

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 437**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2011 PCT/JP2011/001909**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO11122022**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011 E 11762265 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2553096**

54 Título: **Péptidos de ECT2 y vacunas que incluyen los mismos**

30 Prioridad:

02.04.2010 US 320577 P

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

20.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 655 437 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 de ECT2 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 contra en cáncer. En particular, la presente invención se refiere a nuevos péptidos que son extremadamente eficaces como vacunas contra el cáncer así como fármacos para tratar y prevenir tumores.

Técnica anterior

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

15 TAAs favorables son indispensables para la proliferación y la supervivencia de células cancerosas. El uso de estos TAAs como dianas para inmunoterapia puede minimizar el riesgo bien descrito del escape inmunitario de células cancerosas atribuible a la eliminación, la mutación o la regulación a la baja de TAAs como consecuencia de una selección inmunitaria conducida terapéutica mente. Según esto, la identificación de nuevos TAAs capaces de inducir respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas garantiza un desarrollo adicional y está en marcha la investigación clínica de estrategias de vacunación con péptidos para diversos tipos de cáncer (NPL 3, Harris CC, J Natl Cancer Inst 16 de octubre de 1996, 88(20): 1442-55; NPL 4, Butterfield LH y cols., Cancer Res 1 de julio de 1999, 59(13): 3134-42; NPL 5, Vissers JL y cols., Cancer Res 1 de noviembre de 1999, 59(21): 5554-9; NPL 6, van der Burg SH y cols., J Immunol 1 de mayo de 1996, 156(9): 3308-14; NPL 7, Tanaka F y cols., Cancer Res 15 de octubre de 1997, 57(20): 4465-8; NPL 8, Fujie T y cols., Int J Cancer enero de 1999, 80(2): 169-72; NPL 9, Kikuchi M y cols., Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81(3): 459-66; NPL 10, Oiso M y cols., Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81(3): 387-94). Hasta la fecha, se han presentado varias pruebas clínicas que usan estos péptidos derivados de antígeno asociados a tumores. Desgraciadamente, muchas de las pruebas de vacunas contra el cáncer actuales han mostrado solo una baja tasa de respuesta buscada (NPL 11, Belli F y cols., J Clin Oncol 15 de octubre de 2002, 20(20): 4169-80; NPL 12, Coulie PG y cols., Immunol Rev octubre de 2002, 188: 33-42; NPL 13, Rosenberg SA y cols., Nat Med septiembre de 2004, 10(9): 909-15). Según esto, sigue habiendo una necesidad de nuevos TAAs como dianas inmunoterapéuticas.

35 El oncogén de secuencia 2 transformante de células epiteliales (ECT2) (Nº de Registro del GenBank AY376439; p. ej., SEQ ID No: 41) se ha descubierto a partir de los transcritos identificados como regulados al alza en el cáncer. El gen de ECT2 se regula al alza específicamente en las células tumorales de diversos cánceres, incluyendo, pero no limitados a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC), linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer pulmonar microcítico (SCLC) y así es de particular interés para la presente invención (PTL 1, documento WO2007/013671; PTL 2, documento WO2008/102557; PTL 3, documento WO2010/007791). En particular, los péptidos inmunogénicos derivados de ECT2 pueden encontrar uso en la destrucción selectiva de células tumorales que expresan estos antígenos.

45 Lista de citas

Bibliografía no relacionada con las patentes

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

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

[NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 16 de octubre de 1996, 88(20): 1442-55

50 [NPL 4] Butterfield LH y cols., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42

[NPL 5] Vissers JL y cols., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9

[NPL 6] van der Burg SH y cols., J Immunol 1 de mayo de 1996, 156(9): 3308-14

[NPL 7] Tanaka F y cols., Cancer Res 15 de octubre de 1997, 57(20): 4465-8

[NPL 8] Fujie T y cols., Int J Cancer 18 de enero de 1999 18, 80(2): 169-72

[NPL 9] Kikuchi M y cols., Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81(3): 459-66

5 [NPL 10] Oiso M y cols., Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81(3): 387-94

[NPL 11] Belli F y cols., J Clin Oncol 15 de octubre de 2002, 20(20): 4169-80

[NPL 12] Coulie PG y cols., Immunol Rev octubre de 2002, 188: 33-42

[NPL 13] Rosenberg SA y cols., Nat Med septiembre de 2004, 10(9): 909-15

Bibliografía de patentes

10 [PTL 1] documento WO2007/013671

[PTL 2] documento WO2008/102557

[PTL 3] documento WO2010/007791

Sumario de la invención

15 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de las dianas adecuadas de inmunoterapia. Debido a que los TAA's son percibidos generalmente por el sistema inmunitario como "propios" y por lo tanto a menudo no tienen inmunogenicidad, el descubrimiento de dianas apropiadas es de extrema importancia. Reconociendo que ECT2 (SEQ ID NO: 42 codificada por el gen de N° de Registro del GenBank AY376439 (por ejemplo, SEQ ID NO: 41)) se ha identificado como regulado al alza en cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC, la presente invención pone el foco en ECT2 como un candidato para la diana de la inmunoterapia de cánceres/tumores, más particularmente nuevos péptidos epitópicos de ECT2 que pueden servir como dianas inmunoterapéuticas adecuadas.

20

25 A este fin, la presente invención se dirige, al menos en parte, a la identificación de péptidos epitópicos específicos entre los productos génicos de ECT2 que posean la capacidad para inducir CTLs específicos para ECT2. Según se analiza con detalle posteriormente, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) obtenidas de un donante sano se estimularon usando péptidos candidatos que se unen a HLA-A*0201 derivados de ECT2. A continuación, las líneas de CTL se establecieron con citotoxicidad específica contra las células diana positivas a HLA-A2 impulsadas con cada uno de los péptidos candidatos. Los resultados de la presente demuestran que estos péptidos son péptidos epitópicos restringidos a HLA-A2 que pueden inducir respuestas inmunitarias potentes y específicas contra células que expresan ECT2. Estos resultados demuestran además que ECT2 es fuertemente inmunogénico y los epítomos del mismo son dianas eficaces para la inmunoterapia de cánceres/tumores.

30

35 Según esto, un objetivo de la presente invención proporciona péptidos aislados que se unen a antígeno HLA, incluyendo ECT2 (SEQ ID NO: 42) y los fragmentos inmunológicamente activos del mismo. Se espera que estos péptidos tengan inducibilidad hacia CTL y, así, se pueden usar para inducir CTL ex vivo o para ser administrados a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias con cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC. Los péptidos pueden ser nonapéptidos y decapeptidos y pueden tener la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOS: 1 a 40. Los péptidos que tenían una secuencia amínica seleccionada entre SEQ ID NOS: 1, 3 y 21 mostraban una fuerte inducibilidad hacia CTL y así se prefieren particularmente.

40

45 La presente divulgación también contempla péptidos modificados que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOS: 1 a 40 en las que uno, dos o más aminoácidos están sustituidos, insertados, eliminados o añadidos, con la condición de que los péptidos modificados retengan la inducibilidad hacia CTL requerida del péptido original.

La presente invención abarca además polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de los péptidos de la presente invención según se define en las reivindicaciones. Estos polinucleótidos se pueden usar para inducir o preparar APCs con inducibilidad hacia CTL o, como los péptidos de la presente invención, se pueden usar para la administración a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres.

Cuando se administran a un sujeto, los presentes péptidos se presentan sobre la superficie de APCs a fin de inducir la orientación de CTLs a los péptidos respectivos. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar agentes, composiciones y/o sustancias que incluyan o incorporen cualesquiera péptidos o polinucleótidos de la presente invención para inducir CTLs. Estos agentes, composiciones y sustancias se pueden usar para el tratamiento y/o la profilaxis y/o la recaída posoperatoria de cánceres, especialmente cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC. Así, otro objetivo más de la presente invención es proporcionar agentes farmacéuticos, composiciones y/o sustancias para el tratamiento y/o la profilaxis y/o la prevención de la recaída posoperatoria de cáncer que incluyan o incorporen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención. En lugar de o además de los presentes péptidos o polinucleótidos, los agentes farmacéuticos, las composiciones y la sustancias de la presente invención pueden incluir como ingredientes activos APCs o exosomas que presentan cualquiera de los presentes péptidos.

Los péptidos o polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para inducir APCs que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y uno de los presentes péptidos, por ejemplo, al poner en contacto APCs derivadas de un sujeto con el péptido o introducir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en APCs. Estas APCs tienen alta inducibilidad hacia CTL contra péptidos diana y encuentran uso en la inmunoterapia contra el cáncer. Según esto, la presente invención abarca los métodos para inducir APCs con inducibilidad hacia CTL así como APCs obtenidas mediante estos métodos según se define en las reivindicaciones.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método para inducir CTL, incluyendo estos métodos la etapa de cocultivar células positivas a CD8 con APCs o exosomas que presentan el péptido de la presente invención sobre su superficie o la etapa de introducir un gen que incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido de una subunidad del receptor de células T (TCR) que se une al presente péptido. Los CTLs obtenidos mediante estos métodos encuentran uso en el tratamiento y/o la prevención de cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC. Por lo tanto, otro objetivo más de la presente invención es proporcionar CTLs obtenidos mediante los presentes métodos.

También se divulgan en la presente métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra cáncer en un sujeto que necesite la misma, incluyendo estos métodos la etapa de administrar composiciones o sustancias que incluyan los polipéptidos de ECT2 o fragmentos inmunológicamente activos de los mismos, polinucleótidos que codifican polipéptidos de ECT2, exosomas o las APCs que presentan polipéptidos de ECT2.

La aplicabilidad de la presente invención se extiende a cualquiera de un número de enfermedades que se relacionan con o surgen de la sobreexpresión de ECT2, tales como cáncer, ejemplos del cual incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal and SCLC.

Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

1. Un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un péptido aislado, que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 3 y 21, y

(b) un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 3 y 21, en la que 1 o 2 aminoácidos están sustituidos o añadidos, con la condición de que dicho péptido modificado retenga la inducibilidad hacia CTL del péptido original.

2. El péptido aislado del punto 1, en donde el péptido tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido procedente del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 3 o 21 está sustituido por un aminoácido de metionina; y

(b) el aminoácido C-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 3 o 21 está sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina o leucina.

3. El péptido aislado del punto 1, en donde el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 3 y 21.
4. Un polinucleótido aislado que codifica el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3.
5. Una composición para inducir un CTL, en donde la composición comprende uno o más péptidos de uno cualquiera de los puntos 1 a 3, o uno o más polinucleótidos del punto 4.
6. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la recaída posoperatoria del cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende uno o más péptidos de uno cualquiera de los puntos 1 a 3 o uno o más polinucleótidos del punto 4.
7. La composición farmacéutica del punto 6, en donde dicha composición farmacéutica se formula para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2.
8. La composición farmacéutica del punto 6 o 7, en donde dicha composición farmacéutica se formula para el tratamiento del cáncer.
9. Un método para inducir una célula que presenta antígeno (APC) con inducibilidad hacia CTL, comprendiendo el método una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- 15 (a) poner en contacto una APC con un péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3 in vitro o ex vivo, y
- (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3 en una APC in vitro.
10. Un método in vitro para inducir un CTL, comprendiendo el método una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- 20 (a) cocultivar células T positivas a CD8 con APCs que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3;
- (b) cocultivar células T positivas a CD8 con exosomas que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3; y
- (c) introducir un gen que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de una subunidad del receptor de células T (TCR) que se une al péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3 en una célula T.
- 25 11. Una APC aislada que presente sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3.
12. La APC del punto 11, que se induce mediante el métodos del punto 9.
13. Un CTL aislado que se dirige al péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3.
14. El CTL del punto 13, que se induce mediante el método del punto 10.
- 30 15. Una composición que comprende el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3, o un polinucleótido que codifica el péptido para el uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto que lo necesite.
16. Un anticuerpo que es específico para el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3.
- 35 17. Un vector que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3.
18. Un estuche de diagnóstico que comprende el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3, el polinucleótido del punto 4 o el anticuerpo del punto 16.

Además de lo anterior, otros objetivos y características de la invención se harán más completamente evidentes cuando la siguiente descripción detallada se lea junto con las figuras y los ejemplos adjuntos.

- Objetivos, características, beneficios y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de este sumario y ciertas realizaciones descritas posteriormente, y serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Estos objetivos, características, beneficios y ventajas se harán evidentes a partir de lo anterior junto con los ejemplos, datos, figuras adjuntos y todas las inferencias razonables que se extraigan de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

- Diversos aspectos y aplicaciones de la presente invención se harán evidentes para el experto al tener en cuenta la breve descripción de las figuras y la descripción detallada de la presente invención y sus realizaciones preferidas que siguen.

[fig. 1] La Figura 1 está compuesta por una serie de fotografías, (a) a (c), que representan los resultados de ensayos ELISPOT de IFN-gamma sobre CTLs que eran inducidos con péptidos derivados de ECT2. Los CTLs en el número de pocillo nº 6 se estimularon con ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a), en el número de pocillo nº 5 se estimularon con ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) (b) y en el número de pocillo nº 1 se estimularon con ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (c) mostraba una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. El recuadro sobre el pocillo de estas fotos indica que las células del pocillo correspondiente se expandían para establecer líneas de CTL. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana impulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no impulsadas con péptidos.

[fig. 2] La Figura 2 está compuesta por una serie de gráficos lineales, (a) a (c), que representan los resultados de un ensayo de ELISA de IFN-gamma que demuestra la producción de IFN-gamma de líneas de CTL estimuladas con (a) ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1), (b) ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) y (c) ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21). Los resultados demuestran que las líneas de CTL establecidas mediante estimulación con cada péptido muestran una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control en las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana impulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no impulsadas con péptidos.

[fig. 3] La Figura 3 representa un par de gráficos lineales, (a) y (b), que representan la producción de IFN-gamma de clones de CTL establecidos mediante dilución limitativa a partir de las líneas de CTL estimuladas con (a) ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) y (b) ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3). Los resultados demuestran que los clones de CTL establecidos mediante la estimulación con cada péptido mostraban una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana impulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no impulsadas con péptidos.

[fig. 4] La Figura 4 representa un par de gráficos lineales, (a) y (b), que representan la actividad de CTL específica frente a células diana que expresan exógenamente ECT2 y HLA-A*0201. Se prepararon como control células COS7 transfectadas con HLA-A*0201 o la longitud completa del gen de ECT2. El clon de CTL establecido con ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a) y la línea de CTL establecida con ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (b) mostraban actividad de CTL específica frente a células COS7 transfectadas tanto con ECT2 como con HLA-A*0201 (círculo negro). Por otra parte, no se detectaba una actividad de CTL específica significativa frente a células diana que expresaban bien HLA-A*0201 (triángulo) o bien ECT2 (círculo blanco).

Descripción de realizaciones

Nada en la presente se debe considerar una admisión de que la invención no tenga derecho a anteceder a tal divulgación en virtud o antes de la invención.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, controlará la presente memoria, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

I. Definiciones

Las palabras "un", "uno(a)" y "el/la", según se usan en la presente, significan "al menos uno" a menos que se indique específicamente otra cosa.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan intercambiamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácido en los que uno o más

residuos de aminoácido pueden ser residuos modificados, o residuos no naturales, tales como un mimético o miméticos químicos artificiales de un aminoácido o aminoácidos presentes en la naturaleza correspondientes, así como a polímeros de aminoácidos presentes en la naturaleza.

5 El término "oligopéptido" usado a veces en la presente memoria descriptiva se usa para referirse a péptidos de la presente divulgación que tienen una longitud de 20 residuos o menos, típicamente 15 residuos o menos y típicamente está compuesto por entre aproximadamente 8 y aproximadamente 11 residuos, a menudo 9 o 10 residuos.

10 El término "aminoácido", según se usa en la presente, se refiere a aminoácidos presentes en la naturaleza y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos presentes en la naturaleza. El aminoácido puede ser bien L-aminoácidos o bien D-aminoácidos. Los aminoácidos presentes en la naturaleza son los codificados por el código genético, así como los modificados después de la traducción en células (p. ej., hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina). La expresión
15 "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) que un aminoácido presente en la naturaleza pero tienen uno o más grupos R modificados o esqueletos modificados (p. ej., homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metioninametil sulfóxido). La expresión "mimético de aminoácido" se refiere a compuestos químicos que tienen diferentes estructuras pero funciones similares a los aminoácidos generales.

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

25 Los términos "gen", "polinucleótidos", "nucleótidos" y "ácidos nucleicos" se usan intercambiamente en la presente y, a menos que se indique específicamente otra cosa, son similares a los aminoácidos mencionados por sus códigos de tres letras aceptados comúnmente.

Los términos "agente", "sustancia" y "composición", que se usan intercambiamente en la presente, se refieren a un producto que incluye los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto
30 que resulte, directamente o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas. Estos términos, cuando se usan en relación con el modificador "farmacéutico" (p. ej., "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica"), están destinados a abarcar un producto que incluye el ingrediente o los ingredientes activos y cualquier ingrediente o ingredientes inertes que constituyan el portador, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de cualesquiera dos o
35 más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Según esto, en el contexto de la presente invención, los términos "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica" se refieren a cualquier producto elaborado al mezclar una molécula o un compuesto de la presente invención y un portador farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

40 La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" o "portador fisiológicamente aceptable", según se usa en la presente, significa un material, una composición, una sustancia o un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables, incluyendo, pero no limitados a, una carga, un diluyente, un excipiente, un disolvente o un material encapsulante líquido o sólido, implicado en el soporte o el transporte de los farmacóforos andamiados del sujeto desde un órgano, o una porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo.

45 Los agentes o las composiciones farmacéuticas de la presente invención encuentran un uso particular como vacunas. En el contexto de la presente invención, la expresión "vacuna" (también denominada una "composición inmunogénica") se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad antitumoral al inocular en animales.

50 El término "ingrediente activo" se refiere en la presente a una sustancia en un agente o una composición que es biológicamente o fisiológicamente activo. Particularmente, en el contexto de un agente o una composición farmacéuticas, el término "ingrediente activo" se refiere a una sustancia que muestra un efecto farmacológico objetivo. Por ejemplo, en el caso de agentes o composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento o la
55 prevención del cáncer, los ingredientes activos en los agentes o las composiciones pueden conducir a al menos una acción biológica o fisiológica sobre células y/o tejidos cancerosos directamente o indirectamente. Esta acción puede incluir reducir o inhibir el crecimiento de células cancerosas, dañar o destruir células y/o tejidos cancerosos, etc. Típicamente, el efecto indirecto de los ingredientes activos son inducciones de CTLs que reconocen o destruyen células cancerosas. Antes de formularse, el "ingrediente activo" también se puede denominar "principio activo",
60 "sustancia farmacológica" o "producto técnico".

A menos que se defina de otro modo, el término "cáncer" se refiere a los cánceres que sobreexpresan el gen ECT2, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático,
65 cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC.

A menos que se definan de otro modo, los términos "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" se usan intercambiamente en la presente y, a menos que se indique específicamente otra cosa, se refieren a un subgrupo de linfocitos T que son capaces de reconocer células extrañas (p. ej., células tumorales/cancerosas, células infectadas con virus) e inducir la muerte de estas células.

A menos que se defina otra cosa, el término "HLA-A2", según se usa en la presente, 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.

A menos que se defina otra cosa, el término "estuche", según se usa en la presente, se usa en referencia a una combinación de reactivos u otros materiales. Se contempla en la presente que el estuche puede incluir una micromatriz, un chip, un marcador, etc. No se pretende que el término "estuche" esté limitado a una combinación particular de reactivos y/o materiales.

Según se usa en la presente, en el contexto de un sujeto o paciente, la expresión "positivo a HLA-A2" se refiere a que el sujeto o paciente posee homocigóticamente o heterocigóticamente gen de antígeno HLA-A2, y antígeno HLA-A2 se expresa en células del sujeto o paciente como un antígeno HLA.

En la medida en que los métodos y las composiciones de la presente invención encuentren uso en el contexto del "tratamiento" del cáncer, un tratamiento se considera "eficaz" si conduce a un beneficio clínico tal como reducción en la expresión del gen ECT2, o una disminución en el tamaño, la prevalencia o el potencial metastásico del cáncer en el sujeto. Cuando el tratamiento se aplica profilácticamente, "eficaz" significa que retarda o previene la formación de cánceres o previene o alivia un síntoma clínico del cáncer. La eficacia se determina en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar el tipo de tumor particular.

En la medida en que los métodos y las composiciones de la presente invención encuentren utilidad en el contexto de la "prevención" y la "profilaxis" del cáncer, estos términos se usan intercambiamente en la presente para referirse a cualquier actividad que reduzca la carga de mortalidad o morbilidad de la enfermedad. La prevención y la profilaxis se pueden producir "a niveles de prevención primario, secundario y terciario". Mientras que la prevención y la profilaxis primarias evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles secundario y terciario de prevención y profilaxis abarcan actividades dirigidas a la prevención y la profilaxis del avance de una enfermedad y la aparición de síntomas así como reducir el impacto negativo de una enfermedad ya establecida al restaurar la función y reducir complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y la profilaxis pueden incluir una amplia gama de terapias profilácticas dirigidas a aliviar la gravedad del trastorno particular, p. ej. reducir la proliferación y metástasis de tumores.

El tratamiento y/o la profilaxis del cáncer y/o la prevención de la recaída posoperatoria del mismo pueden incluir cualquiera de las siguientes etapas, tales como la extirpación quirúrgica de células cancerosas, la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la involución o regresión de un tumor, la inducción de la remisión y la supresión de la presencia del cáncer, la regresión de un tumor y la reducción o la inhibición de metástasis. El tratamiento y/o la 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 la mejora de síntomas constituye el tratamiento y/o la profilaxis eficaces incluyen 10%, 20%, 30% o más de reducción, o una 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 indicada o péptido de la misma. Un anticuerpo puede incluir anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos fusionados a otras proteínas o radiomarcadores, y fragmentos de anticuerpo. Por otra parte, un anticuerpo se usa en la presente en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej. anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo con la condición de que exhiban la actividad biológica deseada. Un "anticuerpo" indica todas las clases (p. ej. IgA, IgD, IgE, IgG y IgM).

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por un experto en la técnica norma a la que pertenece la presente invención.

II. Péptidos

Para demostrar que los péptidos derivados de ECT2 funcionan como un antígeno reconocido por CTLs, se analizaron péptidos derivados de ECT2 (SEQ ID NO: 42) para determinar si eran epitopos antigénicos restringidos por HLA-A2 que son alelos de HLA comúnmente encontrados (Date Y y cols., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A y cols., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT y cols., J Immunol 152: 3913-24, 1994).

ES 2 655 437 T3

Se identificaron candidatos de péptidos que se unen a HLA-A2 derivados de ECT2, basándose en sus afinidades de unión a HLA-A2. Se identificaron los siguientes péptidos candidatos:

- ECT2-A2-9-34 (SEQ ID NO: 1),
- ECT2-A2-9-619 (SEQ ID NO: 2),
- 5 ECT2-A2-9-664 (SEQ ID NO: 3),
- ECT2-A2-9-662 (SEQ ID NO: 4),
- ECT2-A2-9-634 (SEQ ID NO: 5),
- ECT2-A2-9-145 (SEQ ID NO: 6),
- ECT2-A2-9-561 (SEQ ID NO: 7),
- 10 ECT2-A2-9-98 (SEQ ID NO: 8),
- ECT2-A2-9-575 (SEQ ID NO: 9),
- ECT2-A2-9-240 (SEQ ID NO: 10),
- ECT2-A2-9-292 (SEQ ID NO: 11),
- ECT2-A2-9-823 (SEQ ID NO: 12),
- 15 ECT2-A2-9-220 (SEQ ID NO: 13),
- ECT2-A2-9-755 (SEQ ID NO: 14),
- ECT2-A2-9-357 (SEQ ID NO: 15),
- ECT2-A2-9-438 (SEQ ID NO: 16),
- ECT2-A2-9-874 (SEQ ID NO: 17),
- 20 ECT2-A2-9-568 (SEQ ID NO: 18),
- ECT2-A2-9-166 (SEQ ID NO: 19),
- ECT2-A2-9-443 (SEQ ID NO: 20),
- ECT2-A2-10-33 (SEQ ID NO: 21),
- ECT2-A2-10-633 (SEQ ID NO: 22),
- 25 ECT2-A2-10-144 (SEQ ID NO: 23),
- ECT2-A2-10-701 (SEQ ID NO: 24),
- ECT2-A2-10-754 (SEQ ID NO: 25),
- ECT2-A2-10-557 (SEQ ID NO: 26),
- ECT2-A2-10-191 (SEQ ID NO: 27),

- ECT2-A2-10-774 (SEQ ID NO: 28),
 ECT2-A2-10-428 (SEQ ID NO: 29),
 ECT2-A2-10-618 (SEQ ID NO: 30),
 ECT2-A2-10-97 (SEQ ID NO: 31),
 5 ECT2-A2-10-20 (SEQ ID NO: 32),
 ECT2-A2-10-574 (SEQ ID NO: 33)
 ECT2-A2-10-461 (SEQ ID NO: 34),
 ECT2-A2-10-664 (SEQ ID NO: 35),
 ECT2-A2-10-575 (SEQ ID NO: 36),
 10 ECT2-A2-10-430 (SEQ ID NO: 37),
 ECT2-A2-10-511 (SEQ ID NO: 38),
 ECT2-A2-10-471 (SEQ ID NO: 39) y
 ECT2-A2-10-87 (SEQ ID NO: 40).

15 Por otra parte, después de la estimulación in vitro de células T mediante células dendríticas (DCs) impulsadas (cargadas) con estos péptidos, los CTLs se establecieron satisfactoriamente al estimular las DCs con cada uno de los siguientes péptidos;

- ECT2-A2-9-34 (SEQ ID NO: 1),
 ECT2-A2-9-664 (SEQ ID NO: 3) y
 ECT2-A2-10-33 (SEQ ID NO: 21).

20 Estos CTLs establecidos mostraban una potente actividad específica de CTL contra células diana impulsadas con los péptidos respectivos. Estos resultados demuestran que ECT2 es un antígeno reconocido por CTLs y que los péptidos probados son péptidos epitópicos de ECT2 restringidos por HLA-A2.

25 Puesto que el gen ECT2 se sobreexpresa en células cancerosas tales como cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC y no se expresa en la mayoría de los órganos normales, es una buena diana para la inmunoterapia del cáncer. Así, la presente invención proporciona nonapéptidos (péptidos compuestos por nueve residuos de aminoácido) y decapeptidos (péptidos compuestos por diez residuos de aminoácido) de epítomos reconocidos por CTL procedentes de ECT2 según se define en las reivindicaciones. Alternativamente, la presente divulgación proporciona péptidos aislados que se unen a antígenos HLA e inducen linfocitos T citotóxicos (CTLs), en donde el péptido tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 42 o es un fragmento inmunológicamente activo del mismo. Más específicamente, se divulgan péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NOs: 1 a 40.

35 Generalmente, se pueden usar programas de software ahora disponibles, por ejemplo, en Internet, tales como los descritos en Parker KC y cols., J Immunol 1 de enero de 1994, 152(1): 163-75 y Nielsen M y cols., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, para calcular las afinidades de unión entre diversos péptidos y antígenos HLA informáticamente. La afinidad de unión con antígenos HLA se puede medir según se describe, por ejemplo, en Parker KC y cols., J Immunol 1 de enero de 1994, 152(1): 163-75, Kuzushima K y cols., Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV y cols. 40 BMC Bioinformatics. 31 de octubre de 2007; 8: 424, Buus S y cols. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003, Nielsen M y cols., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, y Nielsen M y cols. PLoS ONE 2007; 2: e796, que se resumen, p. ej., en Lafuente EM y cols., Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220. Métodos para determinar la afinidad de unión se describen, por ejemplo, en the Journal of Immunological Methods (1995, 185: 181-190) y Protein Science

(2000, 9: 1838-1846). Por lo tanto, se pueden usar estos programas de software para seleccionar los fragmentos derivados de ECT2 que tengan alta afinidad de unión con antígenos HLA. Según esto, se divulgan péptidos compuestos por cualesquiera fragmentos derivados de ECT2, que se determinaría que se unen con antígenos HLA mediante estos programas conocidos. Por otra parte, estos péptidos pueden incluir el péptido compuesto por toda la longitud de ECT2.

Los nonapéptidos y decapeptidos pueden estar flanqueados por residuos de aminoácido adicionales con la condición de que los péptidos retengan su inducibilidad hacia CTL. Los residuos de aminoácido adicionales particulares pueden estar compuestos por cualquier tipo de aminoácidos con la condición de que no deterioren la inducibilidad hacia CTL del péptido original. Así, la presente divulgación abarca péptidos que tienen una afinidad de unión para antígenos HLA, incluyendo péptidos derivados de ECT2. Estos péptidos tienen, por ejemplo, menos de aproximadamente 40 aminoácidos, a menudo menos de aproximadamente 20 aminoácidos, habitualmente menos de aproximadamente 15 aminoácidos.

Generalmente, se sabe que las modificaciones de uno o más aminoácidos en un péptido no influyen en la función del péptido, o en algunos casos incluso potencian la función deseada de la proteína original. De hecho, se ha mostrado que los péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos por una secuencia de aminoácidos modificada al sustituir eliminar, insertar y/o añadir uno, dos o varios residuos de aminoácido a una secuencia de referencia original) retienen la actividad biológica del péptido original (Mark y cols., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland y cols., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13).

Así, el péptido que tiene inducibilidad hacia CTL puede estar compuesto por un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1 a 40, en donde uno, dos o incluso más aminoácidos se añaden, insertan, eliminan y/o sustituyen.

Los expertos en la técnica reconocerán que las adiciones eliminaciones, inserciones y/o sustituciones individuales en una secuencia de aminoácidos que alterar un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos da como resultado la conservación de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original; se denomina así "sustitución conservativa" o "modificación conservativa", en donde la alteración de una proteína da como resultado una proteína con funciones similares. Tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Ejemplos de propiedades de las cadenas laterales de los 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 un átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene un grupo aromático (H, F, Y, W). Además, los ocho grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

1) Alanina (A), Glicina (G);

2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);

7) Serina (S), Treonina (T); y

8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, p. ej., Creighton, Proteins 1984).

También se considera que estos péptidos modificados conservativamente son péptidos de la presente invención. Sin embargo, el péptido de la presente invención no se restringe a los mismos y puede incluir modificaciones no conservativas, con la condición de que el péptido modificado resultante retenga la inducibilidad hacia CTL requerida del péptido original. Por otra parte, los péptidos modificados no deben excluir péptidos inducibles de CTL de variantes polimórficas, homólogos entre diferentes especies y alelos de ECT2.

Los residuos de aminoácido se pueden insertar, sustituir o añadir a los péptidos o, alternativamente, los residuos de aminoácido se pueden eliminar de los mismos para alcanzar una afinidad de unión superior. Para retener la

inducibilidad hacia CTL requerida, se puede modificar (inserciones, eliminaciones, adiciones y/o sustituciones) solo un pequeño número (por ejemplo, 1, 2 o varios) o un pequeño porcentaje de aminoácidos. En la presente, el término "varios" significa 5 o menos aminoácidos, por ejemplo, 4 o 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos que se va a modificar puede ser, por ejemplo, 20% o menos, 15% o menos, 10% o menos o de 1 a 5%.

5 Cuando se usan en el contexto de la inmunoterapia del cáncer, los presentes péptidos se pueden presentar sobre la superficie de una célula o un exosoma como un complejo con un antígeno HLA. Por lo tanto, es preferible seleccionar péptidos que no solo induzcan CTLs sino que también posean alta afinidad de unión al antígeno HLA. A este fin, los péptidos se pueden modificar mediante eliminación, sustitución, inserción y/o adición de los residuos de aminoácido para dar un péptido modificado que tiene una afinidad de unión mejorada. Además de los péptidos que se presentan naturalmente, puesto que ya se conoce la regularidad de las secuencias de péptidos presentados al unirse a antígenos HLA (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), se pueden introducir modificaciones basadas en esta regularidad en los péptidos inmunogénicos de la presente invención según las reivindicaciones.

15 Por ejemplo, los péptidos que exhiben alta afinidad de unión a HLA-A2 tienden a tener el segundo aminoácido desde el extremo N sustituido por leucina o metionina. Asimismo, también se pueden usar favorablemente péptidos en los que el aminoácido C-terminal está sustituido por valina o leucina. Así, se describe péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1 a 40, en donde el segundo aminoácido desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de dicha SEQ ID NO está sustituido por leucina o metionina, y péptidos, y/o en donde el extremo C de la secuencia de aminoácidos de dicha SEQ ID NO está sustituido por valina o leucina.

20 Se pueden introducir sustituciones no solo en los aminoácidos terminales sino también en la posición de reconocimiento potencial de receptor de célula T (TCR) de los péptidos. Varios estudios han demostrado que un péptido con sustituciones de aminoácidos puede tener una función igual o mejor que el original, por ejemplo, CAP1, p53⁽²⁶⁴⁻²⁷²⁾, Her-2/neu⁽³⁶⁹⁻³⁷⁷⁾ o gp 100⁽²⁰⁹⁻²¹⁷⁾ (Zaremba y cols. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann y cols. J Immunol. (2002) Feb 1;168(3):1338-47., S. O. Dionne y cols. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 y S. O. Dionne y cols. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

30 La presente divulgación también contempla la adición de uno, dos o varios aminoácidos al extremo N y/o C de los presentes péptidos. También se describen estos péptidos modificados que exhiben alta afinidad de unión a antígenos HLA y retienen inducibilidad hacia CTL. Por ejemplo, la divulgación proporciona un péptido aislado de menos de 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

35 (i) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1 a 20, en donde 1, 2 o varios aminoácidos están sustituidos, en donde el péptido se une a un antígeno HLA e induce linfocitos T citotóxicos, y

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

40 (a) el segundo aminoácido desde el extremo N de dicha SEQ ID NO se selecciona del grupo que consiste en leucina o metionina; y

(b) el aminoácido C-terminal de dicha SEQ ID NO se selecciona del grupo que consiste en valina o leucina.

Por otra parte, la presente divulgación también proporciona un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12 u 11 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

45 (i) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 21 a 40, en donde 1, 2 o varios aminoácidos están sustituidos, en donde el péptido se une a un antígeno HLA e induce linfocitos T citotóxicos, y

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

50 (a) el segundo aminoácido desde el extremo N de dicha SEQ ID NO se selecciona del grupo que consiste en leucina o metionina; y

(b) el aminoácido C-terminal de dicha SEQ ID NO se selecciona del grupo que consiste en valina o leucina.

Estos péptidos se procesan en una APC para presentar un péptido de (i), (ii), (i') y (ii') sobre la misma, cuando estos péptidos se ponen en contacto con, o se introducen en, la APC.

5 Sin embargo, cuando la secuencia peptídica es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, se pueden inducir efectos secundarios tales como trastornos autoinmunitarios o síntomas alérgicos frente a sustancias específicas. Por lo tanto, se pueden realizar búsquedas de homología usando bases de datos disponibles para evitar situaciones en las que la secuencia del péptido coincide con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando se aclara a partir de las búsquedas de homología que no existe ni siquiera un péptido con una diferencia de 1 o 2 aminoácidos con el péptido objetivo, el péptido objetivo se puede modificar a fin de incrementar su afinidad de unión con antígenos HLA, y/o incrementar su inducibilidad hacia CTL sin peligro de estos efectos secundarios.

15 Aunque se espera que los péptidos que tienen alta afinidad de unión a los antígenos HLA que se describen anteriormente sean muy eficaces, los péptidos candidatos, que se seleccionan según la presencia de alta afinidad de unión como un indicador, se examinan adicionalmente con respecto a la presencia de CTL inducibilidad hacia. En la presente, la expresión "inducibilidad hacia CTL" indica la capacidad del péptido para inducir CTLs cuando se presente sobre células que presentan antígeno (APCs). Además, "inducibilidad hacia CTL" incluye la capacidad del péptido para inducir la activación de CTL, la proliferación de CTL, promover la lisis por CTL de células diana e incrementar la producción de IFN-gamma por CTL.

20 La confirmación de la inducibilidad hacia CTL se efectúa al inducir APCs que soportan antígenos del MHC humano (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DCs)), o más específicamente DCs derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana y, después de la estimulación con los péptidos, mezcla con células positivas a CD8, y a continuación medir el IFN-gamma producido y liberado por CTL frente a las células diana. Como el sistema de reacción, se pueden usar animales transgénicos que se han producido para expresar un antígeno HLA humano (por ejemplo, los descritos en BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol agosto de 2000, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on MHC (HLA) class II restricted T(H) response). Por ejemplo, las células diana se pueden radiomarcarse con ⁵¹Cr y similares, y la actividad citotóxica que puede calcular a partir de la radiactividad liberada de las células diana. Alternativamente, se puede examinar al medir IFN-gamma producido y liberado mediante CTL en presencia de APCs que soportan péptidos inmovilizados, y visualizar la zona de inhibición en el medio usando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

35 Como resultado de examinar la inducibilidad hacia CTL de los péptidos que se describen anteriormente, se descubrió que los nonapéptidos y los decapeptidos seleccionados de entre los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1 a 40 mostraban una inducibilidad hacia CTL particularmente alta así como alta afinidad de unión a un antígeno HLA.

40 Por otra parte, los resultados de los análisis de homología demostraban que estos péptidos no comparten una homología significativa con péptidos derivados de cualesquiera otros productos génicos humanos conocidos. Esto disminuye la posibilidad de respuestas inmunitarias desconocidas o no deseadas cuando se usan para inmunoterapia. Por lo tanto, también a partir de este aspecto, estos péptidos son útiles para provocar inmunidad contra ECT2 en pacientes con cáncer. Así, los péptidos de la presente divulgación, p. ej., péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1 a 40, se describen en la presente.

45 Además de la modificación de los presentes péptidos, analizada anteriormente, los péptidos de la presente divulgación pueden estar conectados a otros péptidos, con la condición de que el péptido conectado resultante retenga la inducibilidad hacia CTL requerida del péptido original y, más preferiblemente, también retenga la unión a HLA requerida del mismo. "Otros" péptidos ejemplares incluyen: los péptidos de la presente invención o los péptidos inducibles de CTL derivados de otros TAAs. Los conectores entre los péptidos son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, AAY (P. M. Daftarian y cols., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Suttmuller y cols., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) o K (S. Ota y cols., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura y cols., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715).

55 Por ejemplo, también se pueden usar péptidos antigénicos asociados a tumores no relacionados con ECT2 se forma sustancialmente simultánea para incrementar la respuesta inmunitaria a través de HLA clase I y/o clase II. Está bien establecido que las células cancerosas pueden expresar más de un gen asociado a tumores. Según esto, está dentro del alcance de la experimentación habitual para un experto normal en la técnica determinar si un sujeto particular expresa genes asociados a tumores adicionales, y a continuación incluir péptidos que se unen a HLA clase I y/o HLA clase II derivados de los productos de expresión de estos genes en composiciones o vacunas de ECT2.

65 Ejemplos de péptidos que se unen a HLA clase I y HLA clase II son conocidos por los expertos normales en la técnica (por ejemplo, véase Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995), y se pueden usar en relación con la presente invención de un modo similar a los divulgados en la presente. Un experto normal en la técnica puede preparar polipéptidos que incluyen uno o más péptidos de ECT2 y uno o más de los péptidos no relacionados con ECT2, o ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos, usando procedimientos de biología molecular convencionales.

5 Los péptidos conectados anteriormente se denominan en la presente "politopos", es decir, grupos de dos o más péptidos potencialmente inmunogénicos o estimulantes de respuestas inmunitarias que se pueden ligar entre sí en diversas disposiciones (p. ej., concatenados, solapados). El politopo (o el ácido nucleico que codifica el politopo) se puede administrar según protocolos de inmunización estándar, p. ej., a animales, para probar la eficacia del politopo en la estimulación, la potenciación y/o la provocación de una respuesta inmunitaria.

10 Los péptidos se pueden ligar entre sí directamente o a través del uso de secuencias de flaqueo para formar politopos, y el uso de politopos como vacunas es muy conocidos en la técnica (véase, p. ej., Thomson y cols., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert y cols., Nature Biotechnol. 15(12): 1280-1284, 1997; Thomson y cols., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn y cols., J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990). Politopos que contienen diversos números y combinaciones de epítomos se pueden preparar y probar con respecto al reconocimiento mediante CTLs y con respecto a la eficacia para incrementar una respuesta inmunitaria.

15 Los péptidos de la presente divulgación se pueden conectar adicionalmente a otras sustancias, con la condición de que retengan la inducibilidad hacia CTL requerida. Ejemplos ilustrativos de estas "otras" sustancias incluyen, pero no se limitan a, péptidos, lípidos, azúcar y cadenas sacáricas, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glicosilación, oxidación de la cadena lateral o fosforilación, con la condición de que las modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos que se describen en la presente memoria. Estos tipos de modificaciones se pueden realizar para conferir funciones adicionales (p. ej., función de orientación y función de aporte) o para estabilizar el polipéptido.

20 Por ejemplo, para incrementar la estabilidad in vivo se un polipéptido, se conoce en la técnica la introducción de D-aminoácidos, miméticos de aminoácidos o aminoácidos no naturales; este concepto también se puede adoptar para los presentes polipéptidos. La estabilidad de un polipéptido se puede ensayar de un número de modos. Por ejemplo, se pueden usar peptidasas y diversos medios biológicos, tales como plasma y suero humanos, para probar la estabilidad (véase, p. ej., Verhoef y cols., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

30 Por otra parte, según se apunta anteriormente, entre los péptidos modificados que están sustituidos, insertados, eliminados o añadidos en uno, dos o varios residuos de aminoácido, los que tienen una actividad igual o superior en comparación con los péptidos originales se pueden cribar o seleccionar.

Por lo tanto, también se divulga el método para cribar o seleccionar péptidos modificados que tienen una actividad igual o superior en comparación con los originales. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

35 a: sustituir, insertar, eliminar o añadir al menos un residuo de aminoácido de un péptido de la presente invención,

b: determinar la actividad del péptido, y

c: seleccionar el péptido que tenga una actividad igual o superior en comparación con el original.

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

En la presente, los péptidos de la presente invención también se pueden describir como "péptido(s) de ECT2" o "polipéptido(s) de ECT2".

45 III. Preparación de péptidos de ECT2

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar usando técnica muy conocidas. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar sintéticamente, mediante tecnología de ADN recombinantes o síntesis química. Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar individualmente o como polipéptidos más largos que incluyen dos o más péptidos. Los péptidos se pueden aislar, es decir, purificar o aislar sustancialmente libres de otras proteínas de células hospedadoras presentes en la naturaleza y fragmentos de las mismas, o cualesquiera otras sustancias químicas.

50 Los péptidos de la presente divulgación pueden contener modificaciones, tales como glicosilación, oxidación de la cadena lateral o fosforilación, con la condición de que estas modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos originales. Otras modificaciones ilustrativas incluyen la incorporación de D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácidos que se pueden usar, por ejemplo, para incrementar la semivida en suero de los péptidos.

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

60

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

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

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

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

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

(vi) el documento WO99/67288; y

(vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, Nueva York, 1980, 100-118.

10 Alternativamente, los presentes péptidos se pueden obtener adoptando cualesquiera métodos de manipulación genética conocidos para producir péptidos (p. ej., Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu y cols.) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, en primer lugar, un vector adecuado que aloja un polinucleótido que codifica el péptido objetivo de una forma expresable (p. ej., aguas abajo de una secuencia reguladora correspondiente a una secuencia promotora) se prepara y se transforma en una célula hospedadora adecuada. Estos vectores y células hospedadoras también son proporcionados por la presente invención. A continuación, la célula hospedadora se cultiva para producir el péptido de interés. El péptido también se puede producir in vitro adoptando un sistema de traducción in vitro.

20 IV. Polinucleótidos

La presente invención proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los susodichos péptidos de la presente invención. Estos incluyen polinucleótidos derivados del gen ECT2 presente en la naturaleza (Nº de Registro del GenBank AY376439 (por ejemplo, SEQ ID NO: 41)) y los que tienen secuencias nucleotídicas modificadas conservativamente de los mismos. En la presente, la expresión "secuencia nucleotídica modificada conservativamente" se refiere a secuencias que codifican secuencias de aminoácidos 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 la que una alanina es especificada por un codón, el codón se puede alterar hasta cualquiera de los correspondientes codones descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones en los ácidos nucleicos, denominadas en la técnica "variaciones sinónimas", representan una especie de variante modificada conservativamente. Cada secuencia de ácido nucleico descrita en la presente por codificar un péptido también describe cada posible variación sinónima del ácido nucleico. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para triptófano) se puede modificar para dar una molécula funcionalmente idéntica. Según esto, cada secuencia nucleotídica que codifica un péptido divulgada representa una divulgación implícita de las variaciones sinónimas asociadas con la misma.

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

El polinucleótido 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 (p. ej., secuencia de reconocimiento de enzima) del polinucleótido o los péptidos traducidos. Por otra parte, el polinucleótido puede incluir secuencias adicionales a la secuencia codificante que codifica el péptido de la presente invención. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido recombinante que incluye secuencias reguladoras requeridas para la expresión del péptido o puede ser un vector de expresión (plásmido) con genes marcadores, etc. En general, estos polinucleótidos recombinantes se pueden preparar mediante la manipulación de polinucleótidos a través de técnicas recombinantes convencionales usando, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

Se pueden usar técnicas de síntesis tanto recombinantes como químicas para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, un polinucleótido se puede producir mediante inserción en un vector apropiado, que se puede expresar cuando se transfecta en una célula competente. Alternativamente, un polinucleótido se puede amplificar usando técnicas de PCR o expresión en hospedadores adecuados (véase, p. ej., Sambrook y cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989). Alternativamente, un

polinucleótido se puede sintetizar usando las técnicas en fase sólida, como las descritas en Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes y cols., EMBO J 1984, 3: 801-5.

V. Exosomas

5 La presente divulgación proporciona además vesículas intracelulares llamadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de la presente invención y antígenos HLA sobre su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, al usar los métodos detallados en las Publicaciones de Solicitud de Patente Japonesa Kohyo N° Hei 11-510507 y WO99/03499, y se pueden preparar usando APCs obtenidas de pacientes que están sometidos a tratamiento y/o prevención. Los exosomas se pueden inocular como vacunas, de forma similar a los péptidos de la presente invención.

10 El tipo de antígenos HLA incluidos en los complejos se debe ajustar al del sujeto que requiera tratamiento y/o prevención. Por ejemplo, para los japoneses, a menudo son apropiados HLA-A2, particularmente 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. El uso del tipo A24 o el tipo A2 que se expresa altamente entre los japoneses y los caucásicos es favorable para obtener resultados eficaces, y encuentran uso subtipos tales como 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. Típicamente, en la clínica, el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento se investiga por adelantado, lo que permite la selección apropiada de péptidos que tienen altos niveles de afinidad de unión a este antígeno, o que tienen inducibilidad hacia CTL mediante presentación de antígeno. Por otra parte, a fin de obtener péptidos que muestren alta afinidad de unión e inducibilidad hacia CTL, se puede realizar una sustitución, inserción, eliminación o adición de 1, 2 o varios aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido parcial de ECT2 presente en la naturaleza.

25 En caso de usar el antígeno HLA tipo A2 para el exosoma, los péptidos que tienen una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 40 tienen una utilidad particular.

VI. Células que presentan antígeno (APCs)

30 La presente invención también proporciona APCs aisladas que presentan complejos formados con antígenos HLA y los péptidos de la presente invención sobre su superficie. Las APCs se pueden derivar de pacientes que están sometidos a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar como vacunas por sí mismas o en combinación con otros fármacos incluyendo los péptidos de la presente invención, exosomas o CTLs.

35 Las APCs no se limitan a un tipo particular de células e incluyen células dendríticas (DCs), células de Langerhans, macrófagos, células B, y células T activadas, que se sabe que presentan antígenos proteínicos sobre su superficie celular a fin de que sean reconocidos por linfocitos. Puesto que una DC es una APC representativa que tiene la actividad inductora de CTL más fuerte entre las APCs, las DCs encuentran uso como las APCs de la presente invención.

40 Por ejemplo, las APCs de la presente invención se pueden obtener al inducir DCs a partir de monocitos de sangre periférica y a continuación ponerlas en contacto (estimularlas) con los péptidos de la presente invención in vitro, ex vivo o in vivo. Cuando los péptidos de la presente invención se administran a los sujetos, APCs que presentan los péptidos de la presente invención se incluyen en el cuerpo del sujeto. Por lo tanto, las APCs de la presente invención se pueden obtener al recoger las APCs del sujeto después de que los péptidos de la presente invención se hayan usado para la administración al sujeto. Alternativamente, las APCs de la presente invención se pueden obtener al poner en contacto APCs recogidas de un sujeto con el péptido de la presente invención.

50 Las APCs de la presente divulgación se pueden administrar a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer en el sujeto por sí mismas o en combinación con otros fármacos incluyendo los péptidos, exosomas o CTLs de la presente divulgación. Por ejemplo, la administración ex vivo puede incluir las etapas de:

a: recoger APCs de un primer sujeto,

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

c: administrar las APCs de la etapa b a un segundo sujeto.

55 El primer sujeto y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo, o pueden ser individuos diferentes. Las APCs obtenidas mediante la etapa b se pueden administrar como una vacuna para tratar y/o prevenir el cáncer, ejemplos del cual incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino,

carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC.

5 La presente divulgación también proporciona un método o procedimiento para fabricar una composición farmacéutica para inducir APCs, en donde el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

10 Las APCs pueden tener un alto nivel de inducibilidad hacia CTL. En el término de "alto nivel de inducibilidad hacia CTL", el alto nivel es relativo ese nivel por APC que no entra en contacto con péptido o péptidos que no pueden inducir el CTL. Estas APCs que tienen un alto nivel de inducibilidad hacia CTL se pueden preparar mediante un método que incluye la etapa de transferir un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención a APCs in vitro así como el método mencionado anteriormente. Los genes introducidos pueden estar en la forma de ADNs o ARNs. Ejemplos de métodos para la introducción incluyen, sin limitaciones particulares, diversos métodos realizados convencionalmente en este campo, tales como lipofección, electroporación, o se puede usar el método del fosfato cálcico. Más específicamente, se puede realizar según se describe en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 15 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; la Traducción Japonesa Publicada de la Publicación Internacional N° 2000-509281. Al transferir el gen a APCs, el gen sufre transcripción, traducción, etc. en la célula, y a continuación la proteína obtenida es procesada por MHC Clase I o Clase II, y avanza a través de una ruta de presentación para presentar péptidos parciales.

20 VII. Linfocitos T citotóxicos (CTLs)

Un CTL inducido contra cualquiera de los péptidos de la presente invención refuerza la respuesta inmunitaria que se orienta a células cancerosas in vivo y así se pueden usar como vacunas similares a los péptidos. Así, la presente invención proporciona CTLs aislados que son inducidos o activados específicamente por cualquiera de los presentes péptidos.

30 Estos CTLs se pueden obtener al (1) usar el péptido o los péptidos de la presente invención para la administración a un sujeto o (2) poner en contacto (estimular) APCs derivadas del sujeto, y células positivas a CD8, o leucocitos mononucleares de sangre periférica in vitro con el péptido o los péptidos de la presente invención o (3) poner en contacto células positivas a CD8 o leucocitos mononucleares de sangre periférica in vitro con las APCs o exosomas que presentan un complejo de un antígeno HLA y el péptido sobre su superficie o (4) introducir un gen que incluye un polinucleótido que codifica una subunidad del receptor de células T (TCR) que se une al péptido de la presente invención. Estas APCs o exosomas se pueden preparar mediante los métodos descritos anteriormente y detalles del método de (4) se describe posteriormente en la sección "VIII. Receptor de células T (TCR)".

40 Los CTLs de la presente invención se pueden derivar de pacientes que están sometidos a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar por sí mismos o en combinación con otros fármacos incluyendo los péptidos de la presente invención o exosomas con el propósito de regular los efectos. Los CTLs 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 ECT2, tales como células cancerosas, o células que se transfectan con el gen ECT2; y las células que presentan un péptido de la presente invención sobre la superficie celular debido a la estimulación por el péptido también pueden servir como dianas de ataque por CTL activado.

45 VIII. Receptor de células T (TCR)

La presente divulgación también proporciona una composición que incluye ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de células T (TCR), y métodos para usar la misma. Las subunidades de TCR tienen la capacidad de formar TCRs que confieren especificidad a células T contra células diana que presentan ECT2. Al usar los métodos conocidos en la técnica, se pueden identificar los ácidos nucleicos de cadenas alfa y beta como las subunidades de TCR del CTL inducidos con uno o más péptidos de la presente invención (documento WO2007/032255 y Morgan y cols., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Por ejemplo, el método de PCR se prefiere para analizar el TCR. Los cebadores de PCR para el análisis pueden ser, por ejemplo, cebadores 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') como los cebadores del lado 5' (SEQ ID NO: 43) y cebadores 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') específicos para la región C de la cadena alfa de TCR (SEQ ID NO: 44), cebadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatccttctctgac-3') específicos para la región C1 de la cadena beta de TCR (SEQ ID NO: 45) o cebadores 3-TRbeta-C2 (5'-ctagcctctggaatccttctct-3') específicos para la región C2 de la cadena beta de TCR (SEQ ID NO: 46) como cebadores laterales 3', pero no limitados a los mismos. Los TCRs derivados se pueden unir a células diana que exponen el péptido de ECT2 con alta avidez, y opcionalmente median en la destrucción eficaz de células diana que presentan el péptido de ECT2 in vitro.

60 Los ácidos nucleicos que codifican las subunidades de TCR se pueden incorporar en vectores adecuados, p. ej., vectores retrovirales. Estos vectores son muy conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos o los vectores que los incluyen útilmente se pueden transferir a una célula T, por ejemplo, una célula a T procedente de un paciente.

Ventajosamente, la presente divulgación proporciona una composición en existencias que permita la codificación rápida de las propias células T de un paciente (o las de otro mamífero) para producir rápidamente y fácilmente células T modificadas que tengan excelentes propiedades de destrucción de células cancerosas.

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

Además, la presente divulgación proporciona CTLs que se preparan mediante transducción con los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de las subunidades de TCR que se unen al péptido de ECT2 de, p. ej., SEQ ID NOs: 1 a 40 en el contexto de HLA-A2.

Los CTLs transducidos son capaces de dirigirse a células cancerosas in vivo, y se pueden expandir mediante métodos de cultivo muy conocidos in vitro (p. ej., Kawakami y cols., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Los CTLs se pueden usar para formar una composición inmunogénica útil en el tratamiento o la prevención del cáncer en un paciente que necesite terapia o protección (documento WO2006/031221).

25 IX. Sustancias o composiciones farmacéuticas

Puesto que la expresión de ECT2 es específicamente elevada en cáncer tal como cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC en comparación con tejido normal, los péptidos de o los polinucleótidos de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento y/o para la profilaxis del cáncer, y/o la prevención de la recaída posoperatoria del mismo. Así, la presente invención proporciona una sustancia o composición farmacéutica para el uso en el tratamiento y/o la profilaxis y/o la prevención de la recaída posoperatoria del cáncer, incluyendo este agente, sustancia o composición como un ingrediente activo uno o más de los péptido o polinucleótidos de la presente invención como un ingrediente activo según se define en las reivindicaciones. Alternativamente, los presentes péptidos se pueden expresar sobre la superficie de cualesquiera exosomas o células precedentes, tales como APCs para el uso como sustancias o composiciones farmacéuticas. Además, los susodichos CTLs que orientan cualesquiera de los péptidos de la presente invención también se pueden usar como el ingrediente activo de las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas.

Los presentes agentes, sustancias o composiciones farmacéuticas encuentran uso como una vacuna. En la presente invención, la expresión "vacuna" (también denominada una composición inmunogénica) se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad antitumoral con la inoculación en animales.

Los agentes, las sustancias o las composición farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir cánceres, y/o la prevención de la recaída posoperatoria de los mismos en sujetos o pacientes incluyendo un ser humano y cualquier otro mamífero incluyendo, pero no limitado a, ratón, rata, cobaya, conejo, gato, perro, oveja, cabra, cerdo, vaca, caballo, mono, babuino y chimpancé, particularmente un animal comercialmente importante o un animal domesticado.

También se describe el uso de un ingrediente activo en la fabricación de un agente, una sustancia o una composición farmacéuticas para el tratamiento y/o la prevención de cánceres o tumores, dicho ingrediente activo seleccionado de entre:

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

También se describe un ingrediente activo para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer o un tumor, dicho ingrediente activo seleccionado de entre:

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

10 También se describe un método o procedimiento para fabricar un agente, una composición o una sustancia farmacéuticos para el tratamiento o la prevención del cáncer o un tumor, en donde el método o el procedimiento incluye la etapa de formular un portador farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable con un ingrediente activo seleccionado de entre:

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

15 También se describe un método o procedimiento para fabricar un agente, una composición o una sustancia farmacéuticos para el tratamiento o la prevención del cáncer o un tumor, en donde el método o el procedimiento incluye las etapas de mezclar un ingrediente activo con un portador farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, en donde el ingrediente activo se selecciona de entre:

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

25 Se ha encontrado que los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1 a 40 son péptidos epitópicos restringidos a HLA-A2 o los candidatos que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica. Por lo tanto, las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas que incluyen cualesquiera de estos péptidos con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1 a 40 son particularmente adecuadas para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Lo mismo se aplica a sustancias o composiciones farmacéuticas que incluyen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de la presente invención).

30 Los cánceres que se van a tratar mediante la sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención no están limitados e incluyen cualquier cáncer en el que esté implicado ECT2 (p. ej., se sobreexpresa), incluyendo, pero no limitados a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC.

35 Las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas pueden contener además de los susodichos ingredientes activos otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTLs contra células cancerosas, otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, etc. En la presente, los otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTLs contra células cancerosas son ejemplificados por antígenos específicos de cáncer (p. ej., TAAs identificados), pero no se limitan a los mismos.

40 Si es necesario, las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como un ingrediente activo, con la condición de que la sustancia no inhiba el efecto antitumoral del ingrediente activo, p. ej., cualquiera de los presentes péptidos. Por ejemplo, las

45

5 formulaciones pueden incluir sustancias o composiciones antiinflamatorias, analgésicos, agentes quimioterapéuticos y similares. Además de otras sustancias terapéuticas en el propio medicamento, los medicamentos de la presente invención también se pueden usar para la administración secuencialmente o simultáneamente con la una o más de las otras sustancias o composiciones farmacológicas. Las cantidades de medicamento y sustancia o composición farmacológica dependen, por ejemplo, de qué tipo de sustancia o sustancias o composición o composiciones farmacológicas se usen, la enfermedad que se trate y el esquema y las vías de administración.

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

15 En una realización de la presente invención, las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas se pueden incluir en artículos de fabricación y estuches que contienen materiales útiles para tratar las condiciones patológicas de la enfermedad que se va a tratar, p. ej., cáncer. El artículo de fabricación puede incluir un recipiente de cualquiera de las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas con una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta sobre el recipiente debe indicar que la sustancia o composición se usa para el tratamiento o la prevención de una o más afecciones de la enfermedad. La etiqueta también puede indicar directrices para la administración, etc.

20 Además del recipiente descrito anteriormente, un estuche que incluye una sustancia o composición farmacéutica de la presente invención opcionalmente puede incluir además un segundo recipiente que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

25 Las composiciones farmacéuticas, si se desea, pueden estar presentes en un paquete o dispositivo de aporte que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete puede incluir, por ejemplo, papel metalizado o plastificado, tal como un blíster. El paquete o dispositivo de aporte puede estar acompañado por instrucciones para la administración.

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

35 Los péptidos de la presente invención se pueden usar para la administración directamente como una sustancia o composición farmacéutica, o, si es necesario, se pueden formular mediante métodos de formulación convencionales. En el último caso, además de los péptidos de la presente invención, se pueden incluir portadores, excipientes, etc., que se usan normalmente para fármacos, según sea apropiado, sin limitaciones particulares. Ejemplos de estos portadores son agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón de fosfato, fluido de cultivo, etc. Por otra parte, las sustancias o composiciones farmacéuticas pueden contener, según sea necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos, etc. Las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar con propósitos anticancerosos.

40 Los péptidos de la presente invención se pueden preparar en combinación, lo que incluye dos o más de los péptidos de la presente invención, para inducir CTL in vivo. Los péptidos pueden estar en un cóctel o se pueden conjugar entre sí usando técnicas estándar. Por ejemplo, los péptidos se pueden conectar químicamente o expresar como una sola secuencia polipeptídica de fusión que puede tener uno o varios aminoácidos como un conector (p. ej., Lysine linker: K. S. Kawamura y cols. J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715). Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes. Al usar los péptidos de la presente invención para la administración, los péptidos son presentados en alta densidad por los antígenos HLA sobre APCs, a continuación se inducen CTLs que reaccionan específicamente hacia el complejo formado entre el péptido expuesto y el antígeno HLA. Alternativamente, las APCs (p. ej., DCs) se retiran de los sujetos y a continuación son estimuladas por los péptidos de la presente invención para obtener APCs que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención sobre su superficie. Estas APCs se readministran a los sujetos para inducir CTLs en los sujetos y, como resultado, se puede incrementar la agresividad hacia el endotelio asociado al tumor.

55 El agente, las sustancias o las composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que incluyen cualquiera de los péptidos de la presente invención como el ingrediente activo, también pueden incluir un adyuvante de modo que la inmunidad celular se establezca eficazmente. Alternativamente, el agente, la sustancia o la composición farmacéuticas se pueden usar para la administración con otros ingredientes activos o se pueden usar para la administración mediante la formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a cualquier compuesto, sustancia o composición que potencie la respuesta inmunitaria frente a la proteína cuando se administre junto (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Un adyuvante que se pueda aplicar incluye los descritos en la bibliografía (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Adyuvantes ejemplares incluyen fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina del cólera, toxina de salmonella, adyuvante incompleto de Freund (IFA), adyuvante completo de Freund (CFA), ISCOMatrix, GM-CSF, CpG, emulsión de aceite en agua, etc., pero no se limitan a los mismos.

Por otra parte, se pueden usar convenientemente formulaciones liposómicas, formulaciones granulares en las que el péptido está unido a cuentas de unos pocos micrómetros de diámetro y formulaciones en las que un lípido está unido al péptido.

- 5 En otra realización de la presente invención, los péptidos de la presente invención se pueden usar para la administración en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de las sales incluyen sales con un metal alcalino, sales con un metal, sales con una base orgánica, sales con un ácido orgánico y sales con un ácido inorgánico.
- 10 En algunas realizaciones, las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen un componente que ceba CTL. Los lípidos se han identificado como sustancias o composiciones capaces de cebar CTL in vivo frente a antígenos virales. Por ejemplo, residuos de ácido palmítico se pueden ligar a los grupos amino épsilon y alfa de un residuo de lisina y a continuación conectarse a un péptido de la presente invención. A continuación, el péptido lipidado se puede usar para la administración bien directamente en una micela o partícula,
- 15 incorporado en un liposoma, o emulsionado en un adyuvante. Como otro ejemplo de cebado lipídico de respuestas de CTL, se pueden usar lipoproteínas de *E. coli* tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS), para cebar CTL cuando están ligadas covalentemente a un péptido apropiado (véase, p. ej., Deres y cols., *Nature* 1989, 342: 561-4).
- 20 El método de administración puede ser oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, etc., y administración sistémica o administración local a la proximidad de las zonas elegidas como diana. La administración se puede realizar mediante una sola administración o reforzada por múltiples administraciones. La dosis de los péptidos de la presente invención se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad que se vaya a tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración, etc., y normalmente es de 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo, de
- 25 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, de 0,1 mg a 10 mg, y el péptido de la invención se puede usar para la administración, una vez en de unos pocos días a pocos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente una dosis adecuada.

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

- 30 El agente, las sustancias o las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir ácidos nucleicos que codifican el péptido o los péptidos divulgados en la presente en una forma expresable. En la presente, 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 ejemplificada, la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido de interés incluye elementos reguladores necesarios para la
- 35 expresión del polinucleótido. El polinucleótido o los polinucleótidos pueden estar equipados a fin de alcanzar una inserción estable en el genoma de la célula diana (véase, p. ej., Thomas KR & Capecchi MR, *Cell* 1987, 51: 503-12 para una descripción de vectores de casetes de recombinación homóloga. Véase además, p. ej., Wolff y cols., *Science* 1990, 247: 1465-8; las Patentes de EE. UU. N° 5.580.859, 5.589.466, 5.804.566, 5.739.118, 5.736.524, 5.679.647 y el documento WO 98/04720). Ejemplos tecnologías de aporte basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", aporte facilitado (bupivacaína, polímeros, mediado por péptidos), complejos de lípidos catiónicos y aporte
- 40 mediado por partículas ("pistola génica") o mediado por presión (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N° 5.922.687).

- Los péptidos de la presente invención también pueden ser expresados 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 variolovacunal, p. ej., como un vector para expresar secuencias nucleotídicas que
- 45 codifican el péptido. Al introducir en un huésped, el virus variolovacunal recombinante expresa el péptido inmunogénico, y de ese modo provoca una respuesta inmunitaria. Vectores variolovacunales métodos útiles en protocolos de inmunización se describen, p. ej., en la Patente de EE. UU. N° 4.722.848. Otro vector es BCG (bacilo de Calmette Guerin). Vectores de BCG se describen en Stover y cols., *Nature* 1991, 351: 456-60. Será evidente una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o la inmunización, p. ej., vectores de
- 50 adenovirus y virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores de *Salmonella typhi*, vectores de toxina del carbunco destoxificada, y similares. Véase, p. ej., Shata y cols., *Mol Med Today* 2000, 6: 66-71; Shedlock y cols., *J Leukoc Biol* 2000, 68: 793-806; Hipp y cols., *In Vivo* 2000, 14: 571-85.

- El aporte de un polinucleótido a un paciente puede ser bien directo, en cuyo caso el paciente se expone
- 55 directamente a un vector que soporta polinucleótido, o bien indirecto, en cuyo caso las células se transforman en primer lugar con el polinucleótido de interés in vitro, cuando las células se trasplantan al paciente. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapias génicas in vivo y ex vivo.

- Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel y cols., *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488-505; Wu y Wu, *Biotherapy* 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33: 573-96; Mulligan, *Science* 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215). Métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que son aplicables a la presente invención son descritos por Ausubel y cols., 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.

5 El método de administración puede ser oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, etc., y encuentra uso la administración sistémica o la administración local a la proximidad de las zonas elegidas como diana. La administración se puede realizar mediante una sola administración o reforzada mediante múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el portador adecuado o las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de la presente invención se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad que se vaya a tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración, etc., y normalmente es de 0,001 mg a 1.000 mg, por ejemplo, de 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, de 0,1 mg a 10 mg, y se puede administrar de una vez cada pocos días a una vez cada pocos meses. Un experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente la dosis adecuada.

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

15 Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para preparar o inducir APCs y CTLs. Los exosomas y las APCs de la presente divulgación también se pueden usar para inducir CTLs. Los péptidos, los polinucleótidos, los exosomas y las APCs se pueden usar en combinación con cualesquiera otros compuestos con la condición de que los compuestos adicionales no inhiban la inducibilidad hacia CTL. Así, cualquiera de las susodichas sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención se puede usar para inducir CTLs. Además de esto, las que incluyen los péptidos y polinucleótidos también se pueden usar para inducir APCs según se explica posteriormente.

20 (1) Método para inducir células que presentan antígeno (APCs)

La presente invención proporciona métodos para inducir APCs con alta inducibilidad hacia CTL usando los péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

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

a: recoger APCs de un sujeto, y

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

30 Las APCs no se limitan a un tipo particular de células e incluyen DCs, células de Langerhans, macrófagos, células B, y células T activadas, que se sabe que presentan antígenos proteínicos sobre su superficie a fin de que sean reconocidos por linfocitos.

35 Las DCs se pueden usar puesto que tienen la inducibilidad hacia CTL más fuerte entre las APCs. Cualesquiera péptidos de la presente invención se pueden usar por sí mismos o con otros péptidos de la presente invención.

40 Por otra parte, cuando los péptidos de la presente invención se usan para la administración a un sujeto, las APCs se ponen en contacto con los péptidos, por consiguiente, las APCs con alta inducibilidad hacia CTL se inducen en el cuerpo del sujeto. Así, la presente invención incluye los péptidos de la presente invención para el uso en la administración a un sujeto. De forma similar, cuando los polinucleótidos de la presente invención se usan para la administración a un sujeto en una forma expresable, los péptidos de la presente invención se expresan y se ponen en contacto con APCs, por consiguiente, las APCs con alta inducibilidad hacia CTL son inducidos en el cuerpo del sujeto. Así, la presente invención también puede incluir los polinucleótidos de la presente invención para el uso en la administración a un sujeto. La expresión "forma expresable" se describe anteriormente en la sección "IX. Sustancias y composiciones farmacéuticas, (2) Sustancias o composiciones farmacéuticas que contienen polinucleótidos como el ingrediente activo".

45 Por otra parte, la presente invención puede incluir introducir el polinucleótido de la presente invención en APCs para inducir APCs con inducibilidad hacia CTL. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

a: recoger APCs de un sujeto, y

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

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

Alternativamente, la presente divulgación proporciona un método para preparar una célula que presenta antígeno (APC) que induce específicamente actividad de CTL contra ECT2, en donde el método puede incluir una de las siguientes etapas:

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

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

(2) Método para inducir CTLs

La presente invención también proporciona métodos para inducir CTLs usando los péptidos, los polinucleótidos, los exosomas o las APCs de la presente divulgación.

10 La presente invención también proporciona métodos para inducir CTLs usando un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad del receptor de células T (TCR) que reconoce un complejo de los péptidos de la presente invención y antígenos HLA. Preferiblemente, los métodos para inducir CTLs pueden incluir al menos una etapa seleccionada de entre:

15 a) poner en contacto una célula T positiva a CD8 con una célula que presenta antígeno y/o un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención; y

b) introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad de TCR que reconoce un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA en una célula positiva a CD8.

20 Cuando los péptidos, los polinucleótidos, las APCs o los exosomas se administran a un sujeto, se introducen CTLs en el cuerpo del sujeto y se potencia la fuerza de la respuesta inmunitaria que se dirige a las células cancerosas. Así, los métodos incluyen la etapa de administrar los péptidos, los polinucleótidos, las APCs o los exosomas a un sujeto.

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

25 a: recoger APCs de un sujeto;

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

c: cocultivar las APCs de la etapa b con células positivas a CD8.

30 Las APCs que se van a cocultivar con las células positivas a CD8 en la etapa c anterior también se pueden preparar al transferir un gen que incluye un polinucleótido de la presente invención en APCs según se describe anteriormente en la sección "VL. Células que presentan antígeno", aunque la presente invención no se limita a esto, y abarca cualesquiera APCs que presenten eficazmente sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención.

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

40 Por otra parte, el CTL se puede inducir al introducir un gen que incluye un polinucleótido que codifica la subunidad de TCR que se une al péptido de la presente invención en células positivas a CD8. Esta transducción se puede realizar como se describe anteriormente en la sección "VIII. Receptor de células T (TCR)".

45 También se describe un método o procedimiento para fabricar una sustancia o composición farmacéutica que induce CTLs, en donde el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

(3) Método para inducir una respuesta inmunitaria

También se describen métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra enfermedades relacionadas con ECT2. Enfermedades adecuadas pueden incluir cáncer, ejemplos del cual incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC.

Los métodos pueden incluir la etapa de administrar una sustancia o sustancias o composición o composiciones que contienen cualquiera de los péptidos de la presente invención o polinucleótidos que los codifican. El método también puede contemplar la administración de exosomas o APCs que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención. Para los detalles, véase el punto de "IX. Sustancias o composiciones farmacéuticas", particularmente la parte que describe el uso de las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención como vacunas. Además, los exosomas y las APCs que se pueden emplear para los presentes métodos para inducir una respuesta inmunitaria se describen con detalle bajo los puntos de "V. Exosomas", "VI. Células que presentan antígeno (APCs)" y (1) y (2) de "X. Métodos que usan los péptidos, los exosomas, las APCs y los CTLs", anteriormente.

También se describe un método o procedimiento para fabricar una sustancia o composición farmacéutica que induce una respuesta inmunitaria, en donde el método puede incluir la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

Alternativamente, el método 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 que codifica este péptido que se divulga en la presente en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; o
- (d) una célula T citotóxica de la presente invención.

Un cáncer que sobreexpresa ECT2 se puede tratar con estos ingredientes activos. Ejemplos de estos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC. Según esto, antes de la administración de las vacunas o las composiciones farmacéuticas que incluyen los ingredientes activos, se puede confirmar si el nivel de expresión de ECT2 en las células o los tejidos que se van a tratar se potencia en comparación con células normales del mismo órgano. Así, se describe un método para tratar un cáncer que (sobre)expresa ECT2, método que puede incluir las etapas de:

- i) determinar el nivel de expresión de ECT2 en células o un tejido o tejidos obtenidos de un sujeto con el cáncer que se va a tratar;
- ii) comparar el nivel de expresión de ECT2 con un control normal; y
- iii) administrar al menos un componente seleccionado de entre (a) a (d) descritos anteriormente a un sujeto con cáncer que sobreexpresa ECT2 en comparación con un control normal.

También se describe una vacuna o una composición farmacéutica que incluye al menos un componente seleccionado de entre (a) a (d) descritos anteriormente, para el uso en la administración a un sujeto que tiene un cáncer que sobreexpresa ECT2. En otras palabras, se describe un método para identificar a un sujeto que se va a tratar con el polipéptido de ECT2 de la presente invención, incluyendo este método la etapa de determinar un nivel de expresión de ECT2 en células o un tejido o tejidos derivados del sujeto, en donde un incremento del nivel en comparación con un nivel de control normal del gen indica que el sujeto puede tener cáncer que se puede tratar con el polipéptido de ECT2 de la presente invención. Los métodos para tratar el cáncer se describen con más detalle posteriormente.

Cualquier célula o tejido derivados del sujeto se puede usar para la determinación de la expresión de ECT2 con la condición de que incluya el producto de transcripción o traducción objetivo de ECT2. Ejemplos de muestras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, tejidos y fluidos corporales, tales como sangre, esputos y orina. La muestra de células o tejido derivada del sujeto puede contener una población celular que incluye una célula epitelial, o una célula epitelial cancerosa o una célula epitelial derivada de tejido que se sospecha que es canceroso.

Además, si es necesario, la célula se puede purificar de los tejidos y fluidos corporales obtenidos, y a continuación se puede usar como la muestra derivada del sujeto.

5 Un sujeto que va a ser tratado puede ser un mamífero. Mamíferos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, p. ej., un ser humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo y una vaca.

Se puede determinar el nivel de expresión de ECT2 en células o tejidos obtenidos de un sujeto. El nivel de expresión se puede determinar al nivel del producto de transcripción (ácido nucleico), usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARNm de ECT2 se puede cuantificar usando sondas mediante métodos de hibridación (p. ej., 10 hibridación Northern). La detección se puede llevar a cabo en un chip, una micromatriz, etc. Una micromatriz se puede usar para detectar el nivel de expresión de ECT2. Los expertos en la técnica pueden preparar estas sondas utilizando la información de secuencias de ECT2. Por ejemplo, el ADNc de ECT2 se puede usar como las sondas. Si es necesario, las sondas se pueden marcar con un marcador adecuado, tales como colorantes, sustancias fluorescentes e isótopos, y el nivel de expresión del gen se puede detectar como la intensidad de los marcadores 15 hibridados.

Por otra parte, el producto de transcripción de ECT2 (p. ej., SEQ ID NO: 42) se puede cuantificar usando cebadores mediante métodos de detección basados en la amplificación (p. ej., RT-PCR). Estos cebadores se pueden preparar basándose en la información de secuencias disponible del gen. 20

Específicamente, una sonda o un cebador usados para el presente método se hibrida bajo condiciones rigurosas, moderadamente rigurosas o poco rigurosas al ARNm de ECT2. Según se usa en la presente, la expresión "condiciones (de hibridación) rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda o un cebador se hibridará a su secuencia diana, pero no a otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán 25 diferentes bajo diferentes circunstancias. La hibridación específica de secuencias más largas se observa a temperaturas superiores que las secuencias más cortas. Generalmente, la temperatura de una condición rigurosa se selecciona para ser aproximadamente 5 grados C menor que el punto de fusión térmico (T_m) para una secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. El T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, un pH y una concentración de ácido nucleico definidos) a la que 50% de las sondas complementarias a su secuencia diana se hibridan a la secuencia diana en el equilibrio. Puesto que las secuencias diana generalmente están presentes en exceso, al T_m, 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menos de aproximadamente 1,0 M de ion sodio, típicamente 30 aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de ion sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos 35 aproximadamente 30 grados C para sondas o cebadores cortos (p. ej., 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 grados C para sondas o cebadores más largos. Las condiciones rigurosas también se pueden alcanzar con la adición de sustancias desestabilizadoras, tales como formamida.

Una sonda o un cebador es típicamente un oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido incluye típicamente una región de secuencia nucleotídica que se hibrida bajo condiciones rigurosas a al menos 40 aproximadamente 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 o 25 de una secuencia nucleotídica de la hebra de sentido consecutiva o de un ácido nucleico que incluye una secuencia de ECT2, o una secuencia nucleotídica de la hebra antisentido de un ácido nucleico que comprende una secuencia de ECT2, o de un mutante presente en la naturaleza de estas secuencias. En particular, por ejemplo, un oligonucleótido que tiene 5-50 de longitud se puede usar como un cebador para amplificar los genes, que se van a detectar. Además, ARNm o ADNc 45 de un gen ECT2 se puede detectar con una sonda o un cebador oligonucleotídico de un tamaño específico, generalmente 15- 30 b de longitud.

La longitud de la sonda o el cebador oligonucleotídicos se puede seleccionar de 15-25. Procedimientos, dispositivos o reactivos de ensayo para la detección de un gen al usar esta sonda o cebador oligonucleotídicos son muy 50 conocidos (p. ej. micromatriz oligonucleotídica o PCR). En estos ensayos, las sondas o los cebadores también pueden incluir secuencias marcadoras o conectoras. Además, las sondas o los cebadores se pueden modificar con un marcador detectable o ligando de afinidad que se va a capturar. Alternativamente, en procedimientos de detección basados en la hibridación, un polinucleótido que tiene unos pocos cientos (p. ej., aproximadamente 100-200) de bases hasta una pocas kilo (p. ej., aproximadamente 1000-2000) bases de longitud también se puede usar 55 para una sonda (p. ej., ensayo de transferencia northern o análisis de micromatrices de ADNc).

Alternativamente, el producto de traducción se puede detectar para el diagnóstico.

Por ejemplo, la cantidad de proteína ECT2 (SEQ ID NO: 42) o el fragmento inmunológicamente de la misma se 60 puede determinar. Métodos para determinar la cantidad de la 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. Por otra parte, se puede usar para la detección cualquier fragmento o modificación (p. ej., anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo, con la condición de que el fragmento o el anticuerpo modificado retenga la capacidad de unión a la proteína ECT2. Estos anticuerpos contra los péptidos de la 65 presente invención también son proporcionados por la presente invención. Métodos para preparar estos tipos de

anticuerpos para la detección de proteínas son conocidos en la técnica, y se puede emplear cualquier método para preparar estos anticuerpos y equivalentes de los mismos.

5 Como otro método para detectar el nivel de expresión del gen ECT2 basándose en su producto de traducción, la intensidad de la tinción se puede medir a través de análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo contra la proteína ECT2. A saber, en esta medida, una tinción fuerte indica presencias/nivel incrementados de la proteína y, al mismo tiempo, un alto nivel de expresión del gen ECT2.

10 Se puede determinar si el nivel de expresión de un gen diana, p. ej., el gen ECT2, en células cancerosas está incrementado si el nivel se incrementa desde el nivel de control (p. ej., el nivel en células normales) del gen diana en, por ejemplo, 10%, 25% o 50%; o se incrementa hasta más de 1,1 veces, más de 1,5 veces, más de 2,0 veces, más de 5,0 veces, más de 10,0 veces, o más.

15 El nivel de control se puede determinar al mismo tiempo que las células cancerosas usando una muestra o muestras previamente recogidas y almacenadas de un sujeto o sujetos cuyo estado o estados de enfermedad (canceroso o no canceroso) se conocen. Además, células normales obtenidas de regiones no cancerosas de un órgano que tiene el cáncer que se va a tratar se pueden usar como un control normal. Alternativamente, el nivel de control se puede determinar mediante un método estadístico basándose en los resultados obtenidos al analizar el nivel o niveles de expresión previamente determinados de gen ECT2 en muestras procedentes de sujetos cuyos estados de enfermedad se conocen. Por otra parte, el nivel de control se puede derivar de una base de datos de patrones de expresión procedentes de células probadas previamente. Por otra parte, el nivel de expresión del gen ECT2 en una muestra biológica se puede comparar con múltiples niveles de control, determinados a partir de múltiples muestras de referencia. Se puede usar un nivel de control que se determina a partir de una muestra de referencia derivada de un tipo de tejido similar al de la muestra biológica derivada del sujeto. Por otra parte, se puede usar el valor estándar de los niveles de expresión del gen ECT2 en una población con un estado de enfermedad conocido. El valor estándar se puede obtener mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, un intervalo de media +/- 2 D. E. o media +/- 3 D. E. se puede usar como el valor estándar.

30 Un nivel de control determinado a partir 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 se puede normalizar al nivel de expresión de ácidos nucleicos de control, p. ej., genes constitutivos, cuyos niveles de expresión se sabe que no difieren dependiendo del estado canceroso o no canceroso de la célula. Genes de control ejemplares incluyen, pero no se limitan a, beta-actina, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa y proteína P1 ribosómica.

35 Cuando el nivel de expresión del gen ECT2 se incrementa en comparación con el nivel de control normal, o es similar/equivalente al nivel de control canceroso, el sujeto se puede diagnosticar con un cáncer que se va a tratar.

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

a) determinar el nivel de expresión de ECT2 en células o tejido o tejidos obtenidos de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que se va a tratar;

45 b) comparar el nivel de expresión de ECT2 con un nivel de control normal;

c) diagnosticar que el sujeto tiene el cáncer que se va a tratar, si el nivel de expresión de ECT2 está incrementado en comparación con el nivel de control normal; y

d) seleccionar el sujeto para el tratamiento del cáncer, si el sujeto está diagnosticado por tener el cáncer que se va a tratar, en la etapa c).

50 Alternativamente, este método puede incluir las etapas de:

a) determinar el nivel de expresión de ECT2 en células o tejido o tejidos obtenidos de un sujeto que se sospecha que tiene el cáncer que se va a tratar;

b) comparar el nivel de expresión de ECT2 con un nivel de control canceroso;

55 c) diagnosticar que el sujeto tiene el cáncer que se va a tratar, si el nivel de expresión de ECT2 es similar o equivalente al nivel de control canceroso; y

d) seleccionar el sujeto para el tratamiento del cáncer, si el sujeto está diagnosticado por tener el cáncer que se va a tratar, en la etapa c).

La presente invención también proporcionar un estuche de diagnóstico para diagnosticar o determinar a un sujeto que sufre o se sospecha que sufre de cáncer que se puede tratar con el polipéptido de ECT2 de la presente invención, que también puede encontrar uso para evaluar y/o comprobar la eficacia o aplicabilidad de una inmunoterapia para el cáncer que se define en las reivindicaciones. El cáncer puede incluir, pero no se limita a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC. Más particularmente, el estuche puede incluir al menos un reactivo para detectar la expresión del gen ECT2 en una célula derivada de un sujeto, reactivo que se puede seleccionar del grupo de:

(a) un reactivo para detectar ARNm del gen ECT2;

(b) un reactivo para detectar la proteína ECT2 o el fragmento inmunológicamente del mismo; y

(c) un reactivo para detectar la actividad biológica de la proteína ECT2.

Ejemplos de reactivos adecuados para la detección de ARNm del gen ECT2 pueden incluir ácidos nucleicos que se unen específicamente a o identifican el ARNm de ECT2, tales como oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a una porción del ARNm de ECT2. Estos tipos de oligonucleótidos son ejemplificados por cebadores y sondas que son específicos para el ARNm de ECT2. Estos tipos de oligonucleótidos se pueden preparar basándose en métodos muy conocidos en la técnica. Si es necesario, el reactivo para detectar el ARNm de ECT2 se puede inmovilizar sobre una matriz sólida. Por otra parte, se puede incluir en el estuche más de un reactivo para detectar el ARNm de ECT2.

Por otra parte, ejemplos de reactivos adecuados para la detección de la proteína ECT2 o el fragmento inmunológicamente del mismo pueden incluir anticuerpos para la proteína ECT2 o el fragmento inmunológicamente del mismo. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Por otra parte, cualquier fragmento o modificación (p. ej., anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo se puede usar como el reactivo, con la condición de que el fragmento o el anticuerpo modificado retenga la actividad de unión a la proteína ECT2 o el fragmento inmunológicamente del mismo. Métodos para preparar estos tipos de anticuerpos para la detección de proteínas son muy conocidos en la técnica, y se puede emplear cualquier método para preparar estos anticuerpos y equivalentes de los mismos. Por otra parte, el anticuerpo se puede marcar con moléculas generadoras de señales a través de un enlace directo o una técnica de marcaje indirecta. Marcadores y métodos para marcar anticuerpos y detectar la unión de los anticuerpos a sus diana son muy conocidos en la técnica, y se pueden emplear cualesquiera marcadores y métodos. Por otra parte, se puede incluir en el estuche más de un reactivo para detectar la proteína ECT2.

El estuche puede contener más de uno de los susodichos reactivos. El estuche puede incluir además una matriz sólida y un reactivo para unir una sonda contra un gen ECT2 o un anticuerpo contra un péptido de ECT2, un medio y un recipiente para cultivar células, reactivos de control positivo y negativo, y un anticuerpo secundario para detectar un anticuerpo contra un péptido de ECT2. Por ejemplo, muestras de tejido obtenidas de sujetos sin cáncer o que sufren cáncer pueden servir como reactivos de control útiles. Un estuche de la presente invención puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos (p. ej., escritos, cinta, CD-ROM, etc.) con instrucciones de uso. Estos reactivos, etc. se pueden retener en un recipiente con una etiqueta. Recipientes adecuados pueden incluir botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

Cuando el reactivo es una sonda contra el ARNm de ECT2, el reactivo puede estar inmovilizado sobre una matriz sólida, tal como una tira porosa, para formar al menos un sitio de detección. La región de medida o detección de la tira porosa puede incluir una pluralidad de sitios, conteniendo cada uno un ácido nucleico (sonda). Una tira de prueba también puede contener sitios para controles negativo y/o positivo. Alternativamente, los sitios de control pueden estar situados sobre una tira separada de la tira de prueba. Opcionalmente, los diferentes sitios de detección pueden contener diferentes cantidades de ácidos nucleicos inmovilizados, es decir, una cantidad superior en el primer sitio de detección y cantidades menores en sitios posteriores. Al añadir una muestra de prueba, el número de sitios que exponen una señal detectable proporciona una indicación cuantitativa de ARNm de ECT2 presente en la muestra. Los sitios de detección puede estar configurados en cualquier conformación adecuadamente detectable y típicamente están en la conformación de una barra o punto que abarca la anchura de una tira de prueba.

El estuche de la presente invención puede incluir además una muestra de control positivo o muestra estándar de ECT2. La muestra de control positivo se puede preparar al recoger muestras positivas a ECT2 y a continuación

ensayar sus niveles de ECT2. Alternativamente, una proteína o un polinucleótido de ECT2 purificado se puede añadir a células que no expresan ECT2 para formar la muestra positiva o la muestra estándar de ECT2.

5 ECT2 purificado puede ser una proteína recombinante. El nivel de ECT2 de la muestra de control positivo es, por ejemplo, mayor que el valor de corte.

Un estuche de diagnóstico puede incluir una proteína o una proteína parcial de la misma capaz de reconocer específicamente el anticuerpo de la presente invención o el fragmento del mismo.

10 Ejemplos de péptidos parciales de la presente divulgación incluyen polipéptidos compuestos por al menos 8, 15 o 20 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de una proteína de la presente divulgación. El cáncer se puede diagnosticar al detectar un anticuerpo en una muestra (p. ej., sangre, tejido) usando una proteína o un péptido (polipéptido) de la presente invención. El método para preparar la proteína de la presente invención y los péptidos son como se describen anteriormente.

15 Los métodos para diagnosticar cáncer de la presente divulgación se pueden realizar al determinar la diferencia entre la cantidad de anticuerpo anti-ECT2 y aquella en la muestra de control correspondiente según se describe anteriormente. Se sospecha que el sujeto sufre cáncer si las células o los tejidos del sujeto contienen anticuerpos contra los productos de expresión (ECT2) del gen y se determina que la cantidad del anticuerpo anti-ECT2 es mayor que el valor de corte en nivel en comparación con la del control normal.

20 Un estuche de diagnóstico de la presente invención puede incluir el péptido de la presente invención y una molécula de HLA que se une al mismo. El método para detectar CTLs específicos para el antígeno usando péptidos antigénicos y moléculas del HLA ya se ha establecido (por ejemplo, Altman JD y cols., Science. 1996, 274(5284): 94-6). Así, el complejo del péptido de la presente invención y la molécula de HLA se puede aplicar al método de detección para detectar CTLs específicos de antígenos tumorales, permitiendo de ese modo una detección más fácil, una recaída y/o metástasis del cáncer. Además, se puede emplear para la selección de sujetos aplicables con los productos farmacéuticos que incluyen el péptido de la presente invención como un ingrediente activo, o la valoración del efecto del tratamiento de los productos farmacéuticos.

25 Particularmente, según el método conocido (véase, por ejemplo, Altman JD y cols., Science. 1996, 274(5284): 94-6), se puede preparar el complejo oligómero, tal como tetrámero, de la molécula de HLA radiomarcada y el péptido de la presente invención. Usando el complejo, el diagnóstico se puede realizar, por ejemplo, al cuantificar los CTLs específicos del péptido antigénico en los linfocitos de sangre periféricas derivados del sujeto que se sospecha que sufre cáncer.

30 También se describe un método o agentes de diagnóstico para evaluar la respuesta inmunológica de un sujeto al usar epítomos peptídicos como los descritos en la presente.

35 Péptidos restringidos a HLA-A02 como los descritos en la presente se pueden usar como reactivos para evaluar o predecir una respuesta inmunitaria de un sujeto. La respuesta inmunitaria que se va a evaluar se puede inducir al poner en contacto un inmunógeno con células inmunocompetentes in vitro. Cualesquiera sustancias o composiciones que puedan dar como resultado la producción de CTLs específicos de antígeno que reconozcan y se unan al epítipo o los epítomos peptídicos se pueden emplear como el reactivo. Los reactivos peptídicos pueden no necesitar usarse como el inmunógeno. Sistemas de ensayo que se usan para este análisis incluyen desarrollos técnicos relativamente recientes tales como tetrámeros, tinción para linfocinas intracelulares y ensayos de liberación de interferón, o ensayos ELISPOT. Las células inmunocompetentes para evaluar una respuesta inmunológica se pueden seleccionar de entre sangre periférica, un linfocito de sangre periférica (PBL) y una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). Métodos para recoger o aislar estas células inmunocompetentes son bien conocidos en la técnica. Las células inmunocompetentes que se van a poner en contacto con un reactivo peptídico pueden incluir células que presentan antígeno tales como células dendríticas.

40 Por ejemplo, los péptidos de la presente invención se pueden usar en ensayos de tinción de tetrámeros para evaluar células mononucleares de sangre periférica con respecto a la presencia de CTLs específicos de antígeno después de la exposición a un antígeno de células tumorales o un inmunógeno. El complejo tetrámero de HLA se puede usar directamente para visualizar CTLs específicos de antígeno (véanse, p. ej., Ogg y cols., Science 279: 2103-2106, 1998; y Altman y cols, Science 174 : 94-96, 1996) y determinar la frecuencia de la población de CTL específicos de antígeno en una muestra de células mononucleares de sangre periférica. Un reactivo tetrámero que usa un péptido de la invención se puede generar como se describe anteriormente.

45 Un péptido que se une a una molécula de HLA se repliega en presencia de la cadena pesada de HLA correspondiente y microglobulina beta 2 para generar un complejo trimolecular. En el complejo, el extremo carboxilo de la cada pesada se biotinila en un sitio que previamente se manipuló en la proteína. A continuación, se añade estreptavidina al complejo para formar un tetrámero compuesto por el complejo trimolecular y estreptavidina. Por medio de estreptavidina marcada fluorescentemente, el tetrámero se puede usar para tefir células específicas para antígeno. A continuación, las células se pueden identificar, por ejemplo, mediante citometría de flujo. Este análisis se

puede usar con propósitos de diagnóstico o pronóstico. Las células identificadas por el procedimiento también se pueden usar con propósitos terapéuticos.

La presente divulgación también proporciona reactivos para evaluar respuestas de recuerdo inmunitario (véanse, p. ej., Bertoni y cols., *J. Clin. Invest.* 100: 503-513, 1997 y Penna y cols., *J. Exp. Med.* 174: 1565-1570, 1991) que incluyen péptidos de la presente invención. Por ejemplo, muestras de PBMC del paciente procedentes de individuos con cáncer que se va a tratar se pueden analizar con respecto a la presencia de CTLs específicos de antígeno usando péptidos específicos. Una muestra de sangre que contiene células mononucleares se puede evaluar al cultivar las PBMCs y estimular las células con un péptido de la invención. Después de un período de cultivo apropiado, la población celular expandida se puede analizar, por ejemplo, con respecto a la actividad de CTL.

Los péptidos también se pueden usar como reaccionantes para evaluar la eficacia de una vacuna. PBMCs obtenidas de un paciente vacunado con un inmunógeno se pueden analizar usando, por ejemplo, cualquiera de los métodos descritos anteriormente. El paciente se somete a tipificación de HLA, y reactivos epitópicos peptídicos que reconocen las moléculas específicas del alelo presentes en el paciente se seleccionan para el análisis. La inmunogenicidad de la vacuna se puede indicar por la presencia de CTLs específicos del epítipo en la muestra de PBMC. Los péptidos de la invención también se pueden usar para elaborar anticuerpos, usando técnicas muy conocidas en la especialidad (véanse, p. ej., *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY; y *Antibodies A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), que pueden encontrar uso como reactivos para diagnosticar, detectar o seguir el cáncer. Estos anticuerpos pueden incluir los 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 las composiciones de la presente invención tienen un número de usos adicionales, algunos de los cuales se describen en la presente. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un método para diagnosticar o detectar un trastorno caracterizado por la expresión de un polipéptido inmunogénico de ECT2. Estos métodos implican determinar la expresión de un péptido de ECT2 que se une a HLA, o un complejo de un péptido de ECT2 que se une a HLA y una molécula de HLA clase I en una muestra biológica. La expresión de un péptido o complejo de péptido y molécula de HLA clase I se puede determinar o detectar al ensayar con un socio de unión para el péptido o complejo. Un socio de unión para el péptido o complejo puede ser un anticuerpo que reconoce y se une específicamente al péptido. La expresión de ECT2 en una muestra biológica, tal como una biopsia tumoral, también se puede probar mediante protocolos de amplificación por PCR estándar usando cebadores de ECT2. Un ejemplo de expresión en tumores se presenta aquí y una divulgación adicional de condiciones y cebadores ejemplares para la amplificación de ECT2 se pueden encontrar en el documento WO2003/27322.

Los métodos de diagnóstico pueden implicar poner en contacto una muestra biológica aislada de un sujeto con un agente específico para el péptido de ECT2 que se une a HLA para detectar la presencia del péptido de ECT2 que se une a HLA en la muestra biológica. Según se usa en la presente, "poner en contacto" significa colocar la muestra biológica en una proximidad suficiente con el agente y bajo las condiciones apropiadas de, p. ej., concentración, temperatura, tiempo, fuerza iónica, para permitir la interacción específica entre el agente y el péptido de ECT2 que se une a HLA 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 los expertos en la técnica para facilitar una interacción específica entre una molécula y su cognado (p. ej., una proteína y su cognado receptor, un anticuerpo y su cognado de antígeno proteínico, un ácido nucleico y su cognado de secuencia complementaria) en una muestra biológica. Condiciones ejemplares para facilitar una interacción específica entre una molécula y su cognado se describen en la Patente de EE. UU. Nº 5.108.921, publicada por Low y cols.

El método de diagnóstico de la presente divulgación se puede realizar *in vitro*. Según esto, una muestra biológica se puede situar *in vitro*. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser un tejido y el agente específico para el polipéptido inmunogénico de ECT2 se puede usar para detectar la presencia de estas moléculas en el tejido. La muestra biológica se puede recoger o aislar *in vitro* (p. ej., una muestra de sangre, una biopsia tumoral, un extracto de tejido). La muestra biológica puede ser una muestra que contiene células o una muestra que contiene células tumorales recogidas de un sujeto que se va a diagnosticar o tratar.

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

Se divulga un método para diagnosticar o evaluar una respuesta inmunológica de un sujeto al que se ha administrado al menos uno de los péptidos de ECT2 de la presente invención, incluyendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto un inmunógeno con células inmunocompetentes bajo la condición adecuada de inducción de CTL específicos para el inmunógeno;

(b) detectar o determinar el nivel de inducción de los CTL inducidos en la etapa (a); y

(c) correlacionar la respuesta inmunológica del sujeto con el nivel de inducción de CTL.

5 El inmunógeno puede ser al menos uno de (a) un péptido de ECT2 seleccionado de entre las SEQ ID NOs: 1 a 40 y
 (b) péptidos que tienen estas secuencias de aminoácidos en las que estas secuencias de aminoácidos se han
 modificado con 1, 2 o más sustituciones de aminoácidos. Entre tanto, las condiciones adecuadas para la inducción
 de CTL específicos para el inmunógeno son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, células inmunocompetentes
 se pueden cultivar in vitro bajo la presencia de un inmunógeno o inmunógenos para inducir CTL específicos del
 10 inmunógeno. A fin de inducir CTLs específicos del inmunógeno, se pueden añadir cualesquiera factores
 estimulantes al cultivo celular. Por ejemplo, IL-2 puede ser el factor estimulante para la inducción de CTL.

La etapa de comprobar o evaluar una respuesta inmunológica de un sujeto que se va a tratar con terapia peptídica
 15 contra el cáncer se puede realizar antes, durante y/o después del tratamiento. En general, durante un protocolo de
 terapia contra el cáncer, péptidos inmunogénicos se administran repetidamente a un sujeto que se va a tratar. Por
 ejemplo, los péptidos inmunogénicos se puede administrar cada semana durante 3-10 semanas. Según esto, la
 respuesta inmunológica del sujeto se puede evaluar o comprobar durante el protocolo de terapia contra el cáncer.
 Alternativamente, la etapa de evaluación o comprobación de la respuesta inmunológica a la terapia contra el cáncer
 puede ser al finalizar el protocolo terapéutico.

20 Una inducción potenciada de CTL específicos de inmunógeno en comparación con un control indica que el sujeto
 que se va a evaluar o diagnosticar respondía inmunológicamente al inmunógeno o los inmunógenos que se han
 administrado. 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 sin péptido, o un péptido o péptidos
 25 de control que tienen secuencias de aminoácidos distintas a cualesquiera péptidos de ECT2 (p. ej. secuencia de
 aminoácidos aleatoria). La respuesta inmunológica del sujeto se puede evaluar de un modo específico para la
 secuencia, por comparación con una respuesta inmunológica entre cada inmunógeno administrado al sujeto. En
 particular, incluso cuando se administra al sujeto una mezcla de algunos tipos de péptidos de ECT2, la respuesta
 inmunológica podría variar dependiendo de los péptidos. En ese caso, por comparación de la respuesta
 30 inmunológica entre cada péptido, se pueden identificar péptidos para los que el sujeto muestra una respuesta
 superior.

XI. Anticuerpos

La presente invención proporciona además anticuerpos que se unen a los péptidos de la presente invención. Los
 35 anticuerpos se unen específicamente al péptido de la presente invención y no se unirá (o se unirá débilmente) a un
 no péptido de la presente invención. Alternativamente, los anticuerpos se pueden unir al péptido de la invención así
 como los homólogos de los mismos. Los anticuerpos contra el péptido de la invención pueden encontrar uso en
 ensayos de diagnóstico y pronóstico del cáncer y metodologías de obtención de imágenes. De forma similar, estos
 anticuerpos pueden encontrar uso en el tratamiento, el diagnóstico y/o el pronóstico de otros cánceres, hasta el
 40 punto de que ECT2 también se expresa o sobreexpresa en un paciente con cáncer. Por otra parte, los anticuerpos
 expresados intracelularmente (p. ej., anticuerpos monocatenarios) pueden encontrar uso terapéuticamente en el
 tratamiento de cánceres en los que está implicada la expresión de ECT2, ejemplos de los cuales incluyen, pero no
 se limitan a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML,
 cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y
 SCLC.

45 La presente divulgación también proporciona diversos ensayos inmunológicos para la detección y/o la cuantificación
 de proteína de ECT2 (SEQ ID NO: 42) o fragmentos de la misma incluyendo un polipéptido que tiene el aminoácido
 seleccionado de entre SEQ ID NOs: 1 a 40. Estos ensayos pueden incluir uno o más anticuerpos anti-ECT2 capaces
 de reconocer y unirse a una proteína de ECT2 o fragmentos de la misma, según sea apropiado. En la presente
 50 divulgación, anticuerpos anti-ECT2 que se unen a polipéptido de ECT2 pueden reconocer un polipéptido que tiene
 una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1 a 40. Una especificidad de unión de un
 anticuerpo se puede confirmar con una prueba de inhibición. Esto es, cuando la unión entre un anticuerpo que se va
 a analizar y la longitud completa del polipéptido de ECT2 se inhibe bajo la presencia de cualesquiera polipéptidos
 fragmentarios que tengan una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1 a 40, el anticuerpo
 55 se une específicamente al fragmento.

Estos ensayos inmunológicos se realizan dentro de diversos formatos de ensayo inmunológicos bien conocidos en la
 técnica, incluyendo, pero no limitados a, diversos tipos de radioinmunoensayos, una técnica inmunocromatográfica,

ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes con enzimas ligadas (ELIFA), y similares.

5 Ensayos inmunológicos relacionados pero sin anticuerpos también pueden incluir ensayos de inmunogenicidad de células T (inhibidores o estimuladores) así como ensayos de unión a MHC. Además, también se describen métodos inmunológicos de obtención de imágenes capaces de detectar cánceres que expresan ECT2, incluyendo, pero no limitados a, métodos de obtención de imágenes radioescintigráficos que usan anticuerpos marcados de la presente invención. Estos ensayos pueden encontrar uso en la detección, la comprobación y el pronóstico de cánceres que expresan ECT2 incluyendo, pero no limitados a, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC.

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

20 Un péptido de la invención usado como un antígeno para obtener un anticuerpo se puede derivar de cualquier especie de animal, p. ej. de un mamífero tal como un ser humano, un ratón o una rata. Un péptido derivado de ser humano se puede obtener a partir de las secuencias nucleotídicas o de aminoácidos divulgadas en la presente.

25 Según la presente invención, el péptido que se va a usar como un antígeno de inmunización puede ser una proteína completa o un péptido parcial de la proteína. Un péptido parcial puede incluir, por ejemplo, el fragmento del extremo amino (N) o el extremo carboxi (C) de un péptido de la presente invención.

30 En la presente, un anticuerpo se define como una proteína que reacciona bien con la longitud completa o bien con un fragmento de un péptido de ECT2. El anticuerpo divulgado en la presente puede reconocer péptidos fragmentarios de ECT2 que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1 a 40. Métodos para sintetizar un oligopéptido son conocidos en la técnica. Después de la síntesis, los péptidos se pueden purificar opcionalmente antes del uso como inmunógeno. El oligopéptido (p. ej., 9- o 10mero) se puede conjugar o conectar con portadores para potenciar la inmunogenicidad. La hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH) es muy conocida como el portador. Métodos para conjugar KLH y péptido también son conocidos en la técnica.

35 Alternativamente, un gen que codifica un péptido de la invención o fragmento del mismo se puede insertar en un vector de expresión conocido, que se usa a continuación para transformar una célula hospedadora según se describe en la presente. El péptido deseado o fragmento del mismo se puede recuperar del exterior o el interior de las células hospedadoras mediante cualquier método estándar, y posteriormente se puede usar como un antígeno. Alternativamente, células enteras que expresan el péptido o sus lisados o un péptido sintetizado químicamente se pueden usar como el antígeno.

45 Cualquier animal mamífero se puede inmunizar con el antígeno, pero puede tenerse en cuenta la compatibilidad con 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, el conejo. Animales de la familia Primate incluyen, por ejemplo, un mono de Catarrhini (mono del viejo mundo) tal como *Macaca fascicularis*, mono rhesus, babuino sagrado y chimpancés.

50 Métodos para inmunizar animales con antígenos son conocidos en la técnica. La inyección intraperitoneal o la inyección subcutánea de antígenos es un método estándar para la inmunización de mamíferos. Más específicamente, los antígenos se pueden diluir y suspender en una cantidad apropiada de solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, etc. Si se desea, la suspensión de antígeno se puede mezclar con una cantidad apropiada de un adyuvante estándar, tal como adyuvante completo de Freund, formarse como una emulsión y a continuación administrarse a animales mamíferos. Esto puede ser seguido por varias administraciones de antígeno mezclado con una cantidad apropiadamente de adyuvante incompleto de Freund cada 4 a 21 días. Un portador apropiado también se puede usar para la inmunización. Después de la inmunización como anteriormente, el suero se puede examinar mediante un método estándar con respecto a un incremento en la cantidad de anticuerpos deseados.

60 Anticuerpos policlonales contra los péptidos de la presente invención se pueden preparar recogiendo sangre del mamífero inmunizado examinado con respecto al incremento de anticuerpos deseados en el suero, y al separar el suero de la sangre mediante cualquier método convencional. Anticuerpos policlonales incluyen suero que contiene los anticuerpos policlonales, así como la fracción que contiene los anticuerpos policlonales se puede aislar del suero. Se puede preparar inmunoglobulina G o M a partir de una fracción que reconoce solamente el péptido de la presente invención usando, por ejemplo, una columna de afinidad acoplada con el péptido de la presente invención, y purificando adicionalmente esta fracción usando una columna de proteína A o proteína G.

65

Para preparar anticuerpos monoclonales, se recogen células inmunitarias del mamífero inmunizado con el antígeno y se comprueba el nivel incrementado de anticuerpos deseados en el suero según se describe anteriormente, y se someten a fusión celular. Las células inmunitarias usadas para la fusión celular se pueden obtener del bazo. Otras células parentales que se van a fusionar con el inmunocito anterior incluyen, por ejemplo, células de mieloma de mamíferos, o células de mieloma que tienen una propiedad adquirida para la selección de células fusionadas por fármacos.

El inmunocito y las células de mieloma anteriores se pueden fusionar según métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein y cols. (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).

Los hibridomas resultantes obtenidos mediante la fusión celular se pueden seleccionar cultivándolos en un medio de selección estándar, tal como medio HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo celular se continúa típicamente en el medio HAT durante de varios días a varias semanas, siendo el tiempo suficiente para permitir que todas las otras células, con la excepción del hibridoma (células no fusionadas) deseado, mueran. A continuación, se puede realizar la dilución limitativa 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 es inmunizado con un antígeno para preparar un hibridoma, linfocitos humanos tales como los infectados por virus de EB se pueden inmunizar con un péptido, células que expresan péptido o sus lisados *in vitro*. A continuación, los linfocitos inmunizados se fusionan con células de mieloma derivadas de ser humano que son capaces de dividirse indefinidamente, tales como U266, para dar un hibridoma que produce un anticuerpo humano deseado que es capaz de unirse al péptido (Solicitud de Patente Japonesa Publicada No Examinada N° Sho 63-17688).

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

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

Los anticuerpos monoclonales así obtenidos también se pueden preparar recombinantemente usando técnicas de manipulación genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck y Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1990)). Por ejemplo, un ADN que codifica un anticuerpo se puede clonar a partir de una célula inmunitaria, tal como una hibridoma o un linfocito inmunizado que produce el anticuerpo, insertado en un vector apropiado, e introducirse en células hospedadoras para preparar un anticuerpo recombinante. La presente invención también proporciona anticuerpos recombinantes preparados como se describe anteriormente según las reivindicaciones.

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

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

Alternativamente, un anticuerpo de la presente invención se puede obtener como un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de un anticuerpo no humano y la región constante derivada de anticuerpo humano, o como un anticuerpo humanizado, que incluye la región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de anticuerpo no humano, la región de entramado (FR) y la región constante derivada de anticuerpo humano. Estos anticuerpos se pueden preparar según tecnología conocida. La humanización se puede realizar al sustituir CDRs o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (véase, p. ej., Verhoeyen y cols., *Science* 239:1534-1536 (1988)). Según esto, estos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente procedente de una especie no humana.

También se pueden usar anticuerpos completamente humanos que incluyen regiones variables humanas además de regiones de entramado y constantes humanas. Estos anticuerpos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la especialidad. Por ejemplo, los métodos *in vitro* implican el uso de bibliotecas recombinantes de fragmentos de anticuerpo humano expuestos sobre bacteriófago (p. ej., Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991)). De forma similar, se pueden elaborar anticuerpos humanos al introducir locus inmunoglobulínicos humanos en animales transgénicos, p. ej., ratones en los que se han inactivado parcialmente o completamente genes inmunoglobulínicos endógenos. Este enfoque se describe, p. ej., en las Patentes de EE. UU. N° 6.150.584, 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016.

Los anticuerpos obtenidos como anteriormente se pueden purificar hasta homogeneidad. Por ejemplo, la separación y la purificación del anticuerpo se pueden realizar según los métodos de separación y purificación usados para proteínas generales. Por ejemplo, el anticuerpo se puede separar y aislar mediante el uso apropiadamente seleccionado y aislado de cromatografías en columna, tales como cromatografía de afinidad, filtración, ultrafiltración, desalado, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y enfoque isoelectrico (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero no se limitan a los mismos. Una columna de proteína A y una columna de proteína G se pueden usar como la columna de afinidad. Columnas de proteína A ejemplares que se van a usar incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharose F.F. (Farmacia).

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

Por ejemplo, se pueden usar la medida de la absorbancia, un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), un inmunoensayo enzimático (EIA), un radioinmunoensayo (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 sobre una placa, un péptido de la invención se aplica a la placa, y a continuación se aplica una muestra que contiene un anticuerpo deseado, tal como un sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpo o anticuerpos purificados. A continuación, se aplica un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario está marcado con una enzima, tal como fosfatasa alcalina, y la placa se incuba. Posteriormente, después del lavado, un sustrato enzimático, tal como fosfato de p-nitrofenilo, se aplica a la placa, y la absorbancia se mide para evaluar la actividad de unión al antígeno de la muestra. Un fragmento del péptido, tal como un fragmento C-terminal o N-terminal, se puede usar como el antígeno para evaluar la actividad de unión del anticuerpo. Se puede usar BIAcore (Farmacia) para evaluar la actividad del anticuerpo según la presente invención.

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

Debido a que el método de detección o medida del péptido según la divulgación 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

La presente invención también proporciona un vector en el que se introduce un nucleótido que codifica el péptido de la presente invención. Un vector de la presente invención puede encontrar uso para mantener un nucleótido, especialmente un ADN, de la presente invención en la célula hospedadora, para expresar el péptido de la presente invención, o para administrar el nucleótido de la presente invención para terapia génica.

Cuando *E. coli* es una célula hospedadora y el vector se amplifica y se produce en una gran cantidad en *E. coli* (p. ej., JM109, DH5 alpha, HB101 o XL1Blue), el vector debe tener "ori" para ser amplificado en *E. coli* y un gen marcador para seleccionar *E. coli* transformada (p. ej., un gen de resistencia a fármaco seleccionado por un fármaco tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol o similares). Por ejemplo, se pueden usar vectores de la serie M13, vectores de la serie pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, etc. Además, también se pueden usar pGEM-T, pDIRECT y pT7 para subclonar y extraer ADNc así como los vectores descritos anteriormente. Cuando se usa un vector para producir la proteína de la presente invención, pueden encontrar uso un vector de expresión. Por ejemplo, un vector de expresión que se va a expresar en *E. coli* debe tener las características anteriores para ser amplificado en *E. coli*. Cuando se usan *E. coli*, tal como JM109, DH5 alpha, HB101 o XL1 Blue, como una célula hospedadora, el vector debe tener un promotor, por ejemplo, el promotor de lacZ (Ward y cols., *Nature* 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), el promotor de araB (Better y cols., *Science* 240: 1041-3 (1988)), el promotor de T7 o similares, que pueden expresar eficazmente el gen deseado en *E. coli*. A este respecto, pGEX-5X-1 (Farmacia), "QIAexpress

system" (Qiagen), pEGFP y pET (en este caso, el hospedador es preferiblemente BL21 que expresa ARN polimerasa de T7), por ejemplo, se pueden usar en lugar de los vectores anteriores. Adicionalmente, el vector también puede contener una secuencia de señal para la secreción del péptido. Una secuencia de señal ejemplar que dirige el péptido que se va a secretar al periplasma de la *E. coli* es la secuencia de señal pelB (Lei y cols., *J Bacteriol* 169: 4379 (1987)). Medios para la introducción de los vectores en las células hospedadoras diana incluyen, por ejemplo, el método del cloruro cálcico y el método de electroporación.

Además de *E. coli*, 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 insecto (por ejemplo, "sistema de expresión baculoviral Bac-to-BAC" (GIBCO BRL), pBacPAK8), vectores de expresión derivados de plantas (p. ej., pMH1, pMH2), vectores de expresión derivados de virus de animales (p. ej., pHSV, pMV, pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (p. ej., pZIpneo), un vector de expresión derivado de levadura (p. ej., "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01) y vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (p. ej., pPL608, pKTH50) se pueden usar para producir el polipéptido de la presente invención.

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

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar a un experto normal a elaborar y usar la misma.

Ejemplos

Materiales y métodos

Líneas celulares

T2 (HLA-A2), línea celular linfoblastoide B humana, y COS7, línea celular renal de mono verde africano, se adquirieron de ATCC.

Selección de candidatos de péptidos derivados de ECT2

Péptidos 9-meros y 10-meros derivados de ECT2 que se unen a la molécula HLA-A*0201 se predijeron usando el software de predicción de unión "BIMAS" (www.bimas.citdcr.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla_bindken_parker_comboform) (Parker y cols. (*J Immunol* 1994, 152(1): 163-75), Kuzushima y cols. (*Blood* 2001, 98(6): 1872-81)). Estos péptidos fueron sintetizados por Biosynthesis (Lewisville, Texas) según un método de síntesis en fase sólida estándar y se purificaron mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa (HPLC). La pureza (>90%) y la identidad de los péptidos se determinaron mediante HPLC analítica y análisis espectrométrico de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en dimetilsulfóxido en 20 mg/ml y se almacenaron a -80 grados C.

Inducción de CTL in vitro

Se usaron células dendríticas derivadas de monocitos (DCs) como células que presentan antígeno para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra péptidos presentados sobre antígeno leucocitario humano (HLA). Las DCs se generaron in vitro según se describe en otras partes (Nakahara S y cols., *Cancer Res* 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8). Específicamente, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) aisladas de un voluntario normal (positivas a HLA-A*0201) mediante solución Ficoll-Plaque (Pharmacia) se separaron mediante adhesión a un disco de cultivo tisular de plástico (Becton Dickinson) a fin de enriquecerlas como la fracción monocítica. La población enriquecida en monocitos se cultivó en presencia de 1.000 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (R&D System) y 1,000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D System) en AIM-V Medium (Invitrogen) que contiene 2% de suero autólogo (AS) inactivado térmicamente. Después de 7 días de cultivo, las DCs inducidas por citocina se impulsaron con 20 micro-g/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en presencia de 3 micro-g/ml de microglobulina beta 2 durante 3 h a 37 grados C en AIM-V Medium. Las células generadas parecían expresar moléculas asociadas a DC, tales como CD80, CD83, CD86 y HLA clase II, sobre sus superficies celulares (datos no mostrados). Estas DCs impulsadas por péptido se inactivaron a continuación mediante irradiación X (20 Gy) y se mezclaron en una relación 1:20 con células T CD8+ autólogas, obtenidas mediante selección positiva con CD8 Positive Isolation Kit (Dynal). Estos cultivos se establecieron en placas de 48 pocillos (Corning); cada pocillo contenía $1,5 \times 10^4$ DCs impulsadas por péptido, 3×10^5 células T CD8+ y 10 ng/ml de IL-7 (R&D System) en 0,5 ml de medio AIM-V/2% de AS. Tres días más tarde, estos cultivos se complementaron con IL-2 (CHIRON) hasta una

concentración final de 20 IU/ml. Los días 7 y 14, las células T se estimularon adicionalmente con las DCs impulsadas con péptido autólogas. Las DCs se prepararon cada vez del mismo modo descrito anteriormente. Los CTLs se probaron contra células T2 impulsadas con péptido después de la 3ª ronda de estimulación con péptido el día 21 (Tanaka H y cols., Br J Cancer 5 de enero de 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y cols., Br J Cancer 20 de abril de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y cols., Clin Cancer Res 15 de diciembre de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci mayo de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Procedimiento de expansión de CTL

Los CTLs se expandieron en cultivo usando un método similar al descrito por Riddell y cols. (Walter EA y cols., N Engl J Med 19 de octubre de 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR y cols., Nat Med febrero de 1996, 2(2): 216-23). Un total de 5×10^4 CTLs se suspendieron en 25 ml de medio AIM-V/5% de AS con 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas, se inactivaron mediante mitomicina C, en presencia de 40 ng/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen). Un día después de iniciar los cultivos, se añadieron a los cultivos 120 IU/ml de IL-2. Los cultivos se alimentaron con medio AIM-V/5% de AS reciente que contenía 30 IU/ml de IL-2 los días 5, 8 y 11 (Tanaka H y cols., Br J Cancer 5 de enero de 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y cols., Br J Cancer 20 de abril de 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y cols., Clin Cancer Res 15 de diciembre de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci mayo de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Establecimiento de clones de CTL

Las diluciones se realizaron para tener 0,3, 1 y 3 CTLs/pocillo en una microplaca de fondo redondo de 96 pocillos (Nalge Nunc International). Los CTLs se cultivaron con 1×10^4 células/pocillo de 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humana, 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 y 125 U/ml de IL-2 en un total de 150 micro-l/pocillo de AIM-V Medium que contenía 5% de AS. Se añadieron 50 micro-l/pocillo de IL-2 al medio 10 días más tarde a fin de alcanzar una concentración final de 125 U/ml de IL-2. La actividad de CTL se probó el día 14º, y los clones de CTL se expandieron usando el mismo método que se describe anteriormente (Uchida N y cols., Clin Cancer Res 15 de diciembre de 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci mayo de 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci agosto de 2005, 96(8): 498-506).

Actividad específica de CTL

Para examinar la actividad específica de CTL, se realizaron un ensayo (ELISPOT) de inmunogoteo con enzimas ligadas (IFN)-gamma interferón y un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) IFN-gamma. Específicamente, se prepararon T2 impulsadas con péptido (1×10^4 /pocillo) como células estimulantes. Se usaron células cultivadas en 48 pocillos como células sensibles. Se realizaron ELISPOT de IFN-gamma y ELISA de IFN-gamma bajo el procedimiento de fabricación.

Establecimiento de las células que expresan forzosamente cualquiera o ambos del gen diana y HLA-A02

El ADNc que codifica un marco de lectura abierto de genes diana o HLA-A*0201 se amplificó mediante PCR. El producto amplificado por PCR se clonó en un vector. Los plásmidos se transfectaron a COS7, que son los genes diana, y línea celular nula a HLA-A*0201, usando lipofectamine 2000 (Invitrogen) según los procedimientos recomendados por el fabricante. Después de 2 días desde la transfección, las células transfectadas se recogieron con versene (Invitrogen) y se usaron como las células diana (5×10^4 células/pocillo) para el ensayo de actividad de CTL.

Resultados

Expresión potenciada de ECT2 en cánceres

Los datos del perfil de expresión génica global obtenidos de diversos cánceres usando una micromatriz de ADNc revelaban que la expresión de ECT2 (Nº de Registro del GenBank AY376439; p. ej., SEQ ID No: 41) era elevada. La expresión de ECT2 se elevaba válidamente en 17 de 19 cánceres de vejiga urinaria, 5 de 12 cánceres de mama, 14 de 14 cánceres de cuello uterino, 13 de 13 carcinomas colangiocelulares, 5 de 5 CML, 7 de 8 cánceres colorrectales, 12 de 16 cánceres esofágicos, 6 de 16 NSCLC, 8 de 10 linfomas, 1 de 1 cáncer pancreático, 10 de 13 cánceres de próstata, 3 de 6 carcinomas renales y 12 de 13 cánceres SCLC en comparación con el tejido normal correspondiente (Tabla 1).

[Tabla 1]

Relación de casos de regulación al alza observada de ECT2 en tejido canceroso en comparación con tejido correspondiente normal.

5

Cáncer de vejiga urinaria	17/19
Cáncer de mama	5/12
Cáncer de cuello uterino	14/14
Carcinoma colangiocelular	13/13
CML	5/5
Cáncer colorrectal	7/8
Cáncer de esófago	12/16
NSCLC	6/16
Linfoma	8/10
Cáncer pancreático	1/1
Cáncer de próstata	10/13
Carcinoma renal	3/6
SCLC	12/13

Predicción de péptidos que se unen a HLA-A02 derivados de ECT2

Las Tablas 2a y 2b muestran los péptidos 9meros y 10 meros que se unen a HLA-A02 de ECT2 en el orden de alta afinidad de unión. Un total de 40 péptidos con capacidad de unión a HLA-A02 potencial se seleccionaron y se examinaron para determinar los péptidos epitópicos.

10

[Tabla 2a]

Péptidos 9meros que se unen a HLA-A02 derivados de ECT2

15

SEQ ID NO	Posición de partida	Secuencia de aminoácidos	Puntuación
1	34	LLIGSTSYV	650,311
2	619	QIFDVVEV	333,677
3	664	FLFNDCLEI	177,566
4	662	TLFLFNDCL	147,174
5	634	LLSSHRSLV	118,238
6	145	MMNLVLCFT	115,74
7	561	LLIRPVQRL	83,527
8	98	VVTFQDSV	78,982
9	575	LLNDLKKHT	51,94
10	240	FQDCILSFL	50,414
11	292	FEPSKKLYV	34,216
12	823	ALMTSHGSV	33,455
13	220	NEQDFYAAV	31,606
14	755	MLCRHVANT	29,137
15	357	AQLSRETDV	26,092
16	438	NILATIIQL	24,997

ES 2 655 437 T3

SEQ ID NO	Posición de partida	Secuencia de aminoácidos	Puntuación
17	874	TLSRSTTHL	21,362
18	568	RLPSVALLL	21,362
19	166	TLVHHMGGV	20,796
20	443	IIQLFQVPL	18,975

La Posición de partida indica el número de residuo de aminoácido desde el extremo N de ECT2

La puntuación de unión se deriva de "BIMAS"

5

[Tabla 2b]

Péptidos 10meros que se unen a HLA-A02 derivados de ECT2

SEQ ID NO	Posición de partida	Secuencia de aminoácidos	Puntuación
21	33	NLLI _g STSYV	1415,383
22	633	NLLS _s HRSLV	257,342
23	144	SMMN1VLCFT	251,905
24	701	LMPL _s QIKKV	196,407
25	754	KMLCrHVANT	160,303
26	557	SLVE1LIRPV	131,175
27	191	TQGEKFRVAV	109,867
28	774	YTAD _p ESFEV	105,669
29	428	ELYQ _t ESNYV	91,809
30	618	KQIF _d VVYEV	56,767
31	97	FVVT _d FQDSV	52,126
32	20	SIFD _s KVTEI	50,051
33	574	LLLNdLKKHT	46,873
34	461	ILAP _e EIKTI	40,792
35	664	FLFN _d CLEIA	39,07
36	575	LLND1KKHTA	34,627
37	430	YQTE _s NYVNI	29,924
38	511	DLVK _t YPPFV	28,69
39	471	FGSI _p DIFDV	27,86
40	87	GLDS _p EFENV	25,901

10

La Posición de partida indica el número de residuo de aminoácido desde el extremo N de ECT2

La puntuación de unión se deriva de "BIMAS"

Inducción de CTL con los péptidos predichos procedentes de ECT2 restringidos con HLA-A*0201

15

CTLs para esos péptidos derivados de ECT2 se generaron según los protocolos que se describen en "Materiales y métodos". La actividad de CTL específica para el péptido se determinó mediante un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma (Figuras 1a-c). El número de pocillo nº 6 estimulado con ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a), el pocillo nº 5 estimulado con ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) (b) y el pocillo nº 1 estimulado con ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (c) demostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control. Como resultado, indicaba que ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a), ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) (b) y ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (c) derivados de ECT2 se cribaba como los péptidos que podían inducir CTLs potentes.

20

Establecimiento de líneas y clones de CTL contra péptidos derivados de ECT2

5 Las células que mostraban actividad de CTL específica para péptidos detectada mediante un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma en el número de pocillo nº 6 estimulado con ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a), nº 5 estimulado con ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) (b) y nº 1 estimulado con ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (c) se expandieron y las líneas de CTL se establecieron mediante el procedimiento de dilución limitativa descrito anteriormente en la sección de "Materiales y métodos". La actividad de CTL de estas líneas de CTL se determinó mediante un ensayo de ELISA de IFN-gamma (Figuras 2a-c). Las líneas de CTL demostraban una potente producción de IFN-gamma contra las células diana impulsadas con el correspondiente péptido en comparación con células diana sin impulso peptídico. Por otra parte, se establecieron clones de CTL mediante dilución limitativa a partir de líneas de CTL según se describe en "Materiales y métodos", y la producción de IFN-gamma a partir de clones de CTL contra células diana impulsadas con péptido se determinó mediante un ensayo de ELISA de IFN-gamma. Se determinaron potentes producciones de IFN-gamma a partir de clones de CTL estimulados con ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a) y ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) (b) en la Figura 3.

Actividad específica de CTL contra células diana que expresan exógenamente ECT2 y HLA-A*0201

15 Las líneas de CTL establecidas y los clones producidos contra estos péptidos se examinó con respecto a la capacidad para reconocer células diana que expresan exógenamente ECT2 y la molécula de HLA-A*0201. La actividad específica de CTL contra células COS7 que se transfectaban tanto con la longitud completa de ECT2 como con el gen de la molécula HLA-A*0201 (un modelo específico para las células diana que expresan exógenamente ECT2 y el gen de HLA-A*0201) se probó al usar líneas de CTL y clones producidos por el péptido correspondiente como las células efectoras. Células COS7 transfectadas bien con la longitud completa de ECT2 o bien con HLA-A* 0201 se prepararon como los controles. En la Figura 4, el clon de CTL estimulado con ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a) y la línea de CTL estimulada con ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (b) mostraban una potente actividad de CTL contra células COS7 que expresaban tanto ECT2 como HLA-A* 0201. Por otra parte, no se detectó una actividad específica de CTL significativa contra los controles. Así, estos datos demuestran claramente que ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a), ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (b) se expresaban naturalmente sobre las células diana con molécula de HLA-A*0201 y eran reconocidos por los CTLs. Estos resultados indicaban que ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a) y ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (b) derivados de ECT2 pueden ser adecuados como una vacuna contra el cáncer para el tratamiento de pacientes con tumores que expresan ECT2.

30 Análisis de homología de péptidos antigénicos

Los CTLs estimulados con ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1), ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) y ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) mostraban una actividad de CTL significativa y específica. Este resultado se puede deber al hecho de que la secuencia de ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1), ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) y ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) son homólogas a un péptido derivado de otras moléculas que se sabe que sensibilizan el sistema inmunitario humano. Para excluir esta posibilidad, se realizaron análisis de homología para estas secuencias peptídicas usando como interrogantes el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) que no revelaba una secuencia con homología significativa. Los resultados de los análisis de homología indican que la secuencia de ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1), ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) y ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) son únicas y, así, existe poca posibilidad, hasta donde se sabe, de que estas moléculas provoquen una respuesta inmunológica no intencionada en alguna molécula no relacionada.

En conclusión, se identificaron nuevos péptidos epitópicos de HLA-A2 derivados de ECT2. Por otra parte, los presentes resultados demuestran que los péptidos epitópicos de ECT2 pueden ser adecuados para la inmunoterapia del cáncer.

45 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención proporciona nuevos TAAs, particularmente los derivados de ECT2, que pueden inducir respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas y tienen aplicabilidad a una amplia variedad de tipos de cáncer. Estos TAAs pueden encontrar uso como vacunas peptídicas contra enfermedades asociadas con ECT2, p. ej., cáncer, más particularmente, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC.

55 Aunque la presente invención se describe en la presente con detalle y con referencia a realizaciones específicas de la misma, se ha de entender que la descripción precedente es de naturaleza ejemplar y explicativa y está destinada a ilustrar la presente invención y sus realizaciones preferidas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDO DE ECT2 Y VACUNAS QUE INCLUYEN LOS MISMOS

<130> ONC-A1010P

5 <150> US 61/320,577

< 151> 2010-04-02

<160> 46

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15 <400> 1

Leu Leu Ile Gly Ser Thr Ser Tyr Val
1 5

<210> 2

< 211> 9

< 212> PRT

20 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 2

Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr Glu Val
1 5

25 <210> 3

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 3

5 **Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile**
 1 5

<210> 4

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10 <220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 4

Thr Leu Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu
 1 5

<210> 5

15 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

20 <400> 5

Leu Leu Ser Ser His Arg Ser Leu Val
 1 5

<210> 6

< 211> 9

< 212> PRT

25 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 6

Met Met Asn Leu Val Leu Cys Phe Thr
1 5

<210> 7

< 211> 9

5 < 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 7

10 Leu Leu Ile Arg Pro Val Gln Arg Leu
1 5

<210> 8

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

15 <220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 8

Val Val Thr Asp Phe Gln Asp Ser Val
1 5

<210> 9

20 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

25 <400> 9

Leu Leu Asn Asp Leu Lys Lys His Thr
1 5

<210> 10

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

5 < 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 10

Phe Gln Asp Cys Ile Leu Ser Phe Leu
1 5

<210> 11

< 211> 9

10 < 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 11

15 Phe Glu Pro Ser Lys Lys Leu Tyr Val
1 5

<210> 12

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

20 <220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 12

Ala Leu Met Thr Ser His Gly Ser Val
1 5

<210> 13

25 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 13

Asn Glu Gln Asp Phe Tyr Ala Ala Val
1 5

5 <210> 14

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

10 < 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 14

Met Leu Cys Arg His Val Ala Asn Thr
1 5

<210> 15

< 211> 9

15 < 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 15

20 Ala Gln Leu Ser Arg Glu Thr Asp Val
1 5

<210> 16

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

25 <220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 16

Asn Ile Leu Ala Thr Ile Ile Gln Leu
1 5

<210> 17

< 211> 9

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 17

Thr Leu Ser Arg Ser Thr Thr His Leu
1 5

10 <210> 18

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

15 < 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 18

Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Leu Leu
1 5

<210> 19

< 211> 9

20 < 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 19

25 Thr Leu Val His His Met Gly Gly Val
1 5

<210> 20

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5 <400> 20

Ile Ile Gln Leu Phe Gln Val Pro Leu
 1 5

<210> 21

< 211> 10

< 212> PRT

10 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 21

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

15 <210> 22

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

20 < 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 22

Asn Leu Leu Ser Ser His Arg Ser Leu Val
 1 5 10

<210> 23

< 211> 10

25 < 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

<210> 27

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5 <220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 27

Thr Gln Gly Glu Lys Phe Arg Val Ala Val

1 5 10

10 <210> 28

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

15 < 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 28

Tyr Thr Ala Asp Pro Glu Ser Phe Glu Val

1 5 10

<210> 29

< 211> 10

20 < 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> ELYQtESNYV

<400> 29

Glu Leu Tyr Gln Thr Glu Ser Asn Tyr Val

25 1 5 10

<210> 30

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5 <400> 30

Lys Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr Glu Val
1 5 10

<210> 31

< 211> 10

< 212> PRT

10 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 31

Phe Val Val Thr Asp Phe Gln Asp Ser Val
1 5 10

15 <210> 32

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

20 < 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 32

Ser Ile Phe Asp Ser Lys Val Thr Glu Ile
1 5 10

<210> 33

< 211> 10

25 < 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 33

Leu Leu Leu Asn Asp Leu Lys Lys His Thr
1 5 10

<210> 34

5 < 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 34

Ile Leu Ala Pro Glu Glu Ile Lys Thr Ile
1 5 10

<210> 35

< 211> 10

< 212> PRT

15 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 35

Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile Ala
1 5 10

20 <210> 36

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

25 < 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 36

Leu Leu Asn Asp Leu Lys Lys His Thr Ala
1 5 10

<210> 37

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5 <220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 37

Tyr	Gln	Thr	Glu	Ser	Asn	Tyr	Val	Asn	Ile
1				5					10

<210> 38

10 < 211> 10

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15 <400> 38

Asp	Leu	Val	Lys	Thr	Tyr	Pro	Pro	Phe	Val
1			5						10

<210> 39

< 211> 10

< 212> PRT

20 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 39

Phe	Gly	Ser	Ile	Pro	Asp	Ile	Phe	Asp	Val
1			5						10

25 <210> 40

< 211> 10

< 212> PRT

ES 2 655 437 T3

ctagactgga gtgcagtggc acgatctcgg ctcaactgcaa cctctgcctc ccgggttcaa 180
gcgattctcc tgcctcagcc tcctgagtag ctgggattac aggtgcctgc caccaagccc 240
agctaatttt tgtatTTTTA gtAgagatgg ggTTTcattg tGttggccag gctggtctcg 300
aactcctgac ctcgtgatcc gcccgcttg gcctcccaa gtgctaggat tacaagtgtg 360
agccaccgcg tccggccttt caaatggtat ttttgatttt cctcttcag tccttaaagc 420
agctgattta gaagaataca aatcatggct gaaaatagtG tattaacatc cactactggg 480
aggactagct tggcagactc ttccattttt gattctaaag tTactgagat ttccaaggaa 540
aacttactta ttggatctac ttcatatgta gaagagatgc ctCagattga aacaagagtG 600
atattggttc aagaagctgg aaaacaagaa gaacttataa aagccttaa ggacattaaa 660
gtgggctttg taaagatgga gtcagtggaa gaatttgaag gtttggattc tccggaattt 720
gaaaaatgat ttgtagtcac ggactttcag gattctgtct tTaatgacct ctacaaggct 780
gattgtagag ttattggacc accagttgta tTaaattggt cacaaaaagg agagcctttg 840
ccattttcat gtcgccggtt gtattgtaca agtatgatga atctagtact atgctttact 900
ggatttagga aaaaagaaga actagtCagg ttggtgacat tggTccatca catgggtgga 960
gttattcgaa aagactttaa ttcaaaagtT acacatttgg tggcaaattg tacacaagga 1020
gaaaaattca gggttgctgt gagtctaggt actccaatta tgaagccaga atggatttat 1080
aaagcttggg aaaggcgga tgaacaggat ttctatgcag cagttgatga ctttagaaat 1140
gaatttaaag ttctccatt tcaagattgt attttaagtt tctgggatt ttCagatgaa 1200
gagaaaacca atatggaaga aatgactgaa atgcaaggag gTaaatattt accgcttga 1260
gatgaaagat gCactcacct tGtagttgaa gagaatatag taaaagatct tccctttgaa 1320
cctcaaaga aactttatgt tGtcaagcaa gagtggttct ggggaagcat tcaaatggat 1380
gcccgagctg gagaaactat gtatttatat gaaaaggcaa atactcctga gctcaagaaa 1440
tcagtgtcaa tGctttctct aaatacccct aacagcaatc gcaaacgacg tGtttaaaa 1500
gaaacacttg ctCagctttc aagagagaca gacgtgtcac catttccacc ccgtaagcgc 1560
ccatcagctg agcattccct ttccataggg tcaactcctag atatctcaa cacaccagag 1620
tctagcatta actatggaga cacoccaaag tcttGacta agtcttctaa aagctccact 1680
ccagttcctt caaagcagtc agcaagtgG caagttgcaa aagagcttta tcaaaactgaa 1740
agtaattatg tTaatatatt ggcaacaatt attcagttat ttcaagtacc attggaagag 1800
gaaggacaac gtggtggacc tatccttgca ccagaggaga tTaaactat ttttggtagc 1860
atcccagata tctttgatgt acacactaag ataaaggatg atcttgaaga ccttatagtt 1920
aattgggatg agagcaaaag cattggtgac atttttctga aatattcaaa agatttggta 1980
aaaacctacc ctccctttgt aaacttcttt gaaatgagca aggaaacaat tattaatgt 2040
gaaaaacaga aaccaagatt tcatgctttt ctcaagataa accaagcaaa accagaatgt 2100

ES 2 655 437 T3

ggacggcaga gccttggtga acttcttata cgaccagtac agaggttacc cagtgttgca 2160
 ttacttttaa atgatcttaa gaagcataca gctgatgaaa atccagacaa aagcacttta 2220
 gaaaaagcta ttgatcact gaaggaagta atgacgcata ttaatgagga taagagaaaa 2280
 acagaagctc aaaagcaaat ttttgatggt gtttatgaag tagatggatg cccagctaata 2340
 cttttatctt ctcaccgaag ctttagtacag cggggtgaaa caatttctct agtgagcac 2400
 ccctgtgaca gaggagaaca agtaactctc ttcctcttca atgattgcct agagatagca 2460
 agaaaacggc acaaggttat tggcactttt aggagtctc atggcacaac ccgaccccca 2520
 gcttctctta agcatattca cctaatagcct ctttctcaga ttaagaagggt attggacata 2580
 agagagacag aagattgccca taatgctttt gccttgcttg tgaggccacc aacagagcag 2640
 gcaaatgtgc tactcagttt ccagatgaca tcagatgaac ttccaaaaga aaactggcta 2700
 aagatgctgt gtcgacatgt agctaacacc atttgtaaag cagatgctga gaatcttatt 2760
 tatactgctg atccagaatc ctttgaagta aatacaaaag atatggacag tacattgagt 2820
 agagcatcaa gagcaataaa aaagacttca aaaaaggtta caagagcatt ctctttctcc 2880
 aaaactcca aaagagctct tcgaagggtc cttatgacat cccacggctc agtggaggga 2940
 agaagtcctt ccagcaatga taagcatgta atgagtcgtc tttctagcac atcatcatta 3000
 gcaggtatcc cttctccctc ccttgcagc cttccttctt tctttgaaag gagaagtcata 3060
 acgttaagta gatctacaac tcatttgata tgaagcgtta ccaaaatctt aaattataga 3120
 aatgtataga cacctcatac tcaaataaga aactgactta aatggtaact gtaattagca 3180
 cgttggtgaa agctggaagg aagataaata acactaaact atgctatttg attttcttc 3240
 ttgaaagagt aaggtttacc tgttacattt tcaagttaat tcatgtaaaa aatgatagtg 3300
 atttgatgt aatttatctc ttgtttgaat ctgtcattca aaggccaata atttaagttg 3360
 ctatcagctg atattagtag ctttgcaacc ctgatagagt aaataaattt tatgggtggg 3420
 tgccaaatac tgctgtgaat ctatttgtat agtatccatg aatgaattta tggaaataga 3480
 tatttgtgca gctcaattta tgagagatt aaatgacatc ataatactgg atgaaaactt 3540
 gcatagaatt ctgattaaat agtgggtctg tttcacatgt gcagtttgaa gtatttaaat 3600
 aaccactcct ttcacagttt attttcttct caagcgtttt caagatctag catgtggatt 3660
 ttaaaagatt tgccctcatt aacaagaata acatttaaaag gagattgttt caaaatattt 3720
 ttgcaaatg agataaggac agaaagattg agaaacattg tatattttgc aaaaacaaga 3780
 tgttttagc tgtttcagag agagtacggt atatttatgg taattttatc cactagcaaa 3840
 tcttgattta gtttgatagt cgtcgtcgga attttatttt gaaggataag accatgggaa 3900
 aattgtggt aagactgttt gtacccttca tgaaataaatt ctgaagttgc catcagtttt 3960
 actaatcttc tgtgaaatgc atagatatgc gcatgttcaa ctttttattg tggcttata 4020

ES 2 655 437 T3

attaaatgta aaattgaaaa ttcatttgct gtttcaaagt gtgatatcct tcacaatagc 4080
 ctttttatag tcagtaattc agaataatca agttcatatg gataaatgca tttttatttc 4140
 ctatttcttt agggagtgc acaaagtgtt gtcacttaaa tttcaagttt ctgttttaat 4200
 agttaactga ctatagattg ttttctatgc catgtatgtg ccacttctga gagtagtaaa 4260
 tgactctttg ctacatttta aaagcaattg tattagtaag aactttgtaa ataaatacct 4320
 aaaacccaag tgtaaaaaaa aaaaaaaaa 4349

<210> 42

< 211> 882

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 42

Met Ala Glu Asn Ser Val Leu Thr Ser Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Asp Ser Ser Ile Phe Asp Ser Lys Val Thr Glu Ile Ser Lys Glu
 20 25 30

Asn Leu Leu Ile Gly Ser Thr Ser Tyr Val Glu Glu Met Pro Gln Ile
 35 40 45

Glu Thr Arg Val Ile Leu Val Gln Glu Ala Gly Lys Gln Glu Glu Leu
 50 55 60

Ile Lys Ala Leu Lys Asp Ile Lys Val Gly Phe Val Lys Met Glu Ser
 65 70 75 80

Val Glu Glu Phe Glu Gly Leu Asp Ser Pro Glu Phe Glu Asn Val Phe
 85 90 95

Val Val Thr Asp Phe Gln Asp Ser Val Phe Asn Asp Leu Tyr Lys Ala
 100 105 110

Asp Cys Arg Val Ile Gly Pro Pro Val Val Leu Asn Cys Ser Gln Lys
 115 120 125

Gly Glu Pro Leu Pro Phe Ser Cys Arg Pro Leu Tyr Cys Thr Ser Met
 130 135 140

Met Asn Leu Val Leu Cys Phe Thr Gly Phe Arg Lys Lys Glu Glu Leu
 145 150 155 160

Val Arg Leu Val Thr Leu Val His His Met Gly Gly Val Ile Arg Lys
 165 170 175

Asp Phe Asn Ser Lys Val Thr His Leu Val Ala Asn Cys Thr Gln Gly

ES 2 655 437 T3

Pro Leu Glu Glu Glu Gly Gln Arg Gly Gly Pro Ile Leu Ala Pro Glu
450 455 460

Glu Ile Lys Thr Ile Phe Gly Ser Ile Pro Asp Ile Phe Asp Val His
465 470 475 480

Thr Lys Ile Lys Asp Asp Leu Glu Asp Leu Ile Val Asn Trp Asp Glu
485 490 495

Ser Lys Ser Ile Gly Asp Ile Phe Leu Lys Tyr Ser Lys Asp Leu Val
500 505 510

Lys Thr Tyr Pro Pro Phe Val Asn Phe Phe Glu Met Ser Lys Glu Thr
515 520 525

Ile Ile Lys Cys Glu Lys Gln Lys Pro Arg Phe His Ala Phe Leu Lys
530 535 540

Ile Asn Gln Ala Lys Pro Glu Cys Gly Arg Gln Ser Leu Val Glu Leu
545 550 555 560

Leu Ile Arg Pro Val Gln Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Leu Leu Asn
565 570 575

Asp Leu Lys Lys His Thr Ala Asp Glu Asn Pro Asp Lys Ser Thr Leu
580 585 590

Glu Lys Ala Ile Gly Ser Leu Lys Glu Val Met Thr His Ile Asn Glu
595 600 605

Asp Lys Arg Lys Thr Glu Ala Gln Lys Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr
610 615 620

Glu Val Asp Gly Cys Pro Ala Asn Leu Leu Ser Ser His Arg Ser Leu
625 630 635 640

Val Gln Arg Val Glu Thr Ile Ser Leu Gly Glu His Pro Cys Asp Arg
645 650 655

Gly Glu Gln Val Thr Leu Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile Ala
660 665 670

Arg Lys Arg His Lys Val Ile Gly Thr Phe Arg Ser Pro His Gly Gln
675 680 685

Thr Arg Pro Pro Ala Ser Leu Lys His Ile His Leu Met Pro Leu Ser
690 695 700

ES 2 655 437 T3

Gln Ile Lys Lys Val Leu Asp Ile Arg Glu Thr Glu Asp Cys His Asn
705 710 715 720

Ala Phe Ala Leu Leu Val Arg Pro Pro Thr Glu Gln Ala Asn Val Leu
725 730 735

Leu Ser Phe Gln Met Thr Ser Asp Glu Leu Pro Lys Glu Asn Trp Leu
740 745 750

Lys Met Leu Cys Arg His Val Ala Asn Thr Ile Cys Lys Ala Asp Ala
755 760 765

Glu Asn Leu Ile Tyr Thr Ala Asp Pro Glu Ser Phe Glu Val Asn Thr
770 775 780

Lys Asp Met Asp Ser Thr Leu Ser Arg Ala Ser Arg Ala Ile Lys Lys
785 790 795 800

Thr Ser Lys Lys Val Thr Arg Ala Phe Ser Phe Ser Lys Thr Pro Lys
805 810 815

Arg Ala Leu Arg Arg Ala Leu Met Thr Ser His Gly Ser Val Glu Gly
820 825 830

Arg Ser Pro Ser Ser Asn Asp Lys His Val Met Ser Arg Leu Ser Ser
835 840 845

Thr Ser Ser Leu Ala Gly Ile Pro Ser Pro Ser Leu Val Ser Leu Pro
850 855 860

Ser Phe Phe Glu Arg Arg Ser His Thr Leu Ser Arg Ser Thr Thr His
865 870 875 880

Leu Ile

<210> 43

< 211> 22

< 212> ADN

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> Secuencia artificial

<400> 43

gtctaccagg cattcgcttc at 22

10 <210> 44

< 211> 24

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Secuencia artificial

5 <400> 44

tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 45

< 211> 21

< 212> ADN

10 < 213> Artificial

<220>

< 223> Secuencia artificial

<400> 45

tcagaaatcc ttctcttga c 21

15 <210> 46

< 211> 24

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

20 < 223> Secuencia artificial

<400> 46

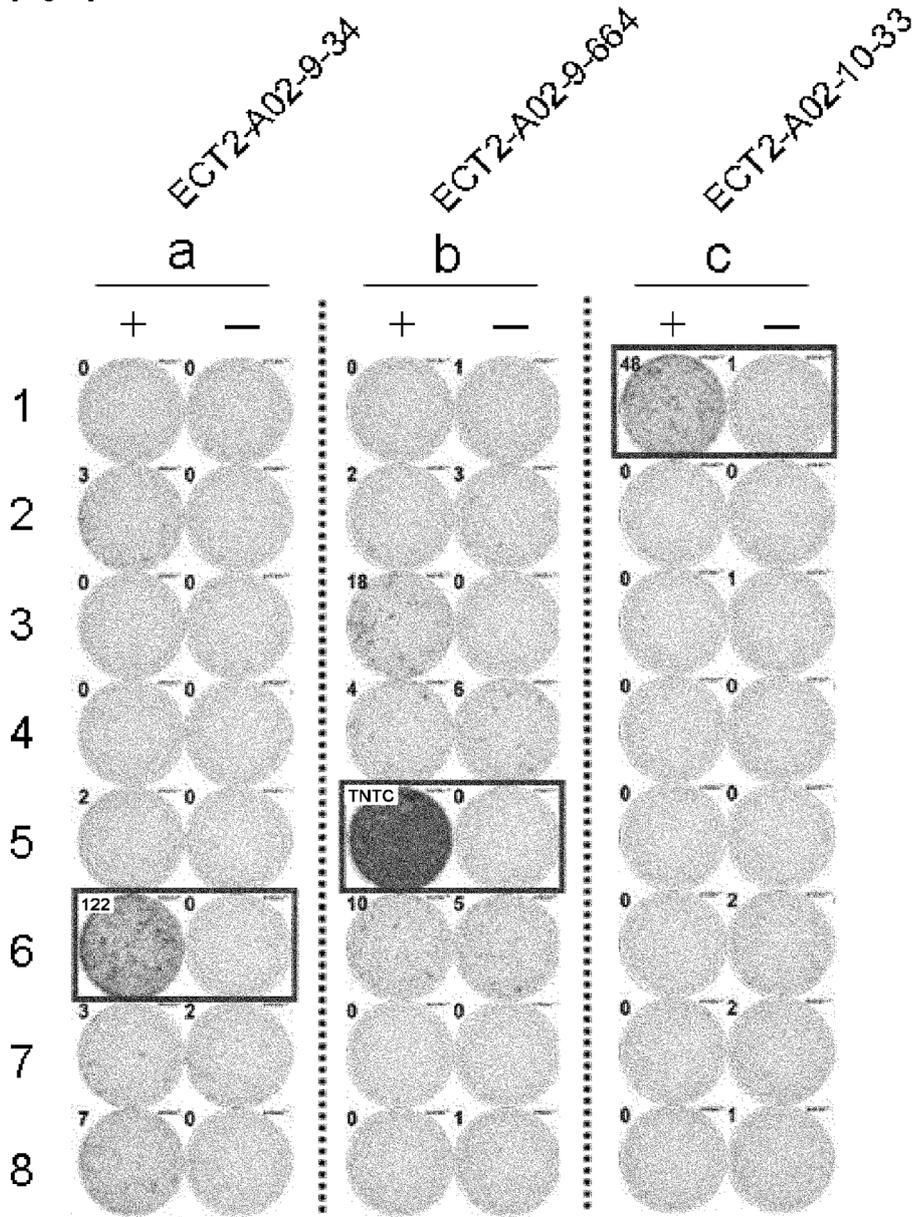
ctagcctctg gaatccttc tctt 24

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) un péptido aislado, que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 3 y 21, y
 - 5 (b) un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 3 y 21, en el que 1 o 2 aminoácidos están sustituidos o añadidos, con la condición de que dicho péptido modificado retenga la inducibilidad hacia CTL del péptido original.
2. El péptido aislado según la reivindicación 1, en donde el péptido tiene una o ambas de las siguientes características:
 - 10 (a) el segundo aminoácido desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 3 o 21 está sustituido por un aminoácido de metionina; y
 - (b) el aminoácido C-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 3 o 21 está sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina o leucina.
- 15 3. El péptido aislado según la reivindicación 1, en donde el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 3 y 21.
4. Un polinucleótido aislado que codifica el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una composición para inducir un CTL, en donde la composición comprende uno o más péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o uno o más polinucleótidos según la reivindicación 4.
- 20 6. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento y/o la profilaxis y/o la prevención de la recaída posoperatoria del cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende uno o más péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o uno o más polinucleótidos según la reivindicación 4.
- 25 7. La composición farmacéutica según la reivindicación 6, en donde dicha composición farmacéutica se formula para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2.
- 30 8. La composición farmacéutica según la reivindicación 6 o 7, en donde dicha composición farmacéutica se formula para el tratamiento del cáncer.
9. Un método para inducir una célula que presenta antígeno (APC) con inducibilidad hacia CTL, comprendiendo el método una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) poner en contacto una APC con un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 in vitro o ex vivo, y
 - 35 (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una APC in vitro.
10. Un método in vitro para inducir un CTL, comprendiendo el método una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) cocultivar células T positivas a CD8 con APCs que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
 - (b) cocultivar células T positivas a CD8 con exosomas que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
 - (c) introducir un gen que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de una subunidad del receptor de células T (TCR) que se une al péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una célula T.
- 45 11. Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

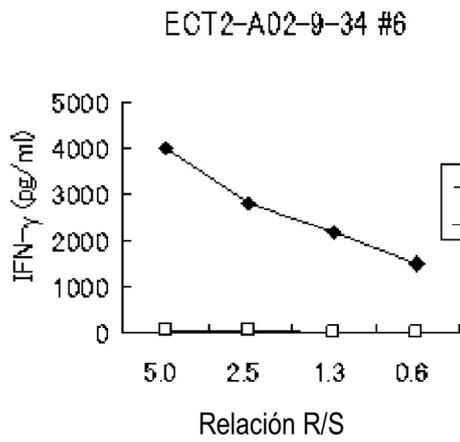
12. La APC según la reivindicación 11, que es inducida por el método según la reivindicación 9.
13. Un CTL aislado que se dirige al péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 5 14. El CTL según la reivindicación 13, que es inducido por el método según la reivindicación 10.
15. Una composición que comprende el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un polinucleótido que codifica el péptido para el uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto que lo necesite.
- 10 16. Un anticuerpo que es específico para el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
17. Un vector que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 18. Un estuche de diagnóstico que comprende el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el polinucleótido según la reivindicación 4 o el anticuerpo según la reivindicación 16.

[Fig. 1]

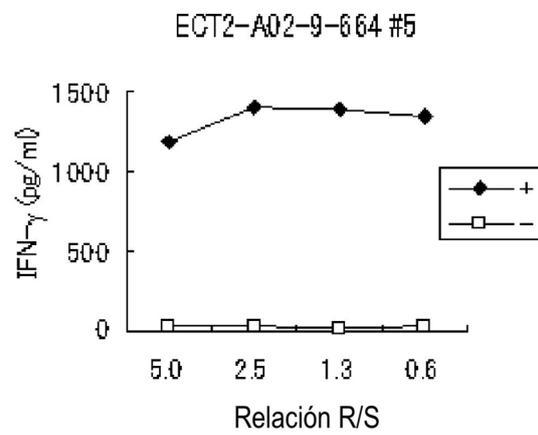


[Fig. 2]

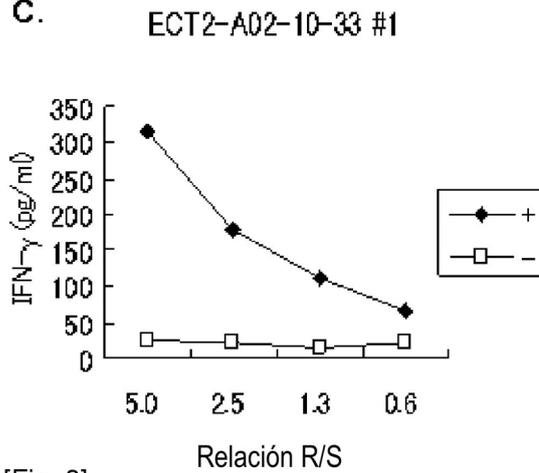
a.



b.

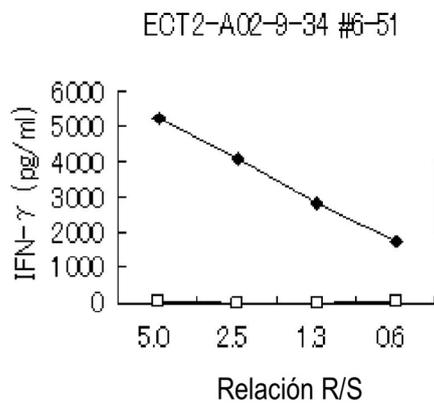


c.

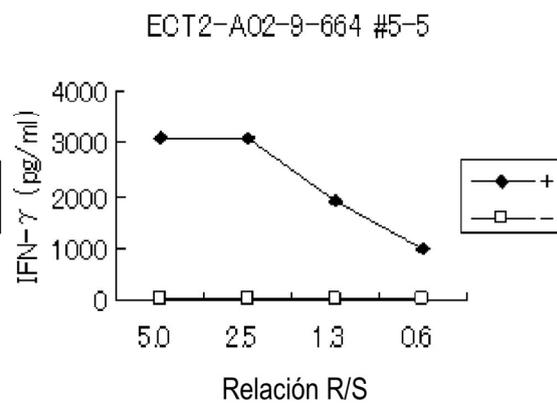


[Fig. 3]

a.



b.



[Fig. 4]

