

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 808**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/06</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/09</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2013 PCT/JP2013/073084**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14034754**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2013 E 13833212 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2891663**

54 Título: **Péptido obtenido de PSF1**

30 Prioridad:

**31.08.2012 JP 2012191050**

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

**09.04.2018**

73 Titular/es:

**VASCULEAD INC. (100.0%)  
4-7-22 Nipponbashi, Naniwa-ku  
Osaka-shi, Osaka 556-0005, JP**

72 Inventor/es:

**TANAKA, HIDEKAZU;  
IGUCHI, MOTOFUMI y  
YOKOYAMA, MARI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 662 808 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Péptido obtenido de PSF1

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos obtenidos de PSF1 que son útiles para la inmunoterapia específica para pacientes con cáncer HLA-A02 positivos.

**10 Técnica relacionada**

La PSF1 forma un complejo GINS tetramérico con las proteínas constitutivas SLD5, PSF2 y PSF3, que se une al MCM (complejo de mantenimiento de minicromosomas) y al CDC45. Se sabe que esto está relacionado con el inicio de la replicación y alargamiento del ADN (referencias 1-2 de no patente).

15 Con respecto a su relación con el cáncer, se considera que la expresión de PSF1 aumenta en las células humanas de cáncer de mama. También se ha informado de que la reducción de la expresión de PSF1 provoca una supresión significativa de la proliferación. Además, se ha informado de que el índice de supervivencia global entre los pacientes con cáncer de mama, cuyos niveles de expresión de PSF1 en el tejido canceroso son bajos, es significativamente mayor en comparación con los pacientes cuyo nivel es alto (referencia 3 de no patente).

Se ha documentado la expresión de PSF1 en el tejido canceroso obtenido de melanoma maligno, cáncer de pulmón y cáncer de esófago (referencias 4-5 de no patente, documento de patente 1).

25 También se conoce la relación entre la PSF1 y las células madre cancerosas (referencia 5 de no patente).

[Referencia de patente] Publicación internacional Gazette WO2003/42661

30 [Referencia 1 de no patente] *Structure of the human GINS complex and its assembly and functional interface in replication initiation*, Kamada *et al.*, Nat. Struct. Mol. Biol. 2007; 14:388-396

[Referencia 2 de no patente] *The human GINS complex associates with cdc45 and MCM and is essential for DNA replication*, Aparicio *et al.*, Nucleic. Acid. Res. 2009; 37:2087-2095

35 [Referencia 3 de no patente] *Up-regulation of psf1 promotes the growth of breast cancer cells*, Izumi *et al.*, Genes to Cells 2010; 15:1025-1024.

[Referencia 4 de no patente] *Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression*, Ryu B. *et al*, ProsOne 2007; 7:e594.

40 [Referencia 5 de no patente] *PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties*, Nagahama Y. *et al.*, Cancer. Res. 2010; 70:1215-24

**Sumario de la invención**

45

**Problema a resolver con la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un péptido que sea útil para la inmunoterapia específica para pacientes con cáncer.

50

**Medios para resolver el problema**

Los inventores descubrieron los péptidos obtenidos de PSF1, que están relacionados con el dominio extracelular de la molécula HLA-A02 de la cepa celular de cáncer de mama humano. Y así, confirmaron que estos péptidos inducían una CTL específica de péptido (célula T con citotoxicidad celular) y consiguieron la presente invención.

55

La presente invención se define por las siguientes reivindicaciones:

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

60

2. Una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de 1.

3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de 2.

65

4. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de 1, la molécula de ácido nucleico de 2 o el vector de 3.

5. La composición farmacéutica de 4 para su uso en el tratamiento del cáncer.

6. La composición farmacéutica para el uso de 5, en la que el cáncer es metastásico, resistente a quimioterapia o a radioterapia, o recurrente.

5

### Efecto de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan péptidos obtenidos de PSF1 que tienen la capacidad de inducir las CTL que pueden destruir las células tumorales de los pacientes con cáncer HLA-A02<sup>+</sup>. De acuerdo con la presente invención, se hace posible la inmunoterapia específica para los pacientes con cáncer HLA-A02<sup>+</sup>.

10

### Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 muestra un resultado de detección de una CTL específica de péptido mediante tinción del tetrámero. Las células CTL obtenidas por incubación se sometieron a tinción doble con el tetrámero marcado con PE y los anticuerpos anti-CD8 marcados con APC-H7, de modo que la intensidad de fluorescencia se midió con FACSAria. Las fracciones celulares teñidas con ambos marcadores se detectaron en las posiciones incluidas en las líneas (una porción superior en cada panel). Dado que se observaron células positivas en dos tipos de líneas de CTL (0209-01 H2 y 0209-02 D2), se descubrió que se obtuvo CTL que reconocía YLYDRLLRI (SEQ ID NO: 3).

15

20

[Figura 2-1] La figura 2-1 muestra la citotoxicidad celular con una línea de CTL específica de péptido. Las células pulsadas con péptidos (péptidos +) o las células no pulsadas con péptidos (péptidos -) obtenidas de la CTL específica del péptido YLYDRLLRI (SEQ ID NO: 3) (E; célula efectora) y de células T2 (T; célula diana) se cocultivaron a una proporción celular E:T de 1:1, 3:1 y 10:1. Al día siguiente, se obtuvo el índice de supervivencia de las células diana. A continuación, se descubrió que el índice de supervivencia de las células diana pulsadas con péptidos disminuía más que el de las células diana no pulsadas con péptidos. Además, dado que el índice de supervivencia disminuía de conformidad con la proporción de las células cocultivadas, se demostró la citotoxicidad celular mediante CTL específica de péptido.

25

30

[Figura 2-2] La figura 2-2 muestra la citotoxicidad celular con una línea de CTL específica de péptido. Las células pulsadas con péptidos (péptidos +) o las células no pulsadas con péptidos (péptidos -) obtenidas de la CTL específica del péptido RALRWEYGSVLPN (SEQ ID NO: 4) (E; célula efectora) y células T2 (T; célula diana) se cocultivaron a una proporción celular E:T de 1:1, 3:1 y 10:1. Al día siguiente, se obtuvo el índice de supervivencia de las células diana. A continuación, se descubrió que el índice de supervivencia de las células diana pulsadas con péptidos disminuía más que el de las células diana no pulsadas con péptidos. Además, dado que el índice de supervivencia disminuía de conformidad con la proporción de las células cocultivadas, se demostró la citotoxicidad celular mediante CTL específica de péptido.

35

40

[Figura 2-3] La figura 2-3 muestra la citotoxicidad celular con una línea de CTL específica de péptido. Las células pulsadas con péptidos (péptidos +) o las células no pulsadas con péptidos (péptidos -) obtenidas de la CTL específica del péptido ALRWEYGSVL (SEQ ID NO: 8) (E; célula efectora) y células T2 (T; célula diana) se cocultivaron a una proporción celular E:T de 1:1, 3:1 y 10:1. Al día siguiente, se obtuvo el índice de supervivencia de las células diana. A continuación, se descubrió que el índice de supervivencia de las células diana pulsadas con péptidos disminuía más que el de las células diana no pulsadas con péptidos. Además, dado que el índice de supervivencia disminuía de conformidad con la proporción de las células cocultivadas, se demostró la citotoxicidad celular mediante CTL específica de péptido.

45

[Figura 3] La figura 3 muestra las posiciones de YLYDRLLRI (SEQ ID NO: 3), RALRWEYGSVLPN (SEQ ID NO: 4) y ALRWEYGSV (SEQ ID NO:5) en una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de PSF1. Los tres péptidos se encuentran en la región de 79 a 100 de la PSF1.

50

### Descripción detallada de la realización preferida

#### Péptido y polipéptido

55

La presente invención proporciona un péptido obtenido de PSF1 que tiene la capacidad de inducir CTL (de aquí en adelante, el péptido de la invención).

De acuerdo con la invención, el "péptido obtenido de PSF1" se refiere a un fragmento peptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos que es una parte de la secuencia de aminoácidos de PSF1. La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 2) de PSF1 han sido divulgadas por GenBank con el número de registro NP\_066545 y NM\_021067, respectivamente. El documento WO 03/033675 también divulga la SEQ ID NO:1 (con la SEQ ID NO: 19), que muestra su papel en el cáncer y describe las moléculas antisentido contra la PSF1 para su uso en métodos para tratar el cáncer.

60

65

El péptido de la invención se descubrió como un péptido que tenía una gran afinidad de unión a los antígenos HLA-

A02. Esto significa que dicho péptido puede formar un complejo con un HLA-A02 que se presente sobre la superficie celular.

De acuerdo con la invención, la expresión "tener la capacidad de inducir CTL" significa que el péptido es reconocido por una CTL específica. Dicho de otra forma, el péptido tiene la capacidad de inducir una CTL específica de péptido. A pesar de que se espera que los péptidos que tienen una alta afinidad de unión a los antígenos HLA, tal y como se ha descrito anteriormente, sean muy eficaces como vacunas contra el cáncer, los péptidos de interés, que pueden estar disponibles como ingrediente farmacéutico activo, han de analizarse para comprobar que realmente son capaces de inducir las CTL. Esta capacidad para inducir CTL específicas de péptido puede analizarse, por ejemplo, determinando si una citocina, tal como el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), se produce o no mediante PBMC estimuladas por péptidos en respuesta a las células que presentan el antígeno, que están pulsadas con dichos péptidos utilizando la técnica ELISA o alguna técnica similar. Además, la actividad citotóxica de la CTL inducida puede determinarse mediante el ensayo de liberación de Cr<sup>51</sup> y ensayos similares. Se prefiere que el péptido de la presente invención tenga de 8 a 14, más preferentemente de 8 a 11, y especialmente 9 o 10, restos de aminoácidos, considerando el buen reconocimiento por CTL.

Como resultado del análisis de la capacidad de los péptidos para inducir CTL, tal y como se ha descrito anteriormente, se descubrió que los péptidos que tienen una gran afinidad de unión a un antígeno HLA no presentaban necesariamente una gran capacidad para inducir las CTL. Sin embargo, los péptidos seleccionados de los péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos indicadas por YLYDRLLRI (SEQ ID NO: 3), RALRWEYGSVLPN (SEQ ID NO: 4) y ALRWEYGSV (SEQ ID NO: 5) mostraron particularmente una gran capacidad para inducir CTL y actividad citotóxica. Estos tres péptidos se encuentran en la región de 79 a 100 de la PSF1 (Figura 3). Con respecto a YLYDRLLRI (SEQ ID NO: 3), los péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos de la misma, AYLYDRLLRI (SEQ ID NO: 6) o YLYDRLLRIR (SEQ ID NO: 7), también presentaron una gran capacidad para inducir las CTL. Alternativamente, con respecto a ALRWEYGSV (SEQ ID NO: 5), los péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos de la misma, ALRWEYGSVL (SEQ ID NO: 8) o RALRWEYGSV (SEQ ID NO: 9), también presentaron una gran capacidad para inducir las CTL.

También se divulgan derivados peptídicos de un péptido obtenido de PSF1 (de aquí en adelante, los peptídicos de la invención). Un "derivado peptídico de un péptido obtenido de PSF1" es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos del péptido obtenido de PSF1, exceptuando que se ha introducido una sustitución, deleción y/o inserción de uno o dos aminoácidos, y que tiene la capacidad de inducir las CTL. Los procedimientos anteriormente descritos pueden determinar si un derivado peptídico tiene o no las propiedades deseadas.

Para no alterar la propiedad del péptido original, la sustitución de un aminoácido se lleva a cabo preferentemente en los aminoácidos que pertenecen a la misma familia, tales como aminoácidos polares, aminoácidos no polares, aminoácidos hidrófobos, aminoácidos hidrófilos, aminoácidos con carga positiva, aminoácidos con carga negativa y aminoácidos aromáticos. La deleción y/o inserción de un aminoácido se realiza preferentemente de modo que el número de restos de aminoácido en el que consiste el derivado es de 8-14.

En general, los péptidos que son capaces de unirse a una molécula de HLA comparten algunas secuencias de aminoácidos específicas con regularidad, dependiendo de los tipos de HLA. Las secuencias de aminoácido específicas con regularidad se denominan "motivos de unión". Es decir, el motivo de unión a un HLA-A02 es la secuencia en la que el aminoácido cercano al extremo N-terminal es isoleucina, leucina, valina, metionina, alanina o treonina, y el del extremo C-terminal es isoleucina, leucina, valina, metionina, alanina o treonina (*Current Pharmaceutical Design* 2010, 16:3149-3157). La unión de un péptido que tiene un motivo de unión a HLA-A02 puede determinarse utilizando análisis informáticos, tal como Bioinformatics and Molecular Analysis Section (NIH, Bethesda, Md.) (Parker K.C. *et al.*, *J. Immunol.*, 152:153-175, 1994). De acuerdo con la presente invención, la sustitución, deleción y/o inserción de un aminoácido se hace preferentemente para que el derivado sea aceptable considerando un motivo de unión a HLA. Es decir, la sustitución, deleción y/o inserción de un aminoácido se realiza preferentemente de modo que el aminoácido cercano al extremo N-terminal sea isoleucina, leucina, valina, metionina, alanina o treonina, y el aminoácido del extremo C-terminal sea isoleucina, leucina, valina, metionina, alanina o treonina.

Los aminoácidos que constituyen los péptidos pueden ser aminoácidos naturales o aminoácidos análogos. Los aminoácidos análogos pueden incluir aminoácidos N-acilados, O-acilados, ácido amidados y alquilados. El grupo amino o carboxílico, o grupo similar, del resto de aminoácido que constituye los péptidos puede modificarse tanto como se requiera, siempre y cuando no se deteriore significativamente la función del péptido. La modificación puede ser la adición de un grupo formilo, acetilo o t-butoxicarbonilo en el extremo N-terminal o grupo amino libre, o la adición de un grupo metilo, etilo, t-butilo o bencilo en el extremo C-terminal o grupo carboxílico libre. Otras modificaciones incluyen la incorporación de aminoácidos D u otros miméticos de aminoácidos que pueden utilizarse, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero de los péptidos.

Los péptidos de la invención pueden sintetizarse mediante un procedimiento de síntesis peptídica utilizado de manera convencional. Por ejemplo, los péptidos pueden prepararse de manera sintética, utilizando tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Entre los ejemplos de procedimientos utilizados de manera convencional

están los descritos en la bibliografía, que incluye "Peptide Synthesis", Interscience, Nueva York, 1966; "The Proteins", vol. 2, Academic Press Inc., Nueva York, 1976.

#### Ácido nucleico y vector

5 La presente invención proporciona además una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención, y un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico. Introduciendo el vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención en una célula que presenta el antígeno, se expresa el péptido o derivado peptídico de la invención, y un complejo entre un HLA y un péptido o derivado peptídico de la presente invención se presenta sobre la superficie de la célula. Así, la célula que presenta el antígeno obtenida de esta manera puede aumentar eficazmente las CTL específicas de péptido contra las células tumorales.

15 Entre los ejemplos de vectores en los que se incorpora la molécula de ácido nucleico de la presente invención, pueden incluirse varios vectores plasmídicos y vectores víricos, tales como adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus y vectores de virus variolovacunal (Liu M., Acres B., Balloul J. M., Bizouarne N., Paul S., Slos P., Squiban P., *Gene-based vaccines and immunotherapeutics*, Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 101 Suppl., 14567-71, 2004). En la técnica se conocen muy bien los métodos para preparar vectores (*Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory*).

20 El vector de la presente invención puede administrarse a un paciente, de modo que el péptido o peptídico de la invención se exprese en las células que presentan el antígeno en el cuerpo del paciente. De manera alternativa, el vector se introduce *ex vivo* en una célula adecuada, por ejemplo, una célula dendrítica extraída del paciente, de modo que la célula expresa el péptido o derivado peptídico de la invención, y después, la célula se reintroduce en el paciente. Dichos métodos se conocen muy bien en la técnica (Hrouda D., Dalglish A. G., *Gene therapy for prostate cancer*, Gene. Ther., 3: 845-52, 1996).

30 La cantidad de vector que se administre puede variar dependiendo del estado de la enfermedad que vaya a tratarse, de la edad y del peso corporal del paciente que vaya a tratarse, y de datos similares, y la cantidad de ADN puede ser preferentemente de 0,1 µg-100 mg, más preferentemente de 1 µg-50 mg. El vector puede administrarse, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intradérmica.

#### Composición farmacéutica

35 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende los péptidos de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican dichos péptidos, o el vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico. La composición farmacéutica de la presente invención es útil para el tratamiento o prevención del cáncer. Especialmente, la PSF1 se asocia a la regeneración de las células madre cancerosas y es muy útil para el tratamiento o la prevención del cáncer que es resistente a los tratamientos con quimioterapia o radioterapia, recurrente o metastásico. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un péptido de la presente invención, o una combinación de dos o más péptidos. Dado que un paciente con cáncer tiene una mezcla de CTL que reconoce una pluralidad de péptidos de antígeno cancerígeno diferentes, es eficaz utilizar una pluralidad de péptidos de la presente invención en combinación. El péptido de la invención puede utilizarse en combinación con un péptido de antígeno cancerígeno distinto del péptido de la presente invención.

45 La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, o similar, además del péptido de la presente invención. Entre los ejemplos del vehículo pueden incluirse la celulosa, polímeros de aminoácidos y albúmina. La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse como preparaciones liposomáticas, preparaciones particuladas, en las que el ingrediente está unido a perlas que tienen un diámetro de varios micrómetros, o preparaciones en las que el ingrediente está unido a lípidos.

50 La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse junto con un adyuvante, que se ha utilizado tradicionalmente en las vacunas para generar una respuesta inmunitaria eficaz. Los adyuvantes adecuados se describen en la bibliografía (Johnson A. G. (1994) *Clin. Microbiol. Rev.*, 7:277-89). Entre los adyuvantes ejemplares se incluyen, sin limitación, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio y alumbre. La composición puede administrarse por vía intradérmica o subcutánea.

55 La composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse como vacuna contra el cáncer. La dosis puede determinarse en función del estado de la enfermedad que va a tratarse, de la edad y del peso corporal del paciente en cuestión. La cantidad de péptido o peptídico de la presente invención en la composición farmacéutica puede ser de 0,0001 mg-1000 mg, preferentemente de 0,001 mg-100 mg, más preferentemente de 0,01 mg-10 mg, incluso más preferentemente de 0,1-5 o 0,5-30 mg. La composición farmacéutica puede administrarse preferentemente, cada día, cada semana, una vez cada varios días, varias semanas o varios meses durante 1-3 años.

#### Método para inducir CTL

65 La presente divulgación describe además un método para inducir CTL. De acuerdo con la invención, las CTL tienen

un efecto citolítico contra las células tumorales HLA-A02<sup>+</sup>. El término "citólítico" se refiere a la propiedad de las CTL que pueden reconocer un complejo entre un péptido de antígeno cancerígeno y un HLA en las células tumorales, y destruir dichas células tumorales. Una CTL de acuerdo con la presente invención puede obtenerse, por ejemplo, incubando *in vitro* PBMC extraídas de un paciente con cáncer HLA-A02<sup>+</sup> en presencia del péptido o derivado peptídico de la presente invención. La CTL inducida por el presente método es útil en la inmunoterapia adoptiva, en la que la CTL inducida se reintroduce en el paciente del cual se han extraído las PBMC para destruir las células cancerosas.

#### Método para inducir una célula presentadora de antígeno

La presente divulgación proporciona además un método para inducir una célula presentadora de antígeno. El método de la presente invención es un método para inducir una célula presentadora de antígeno, que puede inducir una CTL contra células tumorales HLA-A02<sup>+</sup>. El método puede llevarse a cabo, por ejemplo, incubando una célula que tiene capacidad para presentar el antígeno, obtenida de un paciente con cáncer HLA-A02<sup>+</sup>, con el péptido o derivado peptídico de la presente invención, de modo que el péptido o derivado peptídico se une a un HLA y se presenta sobre la superficie celular. De manera alternativa, en la célula anteriormente mencionada, puede introducirse un vector que codifica el péptido, de modo que se expresa el péptido o peptídico. La célula que tiene capacidad presentadora de antígeno puede ser, por ejemplo, una célula dendrítica. La célula dendrítica obtenida de un paciente puede prepararse a partir de las PBMC extraídas del paciente, separando las células adheridas a una placa de cultivo y después incubando durante una semana las células separadas en presencia de IL-4 y GM-CSF. La célula presentadora de antígeno, preparada por el método de la presente divulgación, puede inducir una CTL que reconoce específicamente un complejo entre un péptido o peptídico de la presente invención y un HLA presentado sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno. Cuando la célula presentadora de antígeno de la invención se administra a un paciente con cáncer HLA-A02<sup>+</sup>, se puede inducir una CTL reactiva a tumor en el cuerpo del paciente.

#### Otros

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido, la molécula de ácido nucleico o el vector de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer. En el presente documento también se divulga un método para tratar o prevenir tumores, que comprende la administración del péptido, derivado peptídico o vector de la invención, a un sujeto que lo necesite. Además, la presente invención también proporciona el uso del péptido, del peptídico o del vector de la presente invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de tumores.

#### **Ejemplo**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

#### **<Ejemplo 1>** Descubrimiento de un epítipo directo

Se considera que una célula T citotóxica (CTL) obtenida de una vacuna contra el cáncer, reconoce un complejo de una molécula de HLA-A02 expresada sobre la superficie de células tumorales y péptidos, y ataca al complejo. Así, las proteínas, a partir de las cuales se obtienen los péptidos, pueden ser antígenos cancerígenos. En vista de esto, se llevó a cabo una búsqueda de los péptidos de la secuencia de PSF1 capaces de unirse a las moléculas de HLA-A02 de las células tumorales, para así estimar la posibilidad de que la PSF1 se convierta en antígenos cancerígenos.

#### (Método)

Se llevó a cabo un método de descubrimiento del epítipo directo en condiciones relacionadas con un informe conocido (Hawkins *et al. J. Proteome. Res.*: 7, 1445-1457, 2008).

#### Organización del vector de HLA soluble y producción de una línea celular estable

Un vector de expresión al que se unió una secuencia de marcador CII (colágeno de tipo II) a genes que codificaban una región de proteínas extracelular de una secuencia de HLA-A02 humano, se organizó e introdujo en una cepa de carcinoma de mama humano (MDA-MB-231, ATCC), produciendo así una línea celular estable.

#### Purificación e identificación del péptido epitópico de PSF1

Se recogió un medio condicionado de células o células obtenidas por la expresión forzada transitoria de PSF1 humana, y la molécula de HLA-A02 expresada se purificó con una columna de anticuerpo del marcador anti-CII (véase Publicación internacional Gazette WO2011/034128). La columna de anticuerpo del marcador anti-CII se lavó con un tampón de NaCl 150 mM/Tris 20 mM y con un tampón de NaCl 400 mM/Tris 20 mM, y después los péptidos que se unían a las moléculas de HLA-A02 se extrajeron con ácido acético al 10 %. Los péptidos extraídos se

ultrafiltraron con Amicon Ultra 10K (Millipore Co.) y se fraccionaron con SCX (GL Sciences Inc.). Cada fracción se sometió a purificación de péptidos con una columna C18 (GL Sciences Inc.) y después a concentración centrífuga con un Speed Vac. Una muestra sometida a la concentración centrífuga se disolvió de nuevo en TFA al 0,1 %/acetonitrilo al 2 %, se midió con LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc.) y después se buscó la secuencia peptídica obtenida de PSF1 con un algoritmo MASCOT (Matrix Science Ltd.).

(Resultados)

Se hallaron cinco péptidos que tenían la misma secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) que la de la PSF1. La tabla 1 muestra los resultados. Se recogió un complejo peptídico de la molécula HLA-A02 a partir de células tumorales que incluían los péptidos de PSF1, y así, se halló la posibilidad de que la PSF1 sirviera como antígeno cancerígeno. Algunos péptidos identificados mostraron la regla de unión al HLA-A02 (*Nature* (1991) 351 290-296), y así, se supuso que estos péptidos tenían una actividad de inducción de CTL como péptidos de vacuna contra el cáncer.

[Tabla 1]

Número de aminoácido inicial	Secuencia peptídica
21	LPAFNEDGLRQV
35	EMKALYEQN
79	YLYDRLLRI
88	RALRWEYGSVLPN
130	GDEGLDITQDMKP

#### <Ejemplo 2> Predicción informática

En el ejemplo 1, se confirmó que la PSF1 eran antígenos cancerígenos y se identificaron varios péptidos de interés para la vacuna contra el cáncer. Por otro lado, en inmunología inversa, los péptidos que pueden unirse a las moléculas de HLA-A02 se obtienen utilizando un *software* (Immunology and Cell Biology (2006) 84, 318-330). Por lo tanto, para obtener los péptidos de PSF1 en cuestión, exceptuando los hallados en el Ejemplo 1, se llevó a cabo una búsqueda mediante *software*.

(Método)

Los péptidos que pueden unirse a las moléculas de HLA-A02 se predijeron utilizando tres tipos de *software*:

NetMHC <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>;

BIMAS [http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/); y

SYFPEITHI <http://www.syfpeithi.de/>.

Se introdujo una secuencia de aminoácidos de longitud completa de PSF1 en estos tipos de *software* y se obtuvieron puntuaciones de unión en relación con los péptidos de 9 meros y 10 meros.

(Resultados)

Se obtuvieron varios péptidos con puntuaciones altas para los péptidos de 9 meros y 10 meros obtenidos de la PSF1 de longitud completa. La tabla 2 muestra las puntuaciones obtenidas al utilizar SYFPEITHI. La tabla 2 sugiere la posibilidad de que estos péptidos se unan a moléculas de HLA-A02.

[Tabla 2]

Número de aminoácido inicial	Secuencia (9 meros)	Puntuación de SYFPEITHI	Número de aminoácido inicial	Secuencia (10 meros)	Puntuación de SYFPEITHI
5	KAMELIREL	25	38	ALYEQNQDSV	25
8	ELIRELHRA	18	68	SLLRNRRTV	26
31	QVLEEMKAL	18	78	AYLYDRLLRI	16
35	EMKALYEQN	5	79	YLYDRLLRIR	18
69	LLRNRRTV	24	88	RALRWEYGSV	
79	YLYDRLLRI	27	89	ALRWEYGSVL	22
89	ALRWEYGSV	24	97	VLPNALRFHM	15
120	SLATYMRSLS	27	127	SLGGDEGLDI	23
145	SLEYVRCL	27	152	CLKDYGEFEV	22

Número de aminoácido inicial	Secuencia (9 meros)	Puntuación de SYFPEITHI	Número de aminoácido inicial	Secuencia (10 meros)	Puntuación de SYFPEITHI
159	FEVDDGTSV	14	176	FLPRWKCEQL	21

### <Ejemplo 3> Ensayo de inducción de CTL de ratón (ensayo ELISPOT)

5 Se determinó si los péptidos de PSF1 obtenidos por los Ejemplos anteriores inducían la CTL específica de péptido a través del HLA-A02.

(Método)

#### Inmunización con péptidos y recogida de células respondedoras

10 La actividad de inducción de CTL de ratón con péptidos se determinó utilizando modelos inmunitarios de ratón. En cuanto a los ratones, CB6F1-Tg (HLA-A02 01/H2-Kb)A02 01 se adquirieron en Taconic Biosciences, Inc. Como máximo, se mezclaron cinco tipos de soluciones de péptidos disueltas en DMSO para producir una solución de PBS, y la solución de PBS se mezcló junto con la misma cantidad de MONTAN IDE ISA 51VG (SEPPIC), produciendo así  
15 una solución de antígeno en emulsión. A continuación, se utilizaron 50 µl de solución de antígeno para inyección hipodérmica en cada uno de los dos sitios a ambos lados del vientre de los ratones (50 µg de péptido/ratón, N=3-4). Dos semanas después de la inyección, se extirpó el bazo y se recogieron esplenocitos de los cuales se habían eliminado los eritrocitos con una solución (BD Pharm Lyse™, Becton, Dickinson and Company) como células  
20 respondedoras para un ensayo ELISPOT.

#### Producción de células estimuladoras

25 Las células T2 (ATCC) de las células estimuladoras para su uso en el ensayo ELISPOT se produjeron por incubación, durante una noche, en un medio de cultivo AIM-V complementado con péptidos de ensayo inmunizados (30 µg/ml) o con péptidos de control negativo (ELAGIGILTV).

#### Ensayo ELISPOT

30 El ensayo ELISPOT se llevó a cabo detectando IFN-γ producido a partir de células respondedoras. El procedimiento del mismo se siguió según el documento adjunto incluido en el kit de ensayo ELISpot<sup>PLUS</sup> de IFN-γ de ratón (MABTECH). La preincubación para la producción de IFN-γ se llevó a cabo añadiendo células a una placa de 96 pocillos incluida en el kit de ensayo. Las células estimuladoras se inocularon en un pocillo doble o pocillo simple de  $5 \times 10^4$  células/100 µl/pocillo, y después, se añadieron las células respondedoras a  $2 \times 10^6$  células/100 µl/pocillo. Tras una noche de cocultivo, se extrajeron las células y se lavó el pocillo, y después se incluyeron los anticuerpos  
35 primarios (anticuerpos anti IFN-γ de ratón biotinilados) en el kit de ensayo. Después de su reacción durante dos horas a temperatura ambiente, se lavó el pocillo, complementado con anticuerpos secundarios (estreptavidina-ALP) y se sometieron a reacción durante una hora a temperatura ambiente. Tras haber sido lavadas lo suficiente, las células se complementaron con una solución de sustrato y se dejaron durante un minuto a temperatura ambiente. Para terminar la reacción de coloración, la placa se lavó lo suficiente con agua corriente y se secó al aire.  
40

#### Medición del número de puntos y método de medición

45 El número de puntos azules observado en el fondo del pocillo se midió con un analizador ImmunoSpot (R) S5 Verse Analyzer (Cellular Technology Limited). Los valores de medición de los puntos que no estaban claros debido a su amplio abanico de coloración no se utilizaron. Se obtuvo un valor promedio del pocillo doble y se calculó la diferencia del control negativo para obtener el número de puntos específico de los péptidos. El valor promedio y el valor de DT se calcularon utilizando los valores de los ratones individuales, y el caso que presentaba un número positivo de diferencia entre el valor promedio y el valor de DT se determinó como positivo.

50 (Resultados)

55 Los puntos específicos de péptidos se observaron en los péptidos mostrados en la tabla 3, y se determinó que 10 de estos péptidos eran positivos. Dado que se indujeron CTL específicas por medio de péptidos obtenidos de PSF1, se confirmó que los péptidos se presentaron por HLA-A02 y se indujeron los péptidos obtenidos de PSF1 que reconocía CTL de ratón. A pesar de que los resultados se obtuvieron de un sistema inmunitario de ratón, la reacción se produce a través de HLA-A02, que es CMH humano, por lo que de este modo se plantea que existe la posibilidad de una inducción similar de CTL en humanos.

[Tabla 3]

Número de aminoácido inicial	Secuencia	Número de punto específico (Media±DT)	Número de aminoácido inicial	Secuencia	Número de punto específico (Media±DT)
9 meros			10 meros		
5	KAMELIREL	22±13	38	ALYEQNQDSV	30±15
31	QVLEEMKAL	7±7	68	SLLRNRCTV	1±2
35	EMKALYEQN	6±8	78	AYLYDRLLRI	23±21
69	LIRNRCTV	7±9	79	YLYDRLLRIR	165±17
79	YLYDRLLRI	80±18	97	VLPNALRFHM	127±41
120	SLATYMRSL	70±79	152	CLKDYGEFEV	53±28
145	SLYIEVRCL	43±24	176	FLPRWKCEQL	31±24
			>10 meros		
			21	LPAFNEDGLRQV	3±8
			88	RALRWEYGSVLPN	29±22
			130	GDEGLDITQDMKP	1±2

**<Ejemplo 4>** Ensayo de inducción de CTL humanas (ensayo ELISPOT)

- 5 Se determinó si los péptidos de PSF1 obtenidos en los ejemplos 1 y 2 inducían las CTL humanas específicas de péptido.

(Método)

- 10 Se llevó a cabo un ensayo de inducción de CTL humanas en condiciones relacionadas con un informe conocido (Harano *et al.*, *Int. J. Cancer*: 123, 2616-2625, 2008).

Recogida de células mononucleares de sangre periférica

- 15 La sangre periférica heparinizada de voluntarios sanos que presentaban HLA-A0201 se sometió a centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos, eliminando así el plasma. Los sedimentos celulares se complementaron con HBSS (-) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a los que se había añadido HEPES 5 mM (SIGMA), y se suspendieron recubriendo la suspensión sobre Ficoll-paquete PREMIUM (GE Healthcare, Ltd.). A continuación, Cuatrocientos g de la sustancia resultante se sometieron a centrifugación durante 40 minutos, y se extrajeron monocitos de sangre periférica (PBMC, siglas del inglés, *peripheral blood monocytes*) separados como capa intermedia.

Preparación de células CD14-positivas y células CD8-positivas

- 25 Las PBMC se complementaron con microperlas de CD14 (Miltenyi Biotec K. K.), y se hizo que reaccionaran a 4 °C durante 15 minutos. Las células se pasaron por columnas LS (Miltenyi Biotec K.K.), y las células CD14 positivas se obtuvieron utilizando un separador QuadroMACS (TM) (Miltenyi Biotec K.K.). El resto de las células se extrajeron y lavaron y después se complementaron con microperlas CD8 (Miltenyi Biotec K.K.) y se dejó que reaccionaran a 4 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso similar, obteniendo así células CD8-positivas. Las células CD14 positivas se sometieron a inducción por diferenciación de células dendríticas obtenidas de monocitos (CD-Mo) y las células CD8-positivas se congelaron temporalmente para almacenarlas.

Inducción por diferenciación de CD-Mo y producción de células presentadoras de péptido

- 35 Dado que las células CD8-positivas se sometieron dos veces a estimulación antigénica, en consecuencia, se produjeron dos veces células presentadoras de péptido. Las células CD14-positivas se diseminaron en dos placas RepCell (CellSeed Inc.) y se incubaron en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C con una solución de cultivo en la que se añadieron GM-CSF 100 ng/ml (R&D Systems) e IL-4 10 ng/ml (R&D Systems) a un medio de cultivo AIM-V (Invitrogen Corporation) que incluía antibiótico y suero.

- 40 La primera producción de células presentadoras de péptido se inició 5-7 días después del comienzo de la incubación. A una de las placas se añadió OK-432 0,1 KE/ml (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), y al día siguiente se recogieron las células y se inocularon en una placa de 96 pocillos con fondo en U. A continuación, se añadieron 20 µg/ml del péptido de ensayo de un tipo a cada mitad (48 pocillos) de la placa, y se incubaron durante un día a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 %, produciendo así células presentadoras de péptido. La segunda producción se realizó de manera similar en la otra placa 12-14 días tras el inicio de la incubación.

45

Inducción de CTL mediante estimulación antigénica utilizando células presentadoras de péptido y preparación de células respondedoras

5 En una placa de 96 pocillos se irradiaron con rayos X (30 Gy) las células presentadoras de péptido, y las células CD8-positivas congeladas almacenadas se añadieron a todos los pocillos, llevando a cabo así la primera estimulación antigénica. Como solución de cultivo, se utilizó una solución en la que se añadió IL-7 10 ng/ml (R&D Systems) a un medio de cultivo AIM-V que incluía antibiótico y suero. Tras su incubación durante siete días, las células incluidas en el sobrenadante se recogieron y cocultivaron con células presentadoras de péptido (tras la irradiación con rayos X), obtenidas por la segunda producción, llevando a cabo así la segunda estimulación antigénica en la placa de 96 pocillos. En este momento, se añadieron 20 U/ml de IL-2 (Shionogi & Co., Ltd.) a la solución de cultivo. Tras su incubación adicional durante siete días, las células del sobrenadante que incluía CTL, se recogieron y se lavaron con un medio de cultivo AIM-V que incluía antibiótico y suero, para disponer de una concentración de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/ml por pocillo, obteniendo así células respondedoras para un ensayo ELISPOT.

15 Producción de células estimuladoras

20 Para su uso en un ensayo ELISPOT, se produjeron células T2 de células estimuladoras, incubando las células durante una noche en un medio de cultivo AIM-V complementado con un péptido de ensayo (20 µg/ml). Como células estimuladoras de control negativo, solo se utilizaron células T2 (sin péptidos). Las células se irradiaron con rayos X (30 Gy) y se lavaron con un medio de cultivo AIM-V que incluía antibiótico y suero para disponer de una concentración de  $2 \times 10^5$  células/ml.

25 Ensayo ELISPOT

30 El ensayo ELISPOT se llevó a cabo detectando el IFN-γ producido a partir de las células respondedoras. El procedimiento del mismo se siguió según un documento adjunto de un kit de ensayo ELISpotPLUS de IFN-γ humano (MABTECH). Se añadieron células respondedoras en una cantidad de 100 µl/pocillo para cada 2 pocillos de una placa de 96 pocillos del kit de ensayo, y en cada pocillo se inocularon 100 µl/pocillo de células estimuladoras complementadas con péptidos de ensayo o células estimuladoras (sin péptidos) de un control negativo. Tras su incubación durante una noche, los pocillos se lavaron y las células se extrajeron de los pocillos, y se añadieron los anticuerpos anti-IFN-γ de marcación de ALP incluidos en el kit de ensayo. Tras la reacción a temperatura ambiente durante dos horas, las células se lavaron lo suficiente, se complementaron con una solución de sustrato y se dejaron a temperatura ambiente durante cinco minutos. Para terminar la reacción de coloración, la placa se lavó lo suficiente con agua corriente y se secó al aire.

35 Medición del número de puntos y método de medición

40 El número de puntos azules observado en el fondo del pocillo se midió con un analizador ImmunoSpot (R) S5 Verse Analyzer. En un pocillo que incluía las mismas células respondedoras, el número de puntos específicos de péptido se calculó restando el número de puntos generados por las células estimuladoras (sin péptidos) de un control negativo del número de puntos generados por las células estimuladoras con péptido añadido. Suponiendo que las células que mostraron una diferencia de 50 o más se definieron como positivas, los siguientes siete péptidos se determinaron como positivos en el análisis de una pluralidad de donantes.

45 (Resultados)

50 Se indujeron CTL humanas en las que fueron específicos los siete péptidos mostrados en la tabla 4. Dado que se indujeron CTL específicas por medio de péptidos obtenidos de PSF1, se descubrió que en los seres humanos hay péptidos obtenidos de PSF1 que reconocen las CTL. Esto sugiere la posibilidad de que estos péptidos de PSF1 puedan ser una vacuna contra el cáncer.

Resultados del ensayo ELISPOT

55 [Tabla 4]

Número de péptidos inicial	Secuencia	Número de donante positivo	Número de donante	Porcentaje positivo de donante
21	LPAFNEDGLRQV	0	7	0 %
35	EMKALYEQN	1	8	13 %
79	YLYDRLLRI	6	13	46 %
145	SLYIEVRCL	2	2	100 %
88	RALRWEYGSVLPN	1	8	13 %
88	RALRWEYGSV	3	5	60 %

Número de péptidos inicial	Secuencia	Número de donante positivo	Número de donante	Porcentaje positivo de donante
89	ALRWEYGSVL	2	2	100 %
89	ALRWEYGSV	2	5	40 %
130	GDEGLDITQDMKP	0	7	0 %

**<Ejemplo 5>** Ensayo de inducción de CTL humanas (ensayo de tetrámero)

5 Para confirmar la inducción de las CTL específicas del péptido de PSF1 con otro método, se llevó a cabo un ensayo de tetrámero.

(Método)

10 Producción de la línea de CTL

Las células que se había determinado que eran positivas en el ensayo ELISPOT anteriormente descrito seguían incubadas con una solución de cultivo en la que se añadieron 100 ng/ml de IL-15 (Miltenyi Biotec K.K.) a un medio de cultivo AIM-V que incluía antibiótico y suero.

15 Ensayo de tetrámero

Se produjo el tetrámero (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd: MBL) para los péptidos de PSF1 (YLYDRLLR). Se recogieron células de una línea de CTL, se tiñeron con anticuerpos marcadores anti-CD8 APC H7 y tetrámero (SK-1) (Becton, Dickinson and Company: BD), y se midieron con un FACS Aria (Becton, Dickinson and Company: BD). Se utilizaron dos tipos de líneas de CTL (0209-01 H2 y 0209-02 D2).

(Resultados)

25 Como se muestra en la Figura 1, dado que se observó una población celular que reaccionaba tanto con los anticuerpos anti-CD8 como con el tetrámero en cada línea de CTL, se descubrió que se produjeron líneas de CTL que reconocían los péptidos de PSF1. La observación de células positivas a tetrámero demostró directamente la presencia de CTL humanas específicas de péptido.

30 **<Ejemplo 6>** Ensayo citotóxico de CTL humanas

Para analizar si una línea de CTL presenta actividad de células agresoras, se llevó a cabo un ensayo citotóxico.

35 Específicamente, las condiciones del ensayo se establecieron en relación con un método descrito en un informe conocido (un ensayo nuevo basado en CFSE para determinar la susceptibilidad a la lisis por medio de células T citotóxicas de las células precursoras leucémicas dentro de una población de células diana heterogénea; Jedema I. *et al.*, *Blood* (2004)103, 2677-2682).

Producción de células diana

40 En cuanto a las células diana para su uso en el ensayo citotóxico, se añadió 1 µM de CellTracker (TM) Green CMFDA (diacetato de 5-clorometilfluoresceína) (Invitrogen Corp.) a las células T2, y se dejó que estas células reaccionaran entre sí a 37 °C durante 15 minutos. Las células T2 se marcaron con CMFDA, que es un marcador fluorescente, se lavaron con AIM-V, complementado con péptidos de ensayo (20 µg/ml), y se incubaron durante una noche. Como células diana de un control negativo, se utilizaron células T2 marcadas solo con un marcador fluorescente (sin adición de péptidos). Las células se lavaron con un medio de cultivo AIM-V que incluía antibiótico y suero para disponer de una concentración de  $5 \times 10^4$  células/ml.

Producción de células efectoras

50 En cuanto a las células efectoras para su uso en el ensayo citotóxico, se utilizaron tres tipos de líneas de CTL (0209-1 H2; YLYDRLLRI, 1004-1 P-13-1\_2; RALRWEYGSVLPN, y 1004-1 P-10-9\_1; ALRWEYGSVL) obtenidas por incubación después del ensayo ELISPOT anteriormente descrito. Las células se prepararon a concentraciones de 50, 15,  $5 \times 10^4$  células/ml tras lavarlas con AIM-V. La preparación se realizó con un medio de cultivo AIM-V que incluía antibiótico y suero.

55 Ensayo citotóxico

Las células diana (T, *target*) complementadas con péptidos utilizados en la inducción de CTL, o las células diana (T) de un control negativo complementado sin péptidos, se mezclaron con las células efectoras (E) a una proporción

celular (proporción E/T) de 10:1, 3:1 y 1:1, y se cocultivaron durante una noche. Inmediatamente antes de la medición con un MACS Quant (Miltenyi Biotec) o con un FACS Aria, se añadieron 0,1 µg/ml de DAPI para distinguir las células vivas de las células muertas mediante tinción. En un análisis, se obtuvo la proporción de células negativas a DAPI (células vivas) en las células diana marcadas con CMFDA, y el índice de supervivencia de las células diana se calculó utilizando condiciones de incubación (solo para células diana) donde el cocultivo con células efectoras no se realizó al 100 %.

(Resultados)

10 Como se muestra en la Figura 2, en el ensayo de cada una de las líneas de CTL, el índice de supervivencia de las células diana complementadas con péptidos fue inferior al de las células diana de control negativo (sin péptidos). Se descubrió que los tres tipos de líneas de CTL, inducidos por los péptidos, mostraron un reconocimiento específico de los péptidos así como efectos citotóxicos. Esto sugiere la posibilidad de que las células tumorales que presentan péptidos de PSF1 sobre las superficies celulares se vean dañadas por los péptidos de PSF1 que reconocen las CTL y así, sugiere que los péptidos de PSF1 puedan ser una vacuna contra el cáncer.

### Aplicabilidad industrial

20 La presente invención proporciona un péptido que induce CTL de manera significativa, un ADN que codifica dicho péptido, una composición farmacéutica que comprende dicho péptido y dicho ADN, y una vacuna contra el cáncer que utiliza dicho péptido y dicho ADN.

### LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> SHIONOGI&CO., LTD.

<120> Péptido obtenido de PSF1

30 <130> 13P00059

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1

<211> 196

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 1

ES 2 662 808 T3

Met Phe Cys Glu Lys Ala Met Glu Leu Ile Arg Glu Leu His Arg Ala  
 1 5 10 15

Pro Glu Gly Gln Leu Pro Ala Phe Asn Glu Asp Gly Leu Arg Gln Val  
 20 25 30

Leu Glu Glu Met Lys Ala Leu Tyr Glu Gln Asn Gln Ser Asp Val Asn  
 35 40 45

Glu Ala Lys Ser Gly Gly Arg Ser Asp Leu Ile Pro Thr Ile Lys Phe  
 50 55 60

Arg His Cys Ser Leu Leu Arg Asn Arg Arg Cys Thr Val Ala Tyr Leu  
 65 70 75 80

Tyr Asp Arg Leu Leu Arg Ile Arg Ala Leu Arg Trp Glu Tyr Gly Ser  
 85 90 95

Val Leu Pro Asn Ala Leu Arg Phe His Met Ala Ala Glu Glu Met Glu  
 100 105 110

Trp Phe Asn Asn Tyr Lys Arg Ser Leu Ala Thr Tyr Met Arg Ser Leu  
 115 120 125

Gly Gly Asp Glu Gly Leu Asp Ile Thr Gln Asp Met Lys Pro Pro Lys  
 130 135 140

Ser Leu Tyr Ile Glu Val Arg Cys Leu Lys Asp Tyr Gly Glu Phe Glu  
 145 150 155 160

Val Asp Asp Gly Thr Ser Val Leu Leu Lys Lys Asn Ser Gln His Phe  
 165 170 175

Leu Pro Arg Trp Lys Cys Glu Gln Leu Ile Arg Gln Gly Val Leu Glu  
 180 185 190

His Ile Leu Ser  
 195

5 <210> 2  
 <211> 595  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 2

ES 2 662 808 T3

atgttctgcg aaaaagccat ggaactgac cgcgagctgc atcgcgcgcc cgaagggcaa 60  
ctgcctgcct tcaacgagga tggactcaga caagttctgg aggagatgaa agctttgtat 120  
gaacaaaacc agtctgatgt gaatgaagca aagtcaggtg gacgaagtga tttgatacca 180  
actatcaaat ttcgacactg ttctctgtta agaaatcgac gctgcactgt agcatacctg 240  
tatgaccgct tgcttcggat cagagcactc agatgggaat atggtagcgt cttgccaaat 300  
gcattacgat ttcacatggc tgctgaagaa atggagtggg ttaataatta taaaagatct 360  
cttgctactt atatgaggtc actgggagga gatgaagggt tggacattac acaggatatg 420  
aaaccaccaa aaagcctata tattgaagtc cgggtgtctaa aagactatgg agaatttgaa 480  
gttgatgatg gcacttcagt cctattaata aaaaatagcc agcacttttt acctcgatgg 540  
aaatgtgagc agctgatcag acaaggagtc ctggagcaca tcctgtcatg accat 595

5 <210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> péptido

<400> 3

**Tyr Leu Tyr Asp Arg Leu Leu Arg Ile**  
1 5

15 <210> 4  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> péptido

<400> 4

25 **Arg Ala Leu Arg Trp Glu Tyr Gly Ser Val Leu Pro Asn**  
1 5 10

30 <210> 5  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> péptido

35 <400> 5

**Ala Leu Arg Trp Glu Tyr Gly Ser**  
1 5

40 <210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

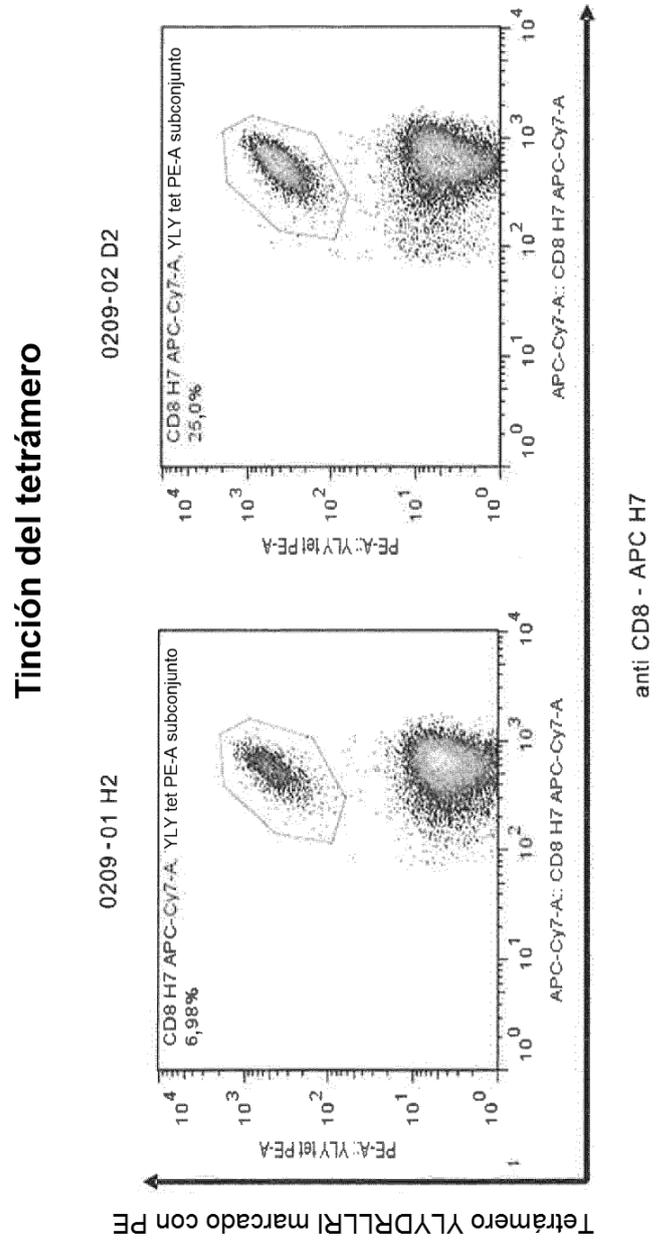
<220>



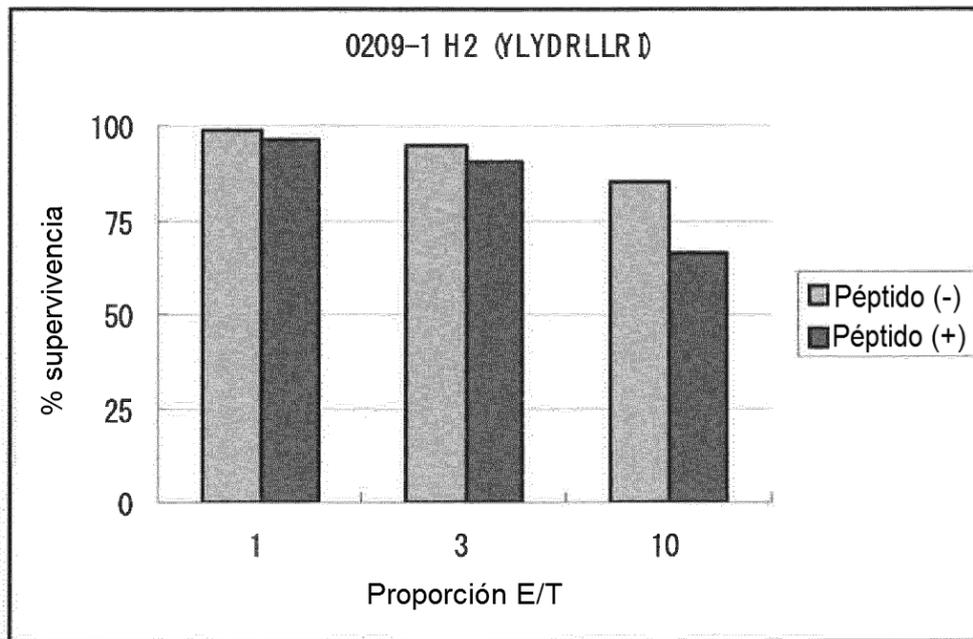
**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9.
- 5 2. Una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de la reivindicación 1.
3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2.
4. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico de  
10 la reivindicación 2 o el vector de la reivindicación 3.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento del cáncer.
6. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 5, en la que el cáncer es metastásico, resistente a  
15 quimioterapia o a radioterapia, o recurrente.

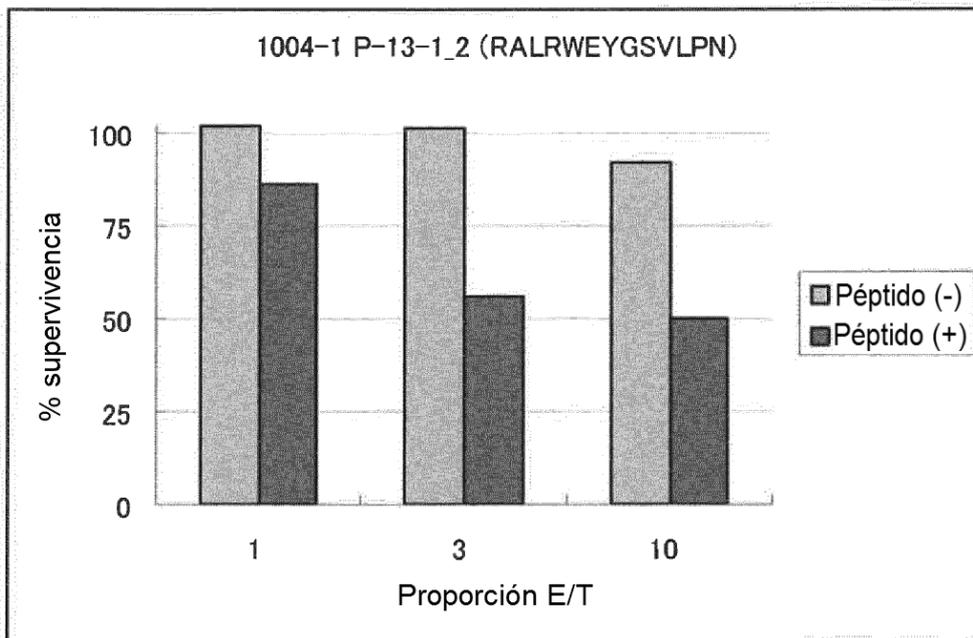
[Figura 1]



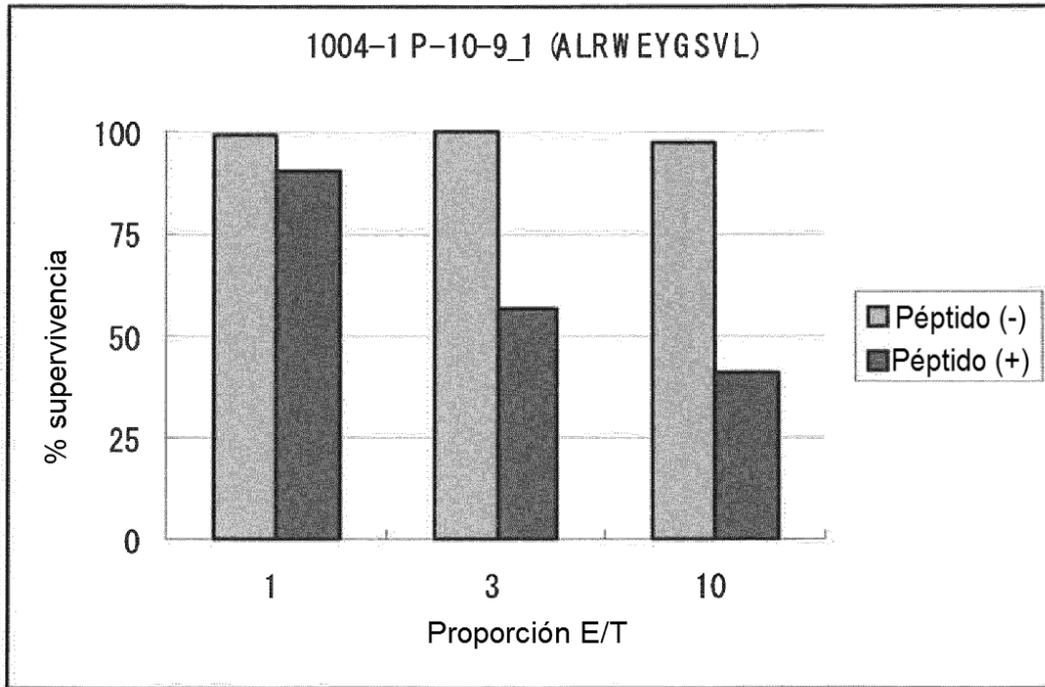
[Figura 2-1]



[Figura 2-2]



[Figura 2-3]



[Figura 3]

