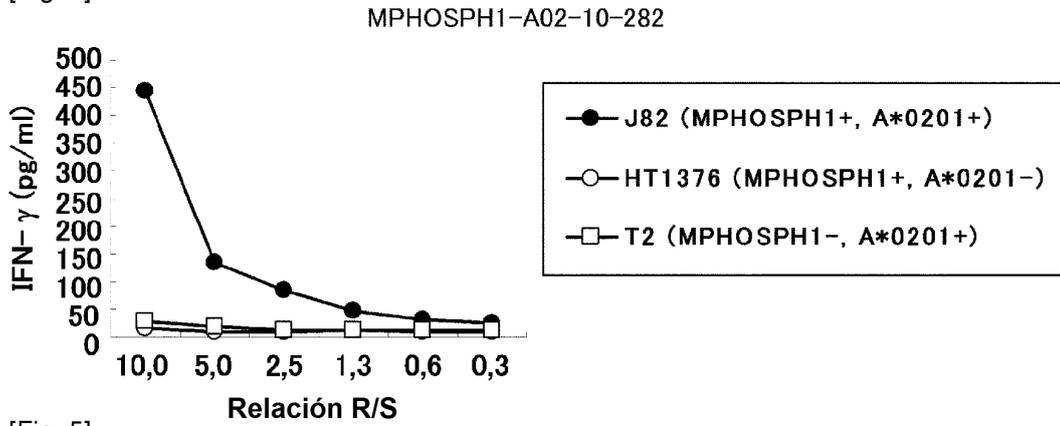
MPHOSPH1-A02-10-282 #8



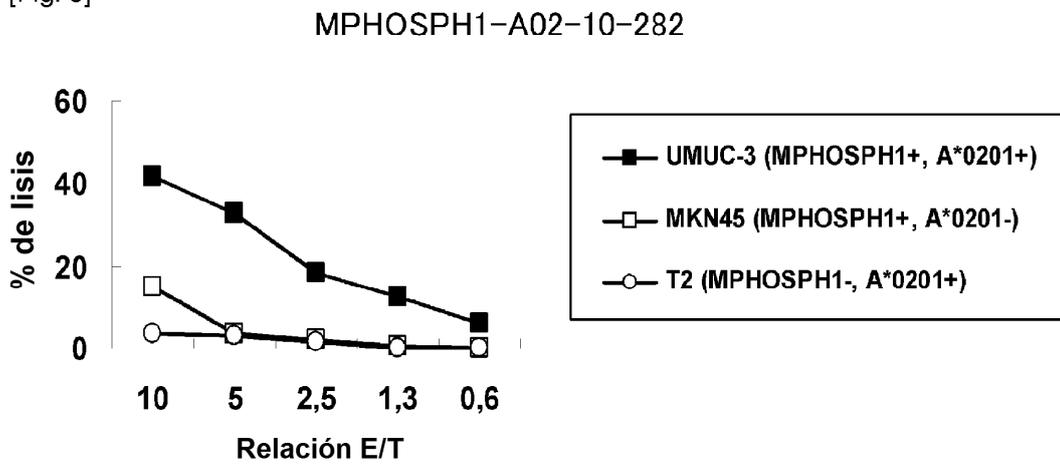
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]

