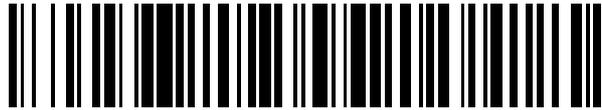


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 842**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2009 PCT/JP2009/002771**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2009 WO09153992**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2009 E 09766440 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2303912**

54 Título: **Péptidos de epítotope de CDCA1 y vacunas que los contiene**

30 Prioridad:

**19.06.2008 US 74062 P**  
**28.10.2008 US 197599 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TSUNODA, TAKUYA;**  
**OHSAWA, RYUJI y**  
**YOSHIMURA, SACHIKO**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 658 842 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 epítipo de CDCA1 y vacunas que los contiene

**Campo técnico**

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N.º 61/074.062, presentada el 19 de junio de 2008, y 61/197.599 el 28 de octubre de 2008.

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

**Técnica anterior**

10 Se ha demostrado que los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8 positivos reconocen péptidos de epítipo derivados de los antígenos asociados a tumor (TAA) encontrados en la molécula de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y entonces destruyen las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia del antígeno de melanoma (MAGE) como primer ejemplo de TAA, muchos otros TAA han sido descubiertos, principalmente mediante enfoques inmunológicos (Boon T, *Int J Cancer* 1993 May 8, 54(2): 177-80; Boon T & van der Bruggen P, *J Exp Med* 1996 Mar 1, 183(3): 725-9). Algunos de estos TAA están actualmente experimentando desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas.

20 La identificación de nuevos TAA capaces de inducir respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas garantiza el desarrollo adicional y la aplicación clínica de las estrategias de vacunación con péptidos para diversos tipos de cáncer (Harris CC, *J Natl Cancer Inst* 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55; Butterfield LH et al., *Cancer Res* 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; Vissers JL et al., *Cancer Res* 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; van der Burg SH et al., *J Immunol* 1996 May 1, 156(9): 3308-14; Tanaka F et al., *Cancer Res* 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; Fujie T et al., *Int J Cancer* 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; Kikuchi M et al., *Int J Cancer* 1999 May 5, 81(3): 459-66; Oiso M et al., *Int J Cancer* 1999 May 5, 81(3): 387-94). Hasta la fecha, ha habido varios informes de ensayos clínicos usando estos péptidos derivados de antígenos asociados a tumor. Desafortunadamente, solo se ha observado una baja tasa de respuesta objetivo en estos ensayos de vacunas para el cáncer hasta la fecha (Belli F et al., *J Clin Oncol* 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; Coulie PG et al., *Immunol Rev* 2002 Oct, 188: 33-42; Rosenberg SA et al., *Nat Med* 2004 Sep, 10(9): 909-15).

30 TAA que son indispensables para la proliferación y supervivencia de células cancerosas son valiosos como dianas para inmunoterapia, debido a que el uso de tales TAA puede garantizar el riesgo bien descrito de escape inmunitario de células cancerosas atribuible a delección, mutación, o regulación por disminución de TAA como consecuencia de selección inmunitaria terapéuticamente accionada.

35 CDCA1, 1 asociado al ciclo de división celular, se identificó como un miembro de una clase de genes que son coexpresados con genes del ciclo celular, tales como CDC2, ciclina, topoisomerasa II y otros (Walker et al., *Curr Cancer Drug Targets* 2001 May;1(1):73-83). Se encontró en particular que CDCA1 se asociaba a centrómeros de células HeLa mitóticas y, por tanto, se consideró un homólogo funcional de levadura Nuf2 (*J Cell Biol* 2001 Jan 22; 152(2):349-60).

Péptidos derivados de CDCA1 se desvelan en Harao, Michiko: Cell division cycle associated 1, an ideal lung cancer antigen for immunotherapy, identified using cDNA microarray analysis; Tesis doctoral; Escuela Superior de Ciencias Médicas, Universidad de Kumamoto, Kumamoto Japón, marzo de 2008.

40 Además, mediante el análisis de perfiles de expresión génica usando una micromatriz de ADNc de genoma completo que contiene 23.040 genes (*Cancer Res* 2006 Nov 1; 66(21):10339-48), CDCA1 también se ha identificado como una novedosa molécula regulada por incremento en cáncer de mama (documento WO2005/028676), cáncer de vejiga (documento WO2006/085684), cáncer de esófago (documento WO2007/013671), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) (documento WO2007/013665) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (documento WO2005/089735).

La expresión de CDCA1 estuvo particularmente regulada por incremento en SCLC, NSCLC y líneas de células tumorales, aunque no se detectó expresión excepto en testículo entre 23 tejidos normales. Además, la regulación por disminución de la expresión de CDCA1 por ARNip causó la supresión del crecimiento celular en CDCA1 que expresa líneas celulares de cáncer de pulmón (documento WO2005/089735).

50 Por consiguiente, pueden aplicarse péptidos de epítipo derivados de CDCA1 como inmunoterapéuticos para el cáncer para el tratamiento de una amplia matriz de cánceres.

**Sumario de la invención**

La invención se refiere a las realizaciones como se definen en las reivindicaciones.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de péptidos de epítipo adecuados que pueden servir como dianas de inmunoterapia. Reconociendo que CDCA1 están regulados por incremento en varios tipos de cáncer, que incluye cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de esófago, la presente invención elige como diana este 1 asociado al ciclo de división celular (CDCA1) (SEQ ID NO: 35 codificado por el gen de N° de acceso de GenBank NM\_145697 (SEQ ID NO: 34)) para análisis adicionales. En particular, se seleccionaron productos del gen CDCA1 que contienen péptidos de epítipo que provocan CTL específicos para las moléculas correspondientes. Se estimularon células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de un donante sano usando candidatos a péptidos de unión a HLA-A\*2402 derivados de CDCA1. Se establecieron CTL que reconocen específicamente células diana HLA-A24 positivas pulsadas con los candidatos a péptidos respectivos, y se identificaron péptidos de epítipo restringidos a HLA-A24 que pueden inducir respuestas inmunitarias potentes y específicas contra CDCA1. Estos resultados demuestran que CDCA1 es fuertemente inmunogénico y los epítopes del mismo son dianas eficaces para la inmunoterapia de tumores.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar péptidos que tienen inducibilidad de CTL, además de consistir en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 3,4, 11, 14, 22 y 23. La presente divulgación contempla péptidos modificados, que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4, 11, 14, 22 o 23, en la que uno, dos o más aminoácidos están sustituidos, incorporados, deletados o añadidos, mientras que los péptidos modificados retienen la inducibilidad de CTL original.

Además, la presente invención contempla péptidos modificados que consisten en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, 3, 4, 11, 14 o 22, en la que el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y/o en la que el extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina.

Cuando se administran a un sujeto, los presentes péptidos se presentan sobre la superficie de células presentadoras de antígenos o exosomas y entonces inducen CTL que se dirigen a los péptidos respectivos. Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar células presentadoras de antígenos y exosomas que presenten cualquiera de los presentes péptidos de la invención, además de métodos de inducción de células presentadoras de antígenos.

Se induce una respuesta inmunitaria antitumoral por la administración de los presentes polipéptidos CDCA1 o polinucleótido que codifica los polipéptidos, además de exosomas y células presentadoras de antígenos que presentan los polipéptidos CDCA1. Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes farmacéuticos que contengan los polipéptidos de la presente invención o polinucleótidos que los codifican, además de los exosomas y células presentadoras de antígenos que contienen tales como sus principios activos. Los agentes farmacéuticos de la presente invención encuentran utilidad particular como vacunas.

Es un objeto adicional de la presente divulgación proporcionar métodos para el tratamiento y/o la profilaxis (es decir, prevención) de cánceres (tumores), y/o prevención de la reaparición posoperatoria de los mismos, además de métodos de inducción de CTL, métodos de inducción de inmunidad antitumoral, métodos que incluyen la etapa de administrar los polipéptidos CDCA1, polinucleótidos que codifican los polipéptidos CDCA1, exosomas o las células presentadoras de antígenos que presentan los polipéptidos CDCA1 o los agentes farmacéuticos de la invención.

Además, es un objeto de la presente invención proporcionar un agente farmacéutico que comprenda un principio activo seleccionado del grupo que consiste en: al menos un péptido de la invención, al menos un polinucleótido de la invención, una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma de la invención, y combinaciones de los mismos en combinación con un vehículo farmacológicamente aceptable formulado para un fin seleccionado del grupo que consiste en: tratamiento de un cáncer; profilaxis de un cáncer; prevención de la reaparición posoperatoria de un cáncer; y combinaciones de los mismos. Además, la invención proporciona métodos *in vitro* de inducción de una célula presentadora de antígenos con alta inducibilidad de CTL usando un péptido de la invención y/o un polinucleótido de la invención. Además, la invención proporciona métodos *in vitro* de inducción de CTL usando un péptido de la invención, un polinucleótido de la invención, una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma que presenta un péptido de la invención sobre su superficie, un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad de receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce un complejo de un péptido de la invención y un antígeno HLA, o combinaciones de los mismos.

Además, los CTL de la invención también encuentran uso como vacunas contra el cáncer. Ejemplos de cánceres contemplados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

Además de lo anterior, otros objetos y características de la invención serán más completamente evidentes cuando la siguiente descripción detallada se lea conjuntamente con las figuras y ejemplos adjuntos. Sin embargo, debe entenderse que tanto el anterior sumario de la invención como la siguiente descripción detallada son de realizaciones ejemplificadas, y no restrictivas de la invención u otras realizaciones alternativas de la invención. En particular, aunque la invención se describe en el presente documento con referencia a varias realizaciones específicas, se apreciará que la descripción es ilustrativa de la invención y no se interpreta como limitante de la invención. Pueden ocurrírsele diversas modificaciones y aplicaciones a aquellos expertos en la materia.

Asimismo, otros objetos, características, beneficios y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de sumario y ciertas realizaciones descritas a continuación, y serán rápidamente evidentes para aquellos expertos en la materia. Tales objetos, características, beneficios y ventajas serán evidentes a partir de lo anterior conjuntamente con los ejemplos adjuntos, datos, figuras y todas las inferencias razonables que van a sacarse de la misma, solos o con consideración de las referencias.

### Breve descripción de los dibujos

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

[fig. 1] La Figura 1 está compuesta por una serie de fotografías, (a) a (g), que representan los resultados de un ensayo ELISPOT de IFN-gamma en CTL que se indujeron con péptidos derivados de CDCA1. Los CTL en los números de pocillo N.º 8 estimulados con CDCA1-A24-10-119 (SEQ ID NO: 3) (a), N.º 1 con CDCA1-A24-10-335 (SEQ ID NO: 4) (b), N.º 1 con CDCA1-A24-10-48 (SEQ ID NO: 11) (c), N.º 4 con CDCA1-A24-10-5 (SEQ ID NO: 14) (d), N.º 2 con CDCA1-A24-9-8 (SEQ ID NO: 22) (e) y N.º 2 con CDCA1-A24-9-56 (SEQ ID NO: 23) (f) mostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. A diferencia, no se detectó producción de IFN-gamma específica contra células diana pulsadas con péptido en los CTL estimulados con CDCA1-A24-10-74 (SEQ ID NO: 2) (g). Las células en los pocillos indicados por un recuadro rectangular se expandieron para establecer líneas de CTL. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ningún péptido.

[fig. 2] La Figura 2 está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (a) a (g), que representan los resultados de un ensayo de ELISA de IFN-gamma en líneas de CTL establecidas con CDCA1-A24-10-119 (SEQ ID NO: 3) (a), CDCA1-A24-10-335 (SEQ ID NO: 4) (b), CDCA1-A24-10-48 (SEQ ID NO: 11) (c), CDCA1-A24-10-5 (SEQ ID NO: 14) (d), CDCA1-A24-9-8 (SEQ ID NO: 22) (e) y CDCA1-A24-9-56 (SEQ ID NO: 23) (f) en el ensayo de ELISA de IFN-gamma anterior. Los resultados demuestran que las líneas de CTL establecidas por estimulación con cada péptido mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. A diferencia, no se observó producción de IFN-gamma específica contra células diana pulsadas con péptido en la línea de CTL establecida con CDCA1-A24-10-74 (SEQ ID NO: 2) (g). En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ningún péptido.

[fig.3] La Figura 3 es un gráfico de líneas que representa la producción de IFN-gamma del clon de CTL establecido por dilución limitante de la línea de CTL estimulada con SEQ ID NO: 23. Los resultados demuestran que el clon de CTL establecido por estimulación con SEQ ID NO: 23 mostró potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con SEQ ID NO: 23 y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ningún péptido.

[fig.4] La Figura 4 es un gráfico de líneas que representa la actividad de CTL específica contra las células diana que expresan exógenamente CDCA1 y HLA-A\*2402. El clon de CTL establecido con CDCA1-A24-9-56 (SEQ ID NO: 23) mostró alta actividad de CTL específica contra células COS7 transfectadas con tanto CDCA1 como HLA-A\*2402 (rombo). A diferencia, no se detectó actividad de CTL específica significativa contra células diana que expresan cualquiera de HLA-A\*2402 (triángulo) o CDCA1 (círculo).

### Descripción de realizaciones

Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de las realizaciones de la presente invención, ahora se describen métodos, dispositivos y materiales preferidos. Sin embargo, antes de describir los presentes materiales y métodos, debe entenderse que la presente invención no se limita a los tamaños particulares, formas, dimensiones, materiales, metodologías, protocolos, etc., descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar según la experimentación rutinaria y optimización. También debe entenderse que la terminología usada en la descripción es con el fin de describir las versiones o realizaciones particulares solo, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que se limitará solo por las reivindicaciones adjuntas.

Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tenga derecho a anteceder tal divulgación en virtud de la invención previa.

#### I. Definiciones:

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que la presente invención pertenece. Sin embargo, en caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones.

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

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

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

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

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

A menos que se defina de otro modo, el término "cáncer" se refiere a cánceres que expresan en exceso el gen CDCA1, que incluyen, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

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

## 30 II. Péptidos

Para demostrar que los péptidos derivados de CDCA1 funcionan como un antígeno reconocido por linfocitos T citotóxicos (CTL), se analizaron péptidos derivados de CDCA1 (SEQ ID NO: 35) para determinar si eran epítopes de antígeno restringidos por HLA-A24 que son alelos HLA comúnmente encontrados (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994). Se identificaron candidatos de epítopes de unión a HLA-A24 derivados de CDCA1 basándose en sus afinidades de unión a HLA-A24. Después de la estimulación *in vitro* de linfocitos T por células dendríticas (DC) cargadas con estos péptidos, se establecieron satisfactoriamente CTL usando cada uno de los siguientes péptidos:

CDCA1-A24-10-119 (SEQ ID NO: 3),

CDCA1-A24-10-335 (SEQ ID NO: 4),

40 CDCA1-A24-10-48 (SEQ ID NO: 11),

CDCA1-A24-10-5 (SEQ ID NO: 14),

CDCA1-A24-9-8 (SEQ ID NO: 22),

y

CDCA1-A24-9-56 (SEQ ID NO: 23).

45 Estos CTL establecidos muestran potente actividad de CTL específica contra células diana pulsadas con péptidos respectivos. Estos resultados en el presente documento demuestran que CDCA1 es un antígeno reconocido por CTL y que los péptidos son péptidos de epítope de CDCA1 restringidos por HLA-A24.

Como el gen CDCA1 se expresa en exceso en la mayoría de los tejidos de cáncer, que incluyen, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), representa una buena diana para inmunoterapia. Así, la presente invención proporciona nonapéptidos (péptidos que consiste en nueve restos de aminoácidos) y decapeptidos (péptidos que consiste en diez restos de aminoácidos) correspondientes a epítopes de CDCA1 reconocidos por CTL. Ejemplos

particularmente preferidos de nonapéptidos y decaapéptidos de la presente invención incluyen aquellos péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 3, 4, 11, 14, 22 y 23.

Generalmente, pueden usarse programas de software actualmente disponibles en internet, tales como aquellos descritos en Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75, para calcular las afinidades de unión entre diversos péptidos y antígenos HLA por ordenador. La afinidad de unión con antígenos HLA puede medirse como se describe, por ejemplo, en Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75; y Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81. Los métodos de determinación de afinidad de unión se describen, por ejemplo, en Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190 y Protein Science, 2000, 9: 1838-1846. Así, la presente invención engloba péptidos de CDCA1 que se determina que se unen a antígenos HLA identificados usando tales programas conocidos.

Los nonapéptidos y decaapéptidos de la presente divulgación pueden estar opcionalmente flanqueados con restos de aminoácidos adicionales, mientras que el péptido retenga su inducibilidad de CTL. Tales péptidos que tienen la inducibilidad de CTL normalmente tienen menos de aproximadamente 40 aminoácidos, frecuentemente menos de aproximadamente 20 aminoácidos, normalmente menos de aproximadamente 15 aminoácidos. La(s) secuencia(s) de aminoácidos particular(es) que flanquea(n) los péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 3, 4, 11, 14, 22 y 23 no están limitadas y pueden estar compuestas de cualquier tipo de aminoácidos, mientras que no altere la inducibilidad de CTL del péptido original. Así, la presente invención también proporciona péptidos que tienen inducibilidad de CTL y que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 3, 4, 11, 14, 22 y 23.

En general, la modificación de uno, dos, o más aminoácidos en una proteína no influirá en la función de la proteína, y en algunos casos incluso potenciará la función deseada de la proteína original. En realidad, se sabe que péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos de una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios restos de aminoácidos se han modificado (es decir, sustituido, añadido, deletado o insertado) en comparación con una secuencia de referencia original) retienen la actividad biológica del péptido original (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13). Así, en una realización de la presente divulgación, los péptidos de la presente divulgación pueden tener tanto inducibilidad de CTL como una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 3, 4, 11, 14, 22 y 23, en la que uno, dos o incluso más aminoácidos se han añadido, insertado, deletado y/o sustituido.

Aquellos expertos en la materia reconocen que adiciones o sustituciones individuales a una secuencia de aminoácidos que alteran un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos tienden a producir la conservación de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original. Como tales, frecuentemente se denominan "sustituciones conservativas" o "modificaciones conservativas", en las que la alteración de una proteína produce una proteína modificada que tiene una función análoga a la proteína original. Tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Ejemplos de propiedades de cadenas laterales de aminoácidos son aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene grupo aromático (H, F, Y, W). Además, los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas para otros:

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

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

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

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

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

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

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

8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins 1984).

Se considera que tales péptidos conservativamente modificados también son péptidos de la presente divulgación. Sin embargo, los péptidos de la presente divulgación no están restringidos a éstos y puede incluir modificaciones no conservativas, mientras que el péptido modificado retenga la inducibilidad de CTL del péptido original. Además, los péptidos modificados no deben excluir péptidos inducibles por CTL de variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de CDCA1.

Para retener la inducibilidad de CTL requerida puede modificarse (inserción, adición, delección y/o sustitución) un pequeño número (por ejemplo, 1, 2 o varios) o un pequeño porcentaje de aminoácidos. En el presente documento, el término "varios" significa 5 o menos aminoácidos, por ejemplo, 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos que va a modificarse es preferentemente el 20 % o menos, más preferentemente el 15 % de menos, incluso más preferentemente el 10 % o menos o del 1 al 5 %.

El análisis de homología de péptidos preferidos de la presente invención, CDCA1-A24-10-119 (SEQ ID NO: 3), CDCA1-A24-10-335 (SEQ ID NO: 4), CDCA1-A24-10-48 (SEQ ID NO: 11), CDCA1-A24-10-5 (SEQ ID NO: 14), CDCA1-A24-9-8 (SEQ ID NO: 22) y CDCA1-A24-9-56 (SEQ ID NO: 23), confirmó que estos péptidos no tenían homología significativa con péptidos derivados de otros productos génicos humanos conocidos. Así, la posibilidad de que estos péptidos generaran respuestas inmunitarias desconocidas o no deseadas cuando se usaran para inmunoterapia es significativamente reducida. Por consiguiente, se espera que estos péptidos sean altamente útiles para provocar inmunidad en pacientes con cáncer contra CDCA1.

Cuando se usa en el contexto de la inmunoterapia, los péptidos de la presente invención deben presentarse sobre la superficie de una célula o exosoma, preferentemente como un complejo con un antígeno HLA. Por tanto, es preferible seleccionar péptidos que no solo induzcan CTL, sino que también posean alta afinidad de unión al antígeno HLA. Para este fin, los péptidos pueden modificarse por sustitución, inserción, delección y/o adición de los restos de aminoácidos dando un péptido modificado que tiene afinidad de unión mejorada. Además de los péptidos que son naturalmente presentados, como ya se conoce la regularidad de las secuencias de péptidos presentadas por unión a antígenos HLA (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), pueden introducirse modificaciones basadas en tal regularidad en los péptidos inmunogénicos de la invención. Por ejemplo, puede desearse sustituir el segundo aminoácido del extremo N con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y/o el aminoácido en el extremo C con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina con el fin de aumentar la afinidad de unión a HLA-A24. Así, péptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 3, 4, 11, 14, 22 y 23 en la que el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o en la que el extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, o metionina, están englobados por la presente invención. Las sustituciones pueden introducirse no solo en los aminoácidos terminales, sino también en la posición del posible reconocimiento de TCR de péptidos. Varios estudios han demostrado que las sustituciones de aminoácidos en un péptido pueden ser iguales o mejores que el original, por ejemplo CAP1, p53<sup>(264-272)</sup>, Her-2/neu<sup>(369-377)</sup> o gp100<sup>(209-217)</sup> (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb 1; 168(3): 1338-47, S. O. Dionne et al. Cancer Immunol Immunother. (2003) 52: 199-206 y S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

La presente divulgación también contempla la adición de uno a dos aminoácidos al extremo N y/o C de los péptidos descritos. También están incluidos en la presente invención tales péptidos modificados que tienen alta afinidad de unión al antígeno HLA e inducibilidad de CTL retenida.

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

Aunque se espera que los péptidos que tienen alta afinidad de unión con los antígenos HLA como se ha descrito anteriormente sean altamente eficaces, los candidatos a péptidos, que se seleccionan según la presencia de alta afinidad de unión como indicador, se examinan además para la presencia de inducibilidad de CTL. En el presente documento, la expresión "inducibilidad de CTL" indica la capacidad del péptido para inducir linfocitos T citotóxicos (CTL) cuando se presentan en células presentadoras de antígenos. Además, "inducibilidad de CTL" incluye la capacidad del péptido para inducir activación de CTL, proliferación de CTL, promover la lisis por CTL de células diana y aumentar la producción de IFN-gamma por CTL.

La confirmación de la inducibilidad de CTL se lleva a cabo induciendo células presentadoras de antígenos que llevan antígenos de MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DC)), o más específicamente DC derivadas de leucocitos de sangre periférica mononuclear humana, y después de la estimulación con los péptidos, mezclar con células CD8-positivas, y luego medir el IFN-gamma producido y liberado por los CTL contra las células diana. Como sistema de reacción, pueden usarse animales transgénicos que han sido producidos para expresar un antígeno HLA humano (por ejemplo, aquellos descritos en BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A\*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response). Por ejemplo, las células diana pueden radiomarcarse con <sup>51</sup>Cr y similares, y puede calcularse la actividad citotóxica a partir de la radiactividad liberada de las células diana. Alternativamente,

puede evaluarse la inducibilidad de CTL midiendo IFN-gamma producido y liberado por CTL en presencia de células presentadoras de antígenos (APC) que llevan inmovilizados péptidos, y visualizando la zona de inhibición en los medios usando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

5 Como resultado de examinar la inducibilidad de CTL de los péptidos como se ha descrito anteriormente, se descubrió que aquellos que tienen alta afinidad de unión con un antígeno HLA no tenían necesariamente alta inducibilidad de CTL. Sin embargo, de aquellos péptidos identificados y evaluados, se encontró que los nonapéptidos o decapeptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 3, 4, 11, 14, 22 y 23 presentaban inducibilidad de CTL particularmente alta, además de alta afinidad de unión con un antígeno HLA. Así, estos péptidos se ejemplifican como realizaciones preferidas de la presente invención.

10 Además de las modificaciones anteriormente descritas, los péptidos de la presente invención también pueden unirse a otras sustancias, mientras que el péptido unido resultante retenga la inducibilidad de CTL del péptido original. Ejemplos de sustancias adecuadas incluyen, por ejemplo: péptidos, lípidos, azúcar y cadenas de azúcar, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glucosilación, oxidación de cadena lateral, o fosforilación, etc., siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Estos tipos de modificaciones pueden realizarse para conferir funciones adicionales (por  
15 ejemplo, función de direccionamiento y función de administración) o para estabilizar el polipéptido.

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

Los péptidos de la presente invención se presentan sobre la superficie de una célula (por ejemplo, célula presentadora de antígenos) o un exosoma como complejos en combinación con antígenos HLA y entonces inducen CTL. Por tanto, los péptidos que forman complejos con antígenos HLA sobre la superficie de una célula o un  
25 exosoma también están incluidos en la presente invención. Tales exosomas pueden prepararse, por ejemplo usando los métodos detallados en las publicaciones Kohyo de solicitud de patente japonesa Hei 11-510507 y el documento WO99/03499, y pueden prepararse usando APC obtenidas de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención. Los exosomas o células que presentan los péptidos de la presente invención pueden inocularse como vacunas.

30 El tipo de antígenos HLA contenidos en los complejos anteriores debe corresponderse con el del sujeto que requiere el tratamiento y/o prevención. Por ejemplo, en la población japonesa, HLA-A24, particularmente HLA-A2402, es predominante y, por tanto, sería apropiado para el tratamiento de un paciente japonés. El uso del tipo A24 que se expresa altamente entre los japoneses y caucásicos es favorable para obtener resultados eficaces, y subtipos tales como A2402 también encuentran uso. Normalmente, en la clínica, el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere  
35 tratamiento se investiga de antemano, que permite la selección apropiada de péptidos que tienen altos niveles de afinidad de unión con el antígeno particular, o que tienen inducibilidad de CTL por la presentación de antígenos.

Si se usa el antígeno HLA de tipo A24 para el exosoma o célula, los péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 3, 4, 11, 14, 22 y 23 se usan preferentemente.

40 En el presente documento, los péptidos de la presente invención también pueden describirse como "péptido(s) de CDCA1" o "polipéptido(s) de CDCA1".

### III. Preparación de péptidos de CDCA1

Los péptidos de la invención pueden prepararse usando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, los péptidos pueden prepararse sintéticamente, usando tecnología de ADN recombinante o síntesis química. El péptido de la invención  
45 puede sintetizarse individualmente o como polipéptidos más largos compuestos de dos o más péptidos. Los péptidos pueden entonces aislarse, es decir, purificarse, de manera que estén sustancialmente libres de otras proteínas de célula hospedadoras que existen de forma natural y fragmentos de las mismas, o cualquier otra sustancia química.

Un péptido de la presente invención puede obtenerse mediante síntesis química basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Ejemplos de métodos de síntesis de péptidos convencionales que pueden adaptarse para la síntesis incluyen:

- 50 (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;
- (iii) Peptide Synthesis (en japonés), Maruzen Co., 1975;
- (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (en japonés), Maruzen Co., 1985;

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

(vi) WO99/67288; y

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

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

#### IV. Polinucleótidos

15 La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica cualquiera de los péptidos anteriormente mencionados de la presente invención. Éstos incluyen polinucleótidos derivados del gen CDCA1 que se produce de forma natural (Nº de acceso de GenBank NM\_145697 (SEQ ID NO: 34)), además de aquellos que tienen una secuencia de nucleótidos conservativamente modificada del mismo. En el presente documento, la expresión "secuencia de nucleótidos conservativamente modificada" 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 cualquier posición donde una alanina se especifique por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones conservativamente modificadas. Cada secuencia de ácidos nucleicos en el presente documento que codifica un péptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto habitual reconocerá que puede modificarse cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es generalmente el único codón para metionina, y TGG, que es generalmente el único codón para triptófano) para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un péptido está implícitamente descrita en cada secuencia desvelada.

20 El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto de ADN, ARN, y derivados de los mismos. Un ADN está adecuadamente compuesto de bases tales como A, T, C, y G, y T está sustituida por U en un ARN.

25 El polinucleótido de la presente invención puede codificar múltiples péptidos de la presente invención con o sin secuencias de aminoácidos intermedias entre ellos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos intermedia puede proporcionar un sitio de escisión (por ejemplo, secuencia de reconocimiento de enzimas) del polinucleótido o los péptidos traducidos. Además, el polinucleótido puede incluir cualquier secuencia adicional 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, tales polinucleótidos recombinantes pueden prepararse por la manipulación de polinucleótidos mediante técnicas recombinantes convencionales usando, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

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

#### V. Células presentadoras de antígenos (APC)

35 La presente invención también proporciona células presentadoras de antígenos (APC) que presentan complejos formados entre antígenos HLA y los péptidos de la presente invención sobre su superficie. Las APC que se obtienen poniendo en contacto los péptidos de la presente invención, o introduciendo los nucleótidos que codifican los péptidos de la presente invención, en una forma expresable pueden derivar de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención, y pueden administrarse como vacunas en sí mismas o en combinación con otros fármacos que incluyen los péptidos de la presente invención, exosomas, o linfocitos T citotóxicos.

55 Las APC no se limitan a un tipo de células particular e incluyen células dendríticas (DC), células de Langerhans, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T activados, que son conocidos por presentar antígenos proteínicos sobre su

superficie celular de manera que sean reconocidos por linfocitos. Como la DC es una APC representativa que tiene la acción inductora de CTL más fuerte de entre las APC, las DC encuentran uso como APC de la presente invención.

Por ejemplo, puede obtenerse una APC induciendo DC de monocitos de sangre periférica y entonces poniéndolas en contacto (estimulándolas) con los péptidos de la presente invención *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Cuando los péptidos de la presente invención se administran a los sujetos, las APC que presentan los péptidos de la presente invención se inducen en el cuerpo del sujeto. La expresión "inducir APC" incluye poner en contacto (estimular) una célula con los péptidos de la presente invención, o nucleótidos que codifican los péptidos de la presente invención para presentar complejos formados entre antígenos HLA y los péptidos de la presente invención sobre la superficie de la célula. Alternativamente, después de introducir los péptidos de la presente invención a las APC para permitir que las APC se presenten a los péptidos, las APC pueden administrarse al sujeto como una vacuna. Por ejemplo, la administración *ex vivo* puede incluir las etapas de:

a: recoger APC de un primer sujeto;

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

c: administrar las APC cargadas de péptido a un segundo sujeto.

El primer sujeto y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo, o pueden ser individuos diferentes. Alternativamente, según la presente invención, se proporciona el uso de los péptidos de la presente invención para la fabricación de una composición farmacéutica que induce células presentadoras de antígenos. Además, la presente invención proporciona un método o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica que induce células presentadoras de antígenos, en el que el método comprende la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención también proporciona los péptidos de la presente invención para inducir células presentadoras de antígenos. Las APC obtenidas por la etapa (b) pueden administrarse al sujeto como una vacuna.

Según un aspecto de la presente invención, las APC tienen un alto nivel de inducibilidad de CTL. En el término de "alto nivel de inducibilidad de CTL", el alto nivel es con respecto al nivel de aquellas APC que se ponen en contacto con ningún péptido o péptidos que no pueden inducir los CTL. Tales APC que tienen un alto nivel de inducibilidad de CTL pueden ser preparados por un método que incluye la etapa de transferir genes que contienen polinucleótidos que codifican los péptidos de la presente invención a APC *in vitro*. Los genes introducidos pueden estar en forma de ADN o ARN. Ejemplos de métodos de introducción incluyen, sin limitaciones particulares, diversos métodos convencionalmente realizados en este campo, tales como lipofección, electroporación y puede usarse el método de fosfato de calcio. Más específicamente, puede realizarse como se describe en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; traducción japonesa publicada de la publicación internacional N.º 2000-509281. Transfiriendo el gen en APC, el gen experimenta transcripción, traducción, etc., en la célula, y entonces la proteína obtenida se procesa por clase I o clase II de MHC, y avanza a través de una vía de presentación a los presentes péptidos.

#### VI. Linfocitos T citotóxicos

Un linfocito T citotóxico inducido contra cualquiera de los péptidos de la presente invención fortalece la respuesta inmunitaria que se dirige a las células cancerosas *in vivo* y así puede usarse como vacunas, de un modo similar a los péptidos en sí. Así, la presente invención también proporciona linfocitos T citotóxicos aislados que son específicamente inducidos o activados por cualquiera de los presentes péptidos.

Tales linfocitos T citotóxicos pueden obtenerse (1) administrando los péptidos de la presente invención a un sujeto, recogiendo los linfocitos T citotóxicos del sujeto o (2) poniendo en contacto (estimulando) las APC derivadas del sujeto y células CD8-positivas, o leucocitos de sangre periférica mononuclear *in vitro* con los péptidos de la presente invención y entonces aislando los linfocitos T citotóxicos.

Los linfocitos T citotóxicos, que han sido inducidos por la estimulación con APC que presentan los péptidos de la presente invención, pueden derivar de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención, y pueden administrarse por sí mismos o en combinación con otros fármacos que incluyen los péptidos de la presente invención o exosomas con el fin de regular efectos. Los linfocitos T citotóxicos 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 CDCA1, o células que se transfectan con el gen CDCA1; y células que presentan un péptido de la presente invención sobre la superficie celular debido a la estimulación por el péptido también pueden servir de dianas de ataque de CTL activados.

#### VII. Receptor de linfocitos T (TCR)

La presente invención también proporciona una composición que contiene ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de linfocitos T (TCR), y métodos de uso de la misma. Las subunidades de TCR tienen la capacidad de formar TCR que confieren especificidad a los linfocitos T contra células tumorales que presentan CDCA1. Usando los métodos conocidos en la materia, pueden identificarse

los ácidos nucleicos de cadenas alfa y beta como subunidades de TCR de los CTL inducidos con uno o más péptidos de la presente invención (documento WO2007/032255 y Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Los TCR de derivado pueden unirse a células diana que presentan el péptido de CDCA1 con alta avididad, y opcionalmente median en la eficiente destrucción de células diana que presentan el péptido de CDCA1 *in vivo* e *in vitro*.

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

Por tanto, la presente invención proporciona CTL que se preparan por transducción con los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de subunidades de TCR que se unen al péptido de CDCA1, por ejemplo SEQ ID NO: 3, 4, 11, 14, 22 y 23 en el contexto de HLA-A24. Los CTL transducidos son capaces de recircular células cancerosas *in vivo*, y puede ser expandidos por métodos de cultivo muy conocidos *in vitro* (por ejemplo, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Los linfocitos T de la invención pueden usarse para formar una composición inmunogénica útil en el tratamiento o la prevención de cáncer en un paciente en necesidad de terapia o protección (documento WO2006/031221).

La prevención y profilaxis incluyen cualquier actividad que reduce la carga de mortalidad o morbilidad de enfermedad. Puede producirse prevención y profilaxis "a niveles de prevención primaria, secundaria y terciaria". Mientras que la prevención y profilaxis primaria evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles secundarios y terciarios de prevención y profilaxis engloban actividades que pretenden la prevención y profilaxis de la progresión de una enfermedad y la emergencia de síntomas, además de reducir el impacto negativo de una enfermedad ya establecida restaurando la función y reduciendo las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente, la prevención y profilaxis incluyen una amplia gama de terapias profilácticas que pretenden aliviar la gravedad del trastorno particular, por ejemplo reducir la proliferación y metástasis de tumores, reducir la angiogénesis.

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

#### VIII. Agentes farmacéuticos o composiciones

Desde que la expresión de CDCA1 está específicamente elevada en varios tipos de cáncer, que incluyen cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en comparación con tejido normal (Cancer Res 2006 Nov 1; 66(21):10339-48, documentos WO2005/028676, WO2005/089735, WO2006/085684, WO2007/013665, WO2007/013671), los péptidos de la presente invención o polinucleótidos que codifican los péptidos pueden usarse para el tratamiento y/o la profilaxis de cáncer o tumor, y/o para la prevención de la reaparición posoperatoria del mismo. Así, la presente invención proporciona un agente farmacéutico o una composición para tratar y/o para la profilaxis de cáncer o tumor, y/o prevención de la reaparición posoperatoria del mismo, que comprende uno o más de los péptidos de la presente invención, o polinucleótidos que codifican los péptidos como principio activo. Alternativamente, los presentes péptidos pueden expresarse sobre la superficie de cualquiera de los exosomas o células existentes, tales como APC para el uso como agentes farmacéuticos o composiciones. Además, los linfocitos T citotóxicos anteriormente mencionados que se dirigen a cualquiera de los péptidos de la invención también pueden usarse como principio activo de los presentes agentes farmacéuticos o composiciones.

En otra realización, la presente invención también proporciona el uso de un principio activo seleccionado de entre:

- (a) un péptido de la presente invención,
- (b) un ácido nucleico que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable,
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie, y
- (d) un linfocito T citotóxico de la presente invención

en la fabricación de una composición farmacéutica o agente para tratar cáncer o tumor.

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

- (a) un péptido de la presente invención,
- (b) un ácido nucleico que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable,
- 5 (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie, y
- (d) un linfocito T citotóxico de la presente invención

para su uso para tratar cáncer o tumor.

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

- (a) un péptido de la presente invención,
- (b) un ácido nucleico que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable,
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie, y
- 15 (d) un linfocito T citotóxico de la presente invención

como principios activos.

20 En otra realización, la presente invención también proporciona un método o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica o agente para tratar cáncer o tumor, en el que el método o proceso incluye la etapa de mezclar un principio activo con un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, en el que el principio activo está seleccionado de entre:

- (a) un péptido de la presente invención,
- (b) un ácido nucleico que codifica un péptido tal como se desvela en el presente documento en una forma expresable,
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie, y
- 25 (d) un linfocito T citotóxico de la presente invención.

Alternativamente, la composición farmacéutica o agente de la presente invención puede usarse para cualquiera o ambos de la profilaxis de cáncer o tumor y la prevención de la reaparición posoperatoria del mismo.

30 Los presentes agentes farmacéuticos o composiciones encuentran uso como vacuna. En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" (también denominado una composición inmunogénica) se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad antitumoral tras la inoculación en animales.

35 Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar y/o prevenir cánceres o tumores, y/o la prevención de la reaparición posoperatoria de los mismos en sujetos o pacientes que incluyen al ser humano y cualquier otro mamífero que incluye, pero no se limita a, ratón, rata, cobaya, conejo, gato, perro, oveja, cabra, cerdo, ganado vacuno, caballo, mono, babuino y chimpancé, particularmente un animal comercialmente importante o un animal domesticado.

40 Según la presente invención, se ha encontrado que los polipéptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 3, 4, 11, 14, 22 y 23 son péptidos de epítipo restringidos por HLA-A24 o candidatos que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica. Por tanto, los presentes agentes farmacéuticos que incluyen cualquiera de estos polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4, 11, 14, 22 y 23 son particularmente aptos para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A24. Lo mismo se aplica a agentes farmacéuticos o composiciones que contienen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos polipéptidos.

45 Los cánceres o tumores que van a ser tratados por los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención no están limitados e incluyen todos los tipos de cánceres o tumores en los que participa CDCA1, que incluyen, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

Los presentes agentes farmacéuticos o composiciones pueden contener además de los principios activos anteriormente mencionados, otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTL contra células cancerosas, otros

polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, o similares. En el presente documento, los otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTL contra células cancerosas se ejemplifican por antígenos específicos del cáncer (por ejemplo, TAA identificados), pero no se limitan a éstos

5 Si se necesita, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como principio activo, siempre que las sustancias no inhiban el efecto antitumoral del principio, por ejemplo, cualquiera de los presentes péptidos. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir agentes antiinflamatorios, analgésicos, quimioterapéuticos y similares. Además de incluir otras sustancias terapéuticas en el propio medicamento, los medicamentos de la presente invención también pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente con uno o varios de los otros agentes farmacológicos. Las cantidades de medicamento y agente farmacológico dependen, por ejemplo, de qué tipo de agente(s) farmacológico(s) se use, la enfermedad que esté tratándose, y los programas y vías de administración.

Debe entenderse que, además de los componentes particularmente mencionados en el presente documento, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica que tienen en cuenta el tipo de formulación en cuestión.

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

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

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

30 (1) Agentes farmacéuticos o composiciones que contienen los péptidos como principio activo

El péptido de la presente invención puede administrarse directamente como un agente farmacéutico o composición, o si fuera necesario, que haya sido formulado mediante métodos de formulación convencionales. En el último caso, además de los péptidos de la presente invención, pueden incluirse según convenga vehículos, excipientes, y similares que son generalmente usados para fármacos, sin limitaciones particulares. Ejemplos de tales vehículos son agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón fosfato, líquido de cultivo y similares. Además, los agentes farmacéuticos o composiciones pueden contener, según sea necesario, estabilizadores, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares. Los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden usarse para fines contra el cáncer.

Los péptidos de la presente invención pueden prepararse en una combinación, compuesta de dos o más péptidos de la presente invención para inducir CTL *in vivo*. La combinación de péptidos puede tomar la forma de una mezcla o puede conjugarse entre sí usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los péptidos pueden unirse químicamente o expresarse como una secuencia de polipéptidos de fusión simple. Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes.

Al administrar los péptidos de la presente invención, los péptidos son presentados a alta densidad por los antígenos HLA en las APC, entonces se inducen los CTL que reaccionan específicamente hacia el complejo formado entre el péptido presentado y el antígeno HLA. Alternativamente, pueden administrarse APC que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención sobre su superficie celular, que pueden ser obtenidos estimulando APC (por ejemplo, DC) derivadas de un sujeto con los polipéptidos de la presente invención, al sujeto, y como resultado, los CTL son inducidos en el sujeto y puede aumentarse la agresividad hacia las células de cáncer.

Los agentes farmacéuticos o composiciones para el tratamiento y/o la prevención de cáncer o tumor, que incluyen un péptido de la presente invención como principio activo, también pueden incluir un adyuvante para establecer establemente la inmunidad celular. Alternativamente, los agentes farmacéuticos o composiciones pueden administrarse con otros principios activos o puede administrarse por la formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a un compuesto que potencia la respuesta inmunitaria contra la proteína cuando se administran juntas (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Adyuvantes contemplados en el presente documento incluyen aquellos descritos en la bibliografía (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina del cólera, toxina de salmonella, y similares.

Además, pueden usarse convenientemente formulaciones de liposoma, formulaciones granulares en las que el péptido está unido a perlas de pocos micrómetros de diámetro, y formulaciones en las que un lípido se une al péptido.

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

15 El método de administración puede ser oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, o similares, y administración sistémica o administración local en los alrededores de los sitios dirigidos. La administración puede realizarse mediante administración simple o reforzarse por múltiples administraciones. La dosis de péptidos de la presente invención puede ajustarse apropiadamente según la enfermedad que va a tratarse, edad del paciente, peso, método de administración y similares, y generalmente es 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 10 mg, y puede administrarse una vez en unos cuantos días hasta unos cuantos meses. Un experto en la materia puede seleccionar apropiadamente una dosis adecuada.

(2) Agentes farmacéuticos o composiciones que contienen polinucleótidos como principio activo

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

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

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

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

55 El método de administración puede ser oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, o similares, y administración sistémica o administración local en los alrededores de los sitios dirigidos. La administración puede realizarse por administración simple o reforzarse mediante múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el vehículo adecuado o las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de la presente

invención pueden ajustarse apropiadamente según la enfermedad que va a tratarse, edad del paciente, peso, método de administración y similares, y generalmente es 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 10 mg, y puede administrarse una vez cada unos cuantos días, hasta una vez cada unos cuantos meses. Un experto en la materia puede seleccionar apropiadamente la dosis adecuada.

#### 5 IX. Métodos que usan los péptidos, exosomas, APC y CTL

Los péptidos de la presente invención y polinucleótidos que codifican tales péptidos pueden usarse para inducir APC y CTL. Los exosomas y APC de la presente invención también pueden usarse para inducir CTL. Los péptidos, polinucleótidos, exosomas y APC pueden usarse en combinación con cualquier otro compuesto, mientras que los compuestos no inhiban su inducibilidad de CTL. Así, cualquiera de los agentes farmacéuticos anteriormente mencionados o composiciones de la presente invención puede usarse para inducir CTL, y además, de esos, aquellos que incluyen los péptidos y polinucleótidos también pueden usarse para inducir APC como se trata más adelante.

##### (1) Método de inducción de células presentadoras de antígenos (APC)

15 La presente invención proporciona métodos de inducción de APC usando los péptidos de la presente invención o polinucleótidos que codifican los péptidos. La inducción de APC puede realizarse como se ha descrito anteriormente en sección "VI. Células presentadoras de antígenos". La presente invención también proporciona un método de inducción de APC que tienen un alto nivel de inducibilidad de CTL, cuya inducción también ha sido mencionada en el punto de "VI. Células presentadoras de antígenos", arriba.

##### (2) Método de inducción de CTL

20 Además, la presente invención proporciona métodos de inducción de CTL usando los péptidos de la presente invención, polinucleótidos que codifica los péptidos, exosomas o APC que presentan los péptidos. La presente invención también proporciona métodos de inducción de CTL usando un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad de receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce un complejo de los péptidos de la presente invención y antígenos HLA. Preferentemente, los métodos de inducción de CTL comprenden al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

a: poner en contacto un linfocito T CD8-positivo con una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención, y

30 b: introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad de TCR que reconoce un complejo del péptido de la presente invención y un antígeno HLA en un linfocito T CD8-positivo.

35 Cuando los péptidos de la presente invención se administran a un sujeto, los CTL se inducen en el cuerpo del sujeto, y se potencia la intensidad de la respuesta inmunitaria que se dirige a las células cancerosas. Alternativamente, los péptidos y polinucleótidos que codifican los péptidos pueden usarse para un método terapéutico *ex vivo*, en el que APC derivadas de sujeto y células CD8-positivas, o leucocitos de sangre periférica mononuclear, se ponen en contacto (estimulan) con los péptidos de la presente invención *in vitro*, y después de inducir CTL, las células CTL activadas se devuelven al sujeto. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

a: recoger APC del sujeto,;

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

c: mezclar las APC de la etapa b con linfocitos T CD<sup>8+</sup>, y co-cultivar para inducir CTL; y

40 d: recoger linfocitos T CD<sup>8+</sup> del co-cultivo de la etapa c.

45 Alternativamente, según la presente invención, se proporciona el uso de los péptidos de la presente invención para la fabricación de un agente farmacéutico o composición que induce CTL. Además, la presente invención proporciona un método o proceso para la fabricación de un agente farmacéutico o composición que induce CTL, en el que el método comprende la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención también proporciona el péptido de la presente invención para inducir CTL.

50 Los linfocitos T CD<sup>8+</sup> que tienen actividad citotóxica obtenida por la etapa d pueden administrarse al sujeto como una vacuna. Las APC que van a mezclarse con los linfocitos T CD<sup>8+</sup> en la etapa c anterior también pueden prepararse transfiriendo genes que codifican los presentes péptidos en las APC como se detalló anteriormente en la sección "VI. Células presentadoras de antígenos"; pero no se limita a esto. Por consiguiente, cualquier APC o exosoma que presente eficazmente los presentes péptidos a los linfocitos T puede usarse para el presente método.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar a un experto en la preparación y uso de la misma. Los ejemplos no están previstos de ningún modo para limitar de otro modo el alcance de la invención.

## Ejemplos

### 5 Materiales y métodos

#### Líneas celulares

Se establecieron células de la línea celular linfoblastoide A24 (A24LCL) por transformación con el virus de Epstein-Barr en linfocito B humano HLA-A24 positivo.

#### Selección de candidatos de péptidos derivados de CDCA1

- 10 Se predijeron péptidos 9-meros y 10-meros derivados de CDCA1 que se unen a HLA-A\*2402 usando el software de predicción de uniones "BIMAS" ([http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind](http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind)), cuyo algoritmo había sido descrito por Parker KC et al. (J Immunol 1994, 152(1): 163-75) y Kuzushima K et al. (Blood 2001, 98(6): 1872-81). Estos péptidos se sintetizaron por American Peptide Company Inc. (Sunnyvale, CA) según un método de síntesis en fase sólida estándar y se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa. La pureza (>90 %) y la identidad de los péptidos se determinaron por HPLC analítica y análisis de espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos (DMSO) se disolvieron en sulfoxido de dimetilo a 20 mg/ml y se guardaron a -80 °C.
- 15

#### Inducción de CTL *in vitro*

- Se usaron células dendríticas derivadas de monocito (DC) como las células presentadoras de antígenos (APC) para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) a péptidos presentados sobre el antígeno leucocitario humano (HLA). Las DC se generaron *in vitro* como se describe en cualquier parte (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8). Específicamente, se separaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas de un voluntario normal (HLA-A\*2402 positivo) por disolución de Ficoll-Plaque (Farmacia) por adherencia a una placa de cultivo de tejido de plástico (Becton Dickinson) de manera que se enriquecieran como la fracción de monocitos. La población enriquecida en monocitos se cultivó en presencia de 1000 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (R&D Systems) y 1000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D Systems) en medio AIM-V (Invitrogen) que contenía 2 % de suero autólogo inactivado por calor (AS). Después de 7 días de cultivo, las DC inducidas por citocina se pulsaron con 20 microg/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en presencia de 3 microg/ml de beta-2-microglobulina durante 3 h a 37 °C en medio AIM-V. Pareció que las células generadas expresaban moléculas asociadas a DC, tales como CD80, CD83, CD86 y clase II de HLA, sobre sus superficies celulares (datos no mostrados). Estas DC pulsadas con péptido se inactivaron entonces por mitomicina C (MMC) (30 microg/ml durante 30 min) y se mezclaron a una relación 1:20 con linfocitos T CD8<sup>+</sup> autólogos, obtenidos por selección positiva con el kit CD8 Positive Isolation (Dynal). Estos cultivos se dispusieron en placas de 48 pocillos (Corning); cada pocillo contuvo 1,5 x 10<sup>5</sup> DC pulsadas con péptido, 3 x 10<sup>5</sup> linfocitos T CD8<sup>+</sup> y 10 ng/ml de IL-7 (R&D Systems) en 0,5 ml de medio AIM-V/2 % de AS. Tres días después, estos cultivos se complementaron con IL-2 (CHIRON) a una concentración final de 20 UI/ml. En el día 7 y 14, los linfocitos T se estimularon adicionalmente con las DC pulsadas con péptido autólogo. Las DC se prepararon cada vez por la misma forma descrita anteriormente. CTL se probó contra células A24LCL pulsadas con péptido después de la 3<sup>a</sup> ronda de estimulación de péptido en el día 21 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40

#### Procedimiento de expansión de CTL

- Se expandieron CTL en cultivo usando el método similar al descrito por Riddell et al. (Walteran EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23). Se suspendieron un total de 5 x 10<sup>4</sup> CTL en 25 ml de medio AIM-V/5 % de AS con 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas, inactivadas por MMC, en presencia de 40 ng/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen). Un día después de iniciar los cultivos, se añadieron 120 UI/ml de IL-2 a los cultivos. Los cultivos se alimentaron con medio AIM-V/5 % de AS fresco que contenía 30 UI/ml de IL-2 en los días 5, 8 y 11 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).
- 45
- 50

#### Establecimiento de clones de CTL

- Se hicieron diluciones para tener 0,3, 1 y 3 CTL/pocillo en placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo (Nalge Nunc International). Los CTL se cultivaron con 1 x 10<sup>4</sup> células/pocillo de 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas, 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 y 125 U/ml de IL-2 en un total de 150 microl/pocillo de medio AIM-V que contenía 5 % de AS. Se añadieron 50 microl/pocillo de IL-2 al medio 10 días después de manera que se alcanzara una concentración final de 125 U/ml de IL-2. Se probó la actividad de CTL en el 14<sup>o</sup> día, y los
- 55

clones de CTL se expandieron usando el mismo método que se ha descrito anteriormente (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506).

Actividad de CTL específica

5 Para examinar la actividad de CTL específica, se realizaron ensayo de inmunotransferencia asociada a enzima (ELISPOT) de interferón (IFN)-gamma y enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) de IFN-gamma. Específicamente, se preparó A24LCL pulsado con péptido ( $1 \times 10^4$ /pocillo) como células estimuladoras. Se usaron células cultivadas en 48 pocillos como células respondedoras. Se realizaron ensayo de ELISPOT de IFN-gamma y ensayo de ELISA de IFN-gamma según el procedimiento de fabricación.

10 Establecimiento de células que expresan forzosamente cualquiera o ambos del gen diana y HLA-A24

Se amplificó por PCR el ADNc que codifica un marco de lectura abierto de genes diana o HLA-A24. El producto amplificado por PCR se clonó en el vector pCAGGS. Los plásmidos se transfectaron en COS7, que es los genes diana y la línea HLA-A24-nula, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según los procedimientos recomendados por el fabricante. Después de 2 días de la transfección, las células transfectadas se recogieron con Versene (Invitrogen) y se usaron como las células diana ( $5 \times 10^4$  células/pocillo) para el ensayo de actividad de CTL.

Resultados

Predicción de los péptidos que se unen a HLA-A24 derivados de CDCA1

La Tabla 1 muestra los péptidos que se unen a HLA-A\*2402 de CDCA1 con el fin de la mayor afinidad de unión. Se seleccionaron un total de 40 péptidos que tienen posible capacidad de unión a HLA-A24 y se examinaron para determinar los péptidos de epitope.

[Tabla 1]

Péptidos que se unen a HLA-A24 derivados de CDCA1			
Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Puntuación de unión	SEQ ID NO.
36	LYPNPKPEVL	300	1
74	MYPHLMEGFL	300	2
119	RFLSGIINF	25,2	3
335	KTEENSFKRL	17,28	4
432	KYHDGIEKAA	16,8	5
181	KQLSDGIQEL	15,84	6
64	FYMMPVNSEV	11,55	7
295	LYQKKIQDLS	10,5	8
309	KLASILKESL	9,6	9
146	KSSADKMQQL	9,6	10
48	IYMRALQIVY	9	11
185	DGIQELQQSL	8,64	12
231	VSLKEIQESL	8,4	13
5	SFPRYNVAEI	8,25	14
394	INQEIQIKL	7,92	15
322	DQIESDESEL	7,92	16
87	NLVTHLDSFL	7,2	17
368	QYKRTVIEDC	7	18

Péptidos que se unen a HLA-A24 derivados de CDCA1			
Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Puntuación de unión	SEQ ID NO.
295	LYQKKIQDL	360	19
278	IYGDSVDCL	240	20
74	MYPHLMEGF	180	21
8	RYNVAEIVI	150	22
56	VYGIRLEHF	100	23
422	IFLNLKTAL	36	24
119	RFLSGIINF	30	25
144	QYKSSADKM	27,5	26
418	KSQEIFLNL	24,192	27
197	DFHQKTIVL	20	28
275	KYEIYGDSV	15	29
432	KYHDGIEKA	13,2	30
387	VYERVTTIN	10,5	31
186	GIQELQQSL	10,368	32
48	IYMRALQIV	9	33

Posición inicial indica el número de resto de aminoácido del extremo N de CDCA1.

Puntuación de unión deriva de "BIMAS".

#### 5 Inducción de CTL con los péptidos predichos de CDCA1 restringidos con HLA-A\*2402 y establecimiento de líneas de CTL estimuladas con péptidos derivados de CDCA1

Se generaron CTL para aquellos péptidos derivados de CDCA1 según los protocolos que se describen en "Materiales y métodos". Se determinó la actividad de CTL específica de péptido por el ensayo ELISPOT de IFN-gamma (Figura 1a-f). Mostró que CDCA1-A24-10-119 (SEQ ID NO: 3), CDCA1-A24-10-335 (SEQ ID NO: 4), CDCA1-A24-10-48 (SEQ ID NO: 11), CDCA1-A24-10-5 (SEQ ID NO: 14), CDCA1-A24-9-8 (SEQ ID NO: 22) y CDCA1-A24-9-56 (SEQ ID NO: 23) demostraron una potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control. Además, las células en el número de pocillo positivo N.º 8 estimuladas con CDCA1-A24-10-119 (SEQ ID NO: 3), N.º 1 con CDCA1-A24-10-335 (SEQ ID NO: 4), N.º 1 con CDCA1-A24-10-48 (SEQ ID NO: 11), N.º 4 con CDCA1-A24-10-5 (SEQ ID NO: 14), N.º 2 con CDCA1-A24-9-8 (SEQ ID NO: 22) y N.º 2 con CDCA1-A24-9-56 (SEQ ID NO: 23) se expandieron y establecieron líneas de CTL. La actividad de CTL de aquellas líneas de CTL se determinó por ensayo de ELISA de IFN-gamma (Figura 2a-f). Mostró que todas las líneas de CTL demostraron una potente producción de IFN-gamma contra las células diana pulsadas con péptido correspondiente en comparación con células diana sin pulso de péptido. Por otra parte, no pudieron establecerse líneas de CTL por estimulación con otros péptidos, a pesar de que los péptidos tenían posible actividad de unión con HLA-A\*2402. Por ejemplo, se mostraron datos negativos típicos de la respuesta de CTL estimulada con CDCA1-A24-10-74 (SEQ ID NO: 2) en la Figura 1g y la Figura 2g. Los resultados en el presente documento indican que los seis péptidos derivados de CDCA1 tienen capacidad de inducir potentes líneas de CTL.

#### 15 Establecimiento de clones de CTL contra péptidos específicos de CDCA1

Se establecieron clones de CTL por dilución limitante de líneas de CTL como se describe en "Materiales y métodos", y se determinó la producción de IFN-gamma a partir de clones de CTL contra péptido pulsado con células diana por ensayo de ELISA de IFN-gamma. Se determinaron las potentes producciones de IFN-gamma a partir de clones de CTL estimulados con SEQ ID NO: 23 en la Figura 3.

Actividad de CTL específica contra células diana que expresan exógenamente CDCA1 y HLA-A\*2402

Se examinaron líneas de CTL establecidas producidas contra estos péptidos para su capacidad para reconocer células diana que expresan exógenamente CDCA1 y molécula de HLA-A\*2402. Se probó la actividad de CTL específica contra células COS7 que se transfectaron con tanto la longitud completa del gen de molécula CDCA1 como HLA-A\*2402 (un modelo específico para las células diana que expresan exógenamente el gen CDCA1 y HLA-A\*2402) usando las líneas de CTL producidas por péptido correspondiente como las células efectoras. Se prepararon células COS7 transfectadas con cualquiera longitud completa de los genes CDCA1 o HLA-A\* 2402 como control. En la Figura 4, los CTL estimulados con SEQ ID NO: 23 mostraron potente actividad de CTL contra células COS7 que expresan tanto CDCA1 como HLA-A\* 2402. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica significativa contra los controles. Así, estos datos demuestran claramente que el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 se presenta naturalmente sobre las células diana con molécula de HLA-A\*2402 y es reconocido por los CTL. Los resultados indican que este péptido derivado de CDCA1 puede aplicarse para inmunoterapia del cáncer, particularmente como vacuna para el cáncer para pacientes con tumores que expresan CDCA1.

Análisis de homología de péptidos de antígeno

Los CTL estimulados con CDCA1-A24-10-119 (SEQ ID NO: 3), CDCA1-A24-10-335 (SEQ ID NO: 4), CDCA1-A24-10-48 (SEQ ID NO: 11), CDCA1-A24-10-5 (SEQ ID NO: 14), CDCA1-A24-9-8 (SEQ ID NO: 22) y CDCA1-A24-9-56 (SEQ ID NO: 23) mostraron actividad de CTL significativa y específica. Este resultado puede ser debido al hecho de que las secuencias de CDCA1-A24-10-119 (SEQ ID NO: 3), CDCA1-A24-10-335 (SEQ ID NO: 4), CDCA1-A24-10-48 (SEQ ID NO: 11), CDCA1-A24-10-5 (SEQ ID NO: 14), CDCA1-A24-9-8 (SEQ ID NO: 22) y CDCA1 -A24-9-56 (SEQ ID NO: 23) son homólogas a péptidos derivados de otras moléculas que son conocidas por sensibilizar el sistema inmunitario humano. Para excluir esta posibilidad, se realizaron análisis de homología para estas secuencias de péptidos usando como búsquedas el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) que reveló que no había secuencias con homología significativa. Los resultados de los análisis de homología indican que las secuencias de CDCA1-A24-10-119 (SEQ ID NO: 3), CDCA1-A24-10-335 (SEQ ID NO: 4), CDCA1-A24-10-48 (SEQ ID NO: 11), CDCA1-A24-10-5 (SEQ ID NO: 14), CDCA1-A24-9-8 (SEQ ID NO: 22) y CDCA1-A24-9-56 (SEQ ID NO: 23) son únicas y así hay poca posibilidad de que estas moléculas produzcan respuestas inmunológicas accidentales a algunas moléculas sin relacionar.

En conclusión, se identificaron novedosos péptidos de epítipo HLA-A24 derivados de CDCA1 y demostraron ser aplicados para inmunoterapia del cáncer.

**Aplicabilidad industrial**

La presente invención describe nuevos TAA, particularmente aquellos derivados de CDCA1 que inducen respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas y tienen aplicabilidad para una amplia matriz de tipos de cáncer. Tales TAA garantizan además el desarrollo como vacunas de péptido contra enfermedades asociadas a CDCA1, por ejemplo cánceres, más particularmente, tumor testicular, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de esófago.

Aunque la invención se describe en el presente documento en detalle y con referencia a realizaciones específicas de la misma, debe entenderse que la anterior descripción es a modo de ejemplo y de naturaleza explicativa y está prevista para ilustrar la invención y sus realizaciones preferidas.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDOS DE EPÍTOPE CDCA1 Y VACUNAS QUE LOS CONTIENE

<130> ONC-A0808P

<150> US 61/074.062

<151> 19-06-2008

<150> US 61/197.599

<151> 28-10-2008

<160> 35

<170> PatentIn versión 3.4

5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 1

15

Leu	Tyr	Pro	Asn	Pro	Lys	Pro	Glu	Val	Leu
1				5					10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

25

<400> 2

Met	Tyr	Pro	His	Leu	Met	Glu	Gly	Phe	Leu
1				5					10

<210> 3

30

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

# ES 2 658 842 T3

<400> 3

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

5 <210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 4

Lys Thr Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu  
15 1 5 10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

25 <400> 5

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

<210> 6

30 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

# ES 2 658 842 T3

<400> 6

Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu  
1 5 10

5 <210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 7

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

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

25 <400> 8

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

<210> 9

30 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

# ES 2 658 842 T3

<400> 9

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

5 <210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 10

Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu  
1 5 10

15

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

25 <400> 11

Ile Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr  
1 5 10

30

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada



# ES 2 658 842 T3

<400> 15

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

5 <210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 16

15 Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu  
1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

25 <400> 17

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

<210> 18

30 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

# ES 2 658 842 T3

<400> 18

Gln Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys  
1 5 10

5 <210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 19

15 Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu  
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

25 <400> 20

Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu  
1 5

<210> 21

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

# ES 2 658 842 T3

<400> 21

Met Tyr Pro His Leu Met Glu Gly Phe  
1 5

5 <210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 22

15 Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile Val Ile  
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

25 <400> 23

Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe  
1 5

<210> 24

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

ES 2 658 842 T3

<400> 24

Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu  
1 5

5 <210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 25

Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe  
1 5

15

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

25 <400> 26

Gln Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met  
1 5

30

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

# ES 2 658 842 T3

<400> 27

Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu  
1 5

5 <210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 28

15 Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu  
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

25 <400> 29

Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val  
1 5

<210> 30

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

# ES 2 658 842 T3

<400> 30

Lys Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala  
1 5

5 <210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

<400> 31

Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn  
1 5

15

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

25 <400> 32

Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln Ser Leu  
1 5

30

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Una secuencia de péptidos artificialmente sintetizada

# ES 2 658 842 T3

<400> 33

Ile Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val  
1 5

5

<210> 34

<211> 1980

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> CDS

<222> (301)..(1695)

<400> 34

15

# ES 2 658 842 T3

gcggaatggg gcgggacttc cagtaggagg cgccaagttt gaaaagtgat gacggttgac	60
gtttgctgat ttttgacttt gctttagct gctccccgaa ctcgccgtct tctgtcggc	120
ggccggcact gtaggtgagc gcgagaggac ggaggaagga agcctgcaga cagacgcctt	180
ctccatccca aggcgcgggc aggtgccggg acgctggggc tggcggtggt ttcgtcgtgc	240
tcagcggtg gaggaggcgg aagaaccag agcctgggag attaacagga aacttccaag	300
atg gaa act ttg tct ttc ccc aga tat aat gta gct gag att gtg att	348
Met Glu Thr Leu Ser Phe Pro Arg Tyr Asn Val Ala Glu Ile Val Ile	
1 5 10 15	
cat att cgc aat aag atc tta aca gga gct gat ggt aaa aac ctc acc	396
His Ile Arg Asn Lys Ile Leu Thr Gly Ala Asp Gly Lys Asn Leu Thr	
20 25 30	
aag aat gat ctt tat cca aat cca aag cct gaa gtc ttg cac atg atc	444
Lys Asn Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Pro Glu Val Leu His Met Ile	
35 40 45	
tac atg aga gcc tta caa ata gta tat gga att cga ctg gaa cat ttt	492
Tyr Met Arg Ala Leu Gln Ile Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe	
50 55 60	
tac atg atg cca gtg aac tct gaa gtc atg tat cca cat tta atg gaa	540
Tyr Met Met Pro Val Asn Ser Glu Val Met Tyr Pro His Leu Met Glu	
65 70 75 80	
ggc ttc tta cca ttc agc aat tta gtt act cat ctg gac tca ttt ttg	588
Gly Phe Leu Pro Phe Ser Asn Leu Val Thr His Leu Asp Ser Phe Leu	
85 90 95	
cct atc tgc cgg gtg aat gac ttt gag act gct gat att cta tgt cca	636
Pro Ile Cys Arg Val Asn Asp Phe Glu Thr Ala Asp Ile Leu Cys Pro	
100 105 110	
aaa gca aaa cgg aca agt cgg ttt tta agt ggc att atc aac ttt att	684
Lys Ala Lys Arg Thr Ser Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe Ile	
115 120 125	
cac ttc aga gaa gca tgc cgt gaa acg tat atg gaa ttt ctt tgg caa	732
His Phe Arg Glu Ala Cys Arg Glu Thr Tyr Met Glu Phe Leu Trp Gln	
130 135 140	
tat aaa tcc tct gcg gac aaa atg caa cag tta aac gcc gca cac cag	780
Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu Asn Ala Ala His Gln	
145 150 155 160	
gag gca tta atg aaa ctg gag aga ctt gat tct gtt cca gtt gaa gag	828
Glu Ala Leu Met Lys Leu Glu Arg Leu Asp Ser Val Pro Val Glu Glu	
165 170 175	
caa gaa gag ttc aag cag ctt tca gat gga att cag gag cta caa caa	876
Gln Glu Glu Phe Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln	
180 185 190	

ES 2 658 842 T3

tca cta aat cag gat ttt cat caa aaa acg ata gtg ctg caa gag gga Ser Leu Asn Gln Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu Gln Glu Gly 195 200 205	924
aat tcc caa aag aag tca aat att tca gag aaa acc aag cgt ttg aat Asn Ser Gln Lys Lys Ser Asn Ile Ser Glu Lys Thr Lys Arg Leu Asn 210 215 220	972
gaa cta aaa ttg tcg gtg gtt tct ttg aaa gaa ata caa gag agt ttg Glu Leu Lys Leu Ser Val Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu 225 230 235 240	1020
aaa aca aaa att gtg gat tct cca gag aag tta aag aat tat aaa gaa Lys Thr Lys Ile Val Asp Ser Pro Glu Lys Leu Lys Asn Tyr Lys Glu 245 250 255	1068
aaa atg aaa gat acg gtc cag aag ctt aaa aat gcc aga caa gaa gtg Lys Met Lys Asp Thr Val Gln Lys Leu Lys Asn Ala Arg Gln Glu Val 260 265 270	1116
gtg gag aaa tat gaa atc tat gga gac tca gtt gac tgc ctg cct tca Val Glu Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu Pro Ser 275 280 285	1164
tgt cag ttg gaa gtg cag tta tat caa aag aaa ata cag gac ctt tca Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser 290 295 300	1212
gat aat agg gaa aaa tta gcc agt atc tta aag gag agc ctg aac ttg Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu Asn Leu 305 310 315 320	1260
gag gac caa att gag agt gat gag tca gaa ctg aag aaa ttg aag act Glu Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Thr 325 330 335	1308
gaa gaa aat tcg ttc aaa aga ctg atg att gtg aag aag gaa aaa ctt Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu 340 345 350	1356
gcc aca gca caa ttc aaa ata aat aag aag cat gaa gat gtt aag caa Ala Thr Ala Gln Phe Lys Ile Asn Lys Lys His Glu Asp Val Lys Gln 355 360 365	1404
tac aaa cgc aca gta att gag gat tgc aat aaa gtt caa gaa aaa aga Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys Asn Lys Val Gln Glu Lys Arg 370 375 380	1452
ggt gct gtc tat gaa cga gta acc aca att aat caa gaa atc caa aaa Gly Ala Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys 385 390 395 400	1500
att aaa ctt gga att caa caa cta aaa gat gct gct gaa agg gag aaa Ile Lys Leu Gly Ile Gln Gln Leu Lys Asp Ala Ala Glu Arg Glu Lys 405 410 415	1548
ctg aag tcc cag gaa ata ttt cta aac ttg aaa act gct ttg gag aaa Leu Lys Ser Gln Glu Ile Phe Leu Asn Leu Lys Thr Ala Leu Glu Lys 420 425 430	1596
tac cac gac ggt att gaa aag gca gca gag gac tcc tat gct aag ata	1644

ES 2 658 842 T3

Tyr His Asp Gly Ile Glu Lys Ala Ala Glu Asp Ser Tyr Ala Lys Ile  
 435 440 445  
 gat gag aag aca gct gaa ctg aag agg aag atg ttc aaa atg tca acc 1692  
 Asp Glu Lys Thr Ala Glu Leu Lys Arg Lys Met Phe Lys Met Ser Thr  
 450 455 460  
 tga ttaacaaaat tacatgtctt tttgtaaata gcttgccatc ttttaatttt 1745  
 ctatttagaa agaaaagttg aagcgaatgg aagtatcaga agtaccaaata aatgttggct 1805  
 tcatcagttt ttatacactc tcataagtag ttaataagat gaatttaatg taggctttta 1865  
 ttaatttata attaaaataa cttgtgcagc tattcatgtc tctactctgc cccttgttgt 1925  
 aatagtttg agtaaaacaa aactagttac ctttgaata tatatatttt tttct 1980

<210> 35

<211> 464

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

10

# ES 2 658 842 T3

Tyr Lys Ser Ser Ala Asp Lys Met Gln Gln Leu Asn Ala Ala His Gln  
 145 150 155 160

Glu Ala Leu Met Lys Leu Glu Arg Leu Asp Ser Val Pro Val Glu Glu  
 165 170 175

Gln Glu Glu Phe Lys Gln Leu Ser Asp Gly Ile Gln Glu Leu Gln Gln  
 180 185 190

Ser Leu Asn Gln Asp Phe His Gln Lys Thr Ile Val Leu Gln Glu Gly  
 195 200 205

Asn Ser Gln Lys Lys Ser Asn Ile Ser Glu Lys Thr Lys Arg Leu Asn  
 210 215 220

Glu Leu Lys Leu Ser Val Val Ser Leu Lys Glu Ile Gln Glu Ser Leu  
 225 230 235 240

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

Lys Met Lys Asp Thr Val Gln Lys Leu Lys Asn Ala Arg Gln Glu Val  
 260 265 270

Val Glu Lys Tyr Glu Ile Tyr Gly Asp Ser Val Asp Cys Leu Pro Ser  
 275 280 285

Cys Gln Leu Glu Val Gln Leu Tyr Gln Lys Lys Ile Gln Asp Leu Ser  
 290 295 300

Asp Asn Arg Glu Lys Leu Ala Ser Ile Leu Lys Glu Ser Leu Asn Leu  
 305 310 315 320

Glu Asp Gln Ile Glu Ser Asp Glu Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Thr  
 325 330 335

Glu Glu Asn Ser Phe Lys Arg Leu Met Ile Val Lys Lys Glu Lys Leu  
 340 345 350

Ala Thr Ala Gln Phe Lys Ile Asn Lys Lys His Glu Asp Val Lys Gln  
 355 360 365

Tyr Lys Arg Thr Val Ile Glu Asp Cys Asn Lys Val Gln Glu Lys Arg  
 370 375 380

Gly Ala Val Tyr Glu Arg Val Thr Thr Ile Asn Gln Glu Ile Gln Lys



**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido aislado que tiene inducibilidad de linfocitos T citotóxicos (CTL), en el que el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en
  - (a) SEQ ID NO: 23, 3, 4, 11, 14 y 22; y
- 5 (b) SEQ ID NO: 23, 3, 4, 11, 14 y 22, en la que el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano, y/o en la que el extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina.
2. El péptido aislado de la reivindicación 1, en el que el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, 3, 4, 11, 14 y 22.
3. Un polinucleótido aislado que codifica un péptido de las reivindicaciones 1 o 2.
4. Un método *in vitro* de inducción de una célula presentadora de antígenos con alta inducibilidad de CTL usando un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2, y/o un polinucleótido como se expone en la reivindicación 3.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho método comprende una o ambas de las siguientes etapas:
  - 15 (a) poner en contacto una célula presentadora de antígenos con un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2, y
  - (b) introducir un polinucleótido como se expone en la reivindicación 3 en una célula presentadora de antígenos.
6. Una célula presentadora de antígenos aislada que presenta un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2 sobre su superficie.
- 20 7. La célula presentadora de antígenos de la reivindicación 6, en la que dicha célula se induce por el método de la reivindicación 4 o 5.
8. Un método *in vitro* de inducción de un CTL usando:
  - (a) un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2;
  - (b) un polinucleótido como se expone en la reivindicación 3;
  - 25 (c) una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma que presenta un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2 sobre su superficie;
  - (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad de receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce un complejo de un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA; o
  - 30 (e) combinaciones de los mismos.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho método comprende al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
  - (a) poner en contacto un linfocito T CD 8-positivo con una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma que presenta un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2 sobre su superficie, y
  - 35 (b) introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad de receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce un complejo de un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA en un linfocito T CD8-positivo.
10. Un CTL aislado que se dirige a uno cualquiera de los péptidos de la reivindicación 1 o 2.
11. Un CTL aislado que se induce usando el método de la reivindicación 8 o 9.
- 40 12. Un agente farmacéutico que comprende un principio activo seleccionada del grupo que consiste en:
  - (a) al menos un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2;
  - (b) al menos un polinucleótido como se expone en la reivindicación 3;
  - (c) una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma que presenta al menos un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2 sobre su superficie;

(d) un CTL como se expone en la reivindicación 10 u 11; y

(e) combinaciones de los mismos,

en combinación con un vehículo farmacológicamente aceptable para su uso seleccionado del grupo que consiste en:

(i) tratamiento de un cáncer;

5 (ii) profilaxis de un cáncer;

(iii) prevención de la reaparición posoperatoria de un cáncer; y

(iv) combinaciones de los mismos.

13. Una composición que comprende

(a) un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2;

10 (b) un polinucleótido como se expone en la reivindicación 3;

(c) una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma que presenta un péptido como se expone en la reivindicación 1 o 2 sobre su superficie;

(d) un CTL como se expone en la reivindicación 10 u 11; o

(e) combinaciones de los mismos,

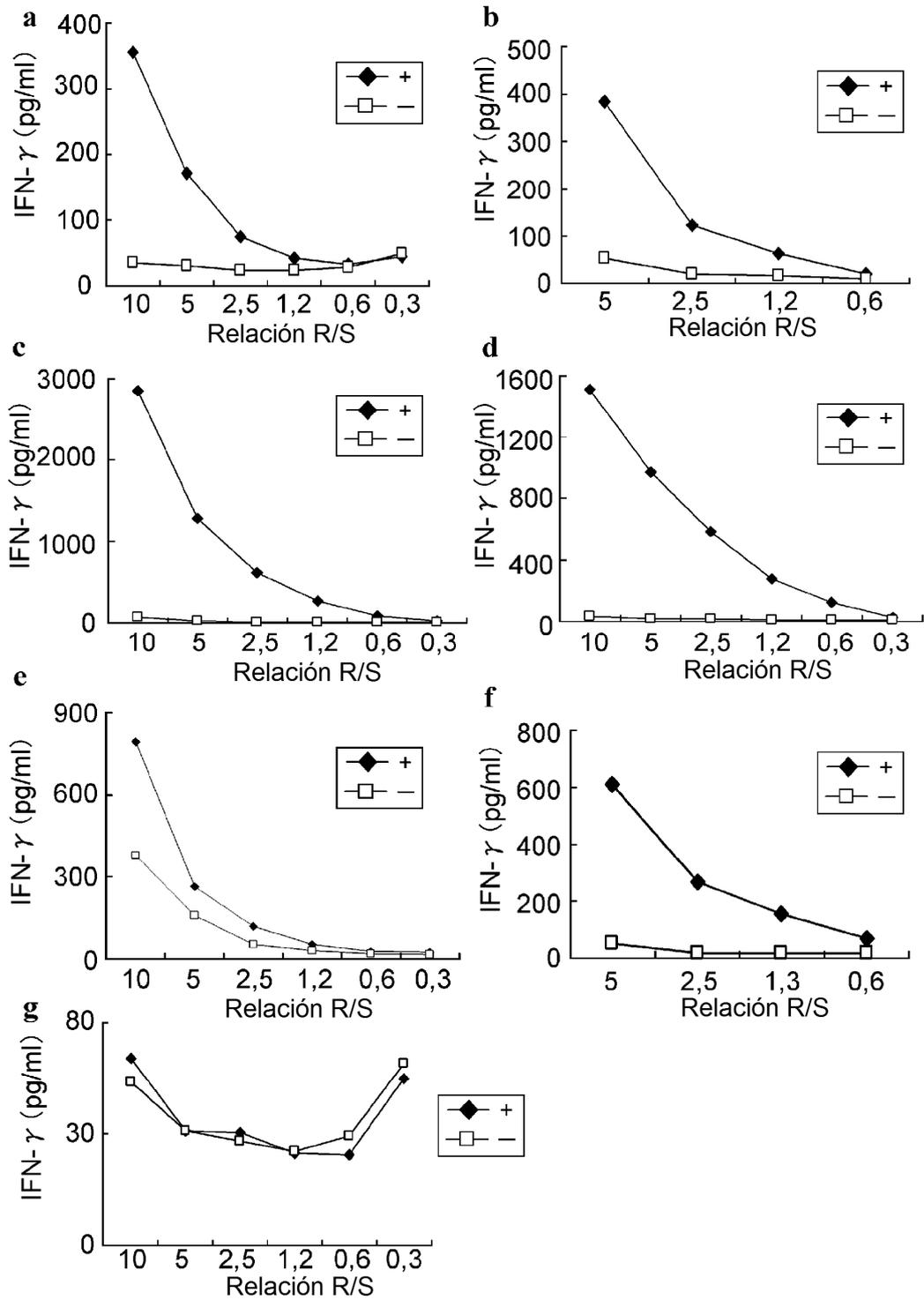
15 para su uso en inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer.

14. El agente farmacéutico para su uso según la reivindicación 12, en el que dicho agente farmacéutico es una vacuna.

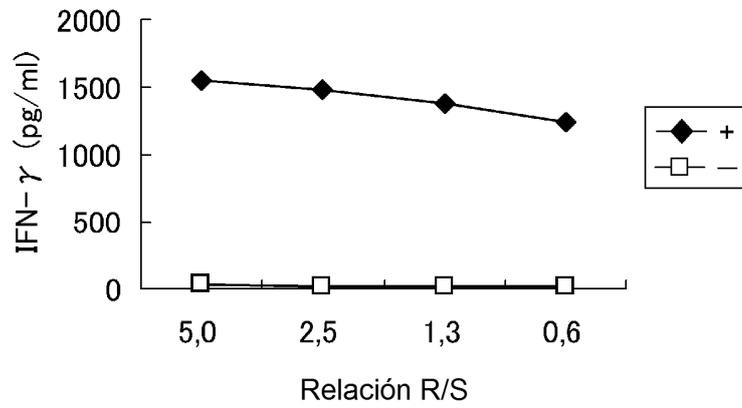
20 15. El agente farmacéutico para su uso de la reivindicación 12, la composición para su uso de la reivindicación 13 o la vacuna para su uso de la reivindicación 14, que se formula para administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24.



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

