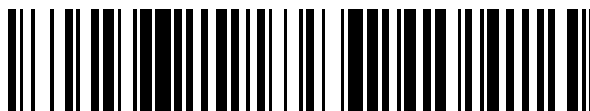


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 693**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014** **PCT/JP2014/001350**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14141683**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014** **E 14763683 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 2970944**

54 Título: **Péptidos KNTC2 y vacunas que los contienen**

30 Prioridad:

12.03.2013 US 201361777334 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
03.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TSUNODA, TAKUYA;
OSAWA, RYUJI;
YOSHIMURA, SACHIKO y
WATANABE, TOMOHISA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 739 693 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 KNTC2 y vacunas que los contienen.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere al campo de las ciencias biológicas, más concretamente al campo de la terapia contra el cáncer. En particular, la presente invención se refiere a nuevos péptidos que son eficaces como vacunas contra el cáncer, además de fármacos para el tratamiento y/o la profilaxis de tumores.

Técnica anterior

- 10 Se ha demostrado que los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8 positivos reconocen péptidos de epítomos derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) que se encuentran en la molécula de clase I del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), y luego destruyen las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia de antígenos de melanoma (MAGE) como el primer ejemplo de los TAA, se han descubierto muchos otros TAA, principalmente a través de planteamientos inmunológicos (NPL 1-2). Algunos de estos TAA están actualmente bajo desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas.

- 15 Los TAA favorables son indispensables para la proliferación y supervivencia de células cancerosas. El uso de dichos TAA como dianas para inmunoterapia puede minimizar el riesgo bien descrito de escape inmune de células cancerosas, atribuible a eliminación, mutación o reducción de los TAA como consecuencia de la selección inmune promovida terapéuticamente. Por consiguiente, la identificación de nuevos TAA capaces de inducir respuestas inmunes antitumorales potentes y específicas garantiza un mayor desarrollo. Por lo tanto, se encuentra en curso la aplicación clínica de estrategias de vacunación con péptidos para diversos tipos de cáncer (NPL 3-10). Hasta la
20 fecha, se han descrito varios ensayos clínicos que emplean estos péptidos derivados de TAA. Desafortunadamente, estos ensayos de vacunas contra el cáncer hasta el momento han producido solamente una baja tasa de respuesta objetiva (NPL 11-13). Por consiguiente, permanece la necesidad de nuevos TAA como dianas inmunoterapéuticas.

- 25 KNTC2, también conocido como "cinetocoro asociado a 2", HEC1 o NDC 80, es un miembro del complejo Ndc80 que está compuesto por dos subcomplejos de Ndc80 (KNTC2)-Nuf2 (CDCA1) y Spc24-Spc25 (NPL 14). Los sitios de unión del complejo CDCA1-KNTC2 dentro de la placa externa del cinetocoro generan fuerzas dependientes de microtúbulos para el movimiento de cromosomas y regulan el punto de control del ensamblaje del huso de las proteínas en el cinetocoro (NPL 15).

- 30 En el curso de aclarar el mecanismo molecular en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) mediante el análisis del perfil de expresión de todo el genoma usando micromatrices de ADNc que contienen 27.648, se descubrió que KNTC2 frecuentemente se expresa excesivamente en NSCLC (NPL 16, 17, 18, 19, 20). Los análisis de inmunotransferencia Northern blot revelaron que la transcripción de este gen se expresa altamente en tejidos de cáncer de pulmón pero no se expresa en tejidos normales, con la excepción de los testículos. Asimismo, se demostró que la inactivación subsiguiente de la expresión de KNTC2 con ARNip suprime significativamente el desarrollo de células NSCLC (NPL 21, PTL 1).

- 35 También se ha descrito que KNTC2 aumenta en tejidos de cáncer, como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos (PTL 2).

- 40 A su vez, los presentes inventores han identificado un péptido KNTC2 que puede unirse a HLA-A24 e inducir CTL, y que es útil para uso en una inmunoterapia dirigida a pacientes con HLA-A24 positivo (PTL 2). No obstante, si bien estos péptidos pueden ser adecuados para pacientes que expresan el subtipo HLA-A24, aún existe la necesidad de péptidos que induzcan CTL en pacientes que expresan otros tipos de antígenos HLA.

Lista de referencias

- 45 Bibliografía de patentes

[PTL 1] WO2007/013480

[PTL 2] WO2008/102557

Bibliografía no de patentes

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

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

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

- [NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999, 59(13): 3134-42
- [NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res 1999, 59(21): 5554-9
- [NPL 6] van der Burg SH et al., J Immunol 1996, 156(9): 3308-14
- [NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res 1997, 57(20): 4465-8
- 5 [NPL 8] Fujie T et al., Int J Cancer 1999, 80(2): 169-72
- [NPL 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999, 81(3): 459-66
- [NPL 10] Oiso M et al., Int J Cancer 1999, 81(3): 387-94
- [NPL 11] Belli F et al., J Clin Oncol 2002, 20(20): 4169-80
- [NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002, 188: 33-42
- 10 [NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004, 10(9): 909-15
- [NPL 14] Ciferri C, et al. J Biol Chem 2005; 280: 29088-95
- [NPL 15] Wigge P.A, et al. J Cell Biol. 2001; 152: 349-60
- [NPL 16] Kikuchi T, et al., Oncogene. 2003; 22:2192-205
- [NPL 17] Suzuki C, et al., Cancer Res. 2003; 63:7038-41
- 15 [NPL 18] Kakiuchi S, et al., Mol Cancer Res. 2003; 1:485-99
- [NPL 19] Zembutsu H, et al., Int J. Oncol. 2003; 23:29-39
- [NPL 20] Kakiuchi S, et al., Hum Mol Genet. 2004; 13:3029-43
- [NPL 21] Hayama S, et al. Cancer Res. 2006 Nov 1;66(21):10339-48

Compendio de la invención

- 20 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de nuevos péptidos que pueden servir como dianas adecuadas de inmunoterapia. Puesto que los TAA en general son percibidos por el sistema inmune como "auto" y por lo tanto a menudo no tienen inmunogenicidad innata, es importante el descubrimiento de dianas apropiadas. En el curso de la presente invención, se demuestra que KNTC2 (una secuencia de aminoácidos típica que se muestra en la SEQ ID NO: 79; una secuencia de nucleótidos típica que se muestra en la SEQ ID NO: 77
- 25 (núm. de acceso en GenBank NM_006101) o SEQ ID NO 78 (núm. de acceso en GenBank AF017790)) se expresa en forma excesiva específicamente en cáncer, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos. Por consiguiente, la presente invención se centra en KNTC2 como candidato diana para la inmunoterapia del cáncer/tumores.
- 30

Con ese fin, la presente invención se refiere, por lo menos en parte, a la identificación de péptidos de epítomos específicos que poseen la capacidad de inducir linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de KNTC2 entre péptidos derivados de KNTC2.

- 35 Los resultados descritos en este documento demuestran que los péptidos identificados son péptidos de epítomos restringidos a HLA-A2 que pueden inducir respuestas inmunes potentes y específicas contra células que expresan KNTC2.

- Por consiguiente, es un objeto de la presente invención dar a conocer péptidos derivados de KNTC2 que se puedan usar para inducir a los CTL *in vitro* o *ex vivo* en un modo restringido a HLA-A2, o que sean para uso en la inducción de respuestas inmunes *in vivo* contra distintos tipos de cáncer, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos en un sujeto.
- 40

- 45 Los péptidos de la presente invención tienen en general menos de 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud con una capacidad de inducir linfocito(s) T citotóxico (CTL), en donde los péptidos comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos en donde 1 o 2 aminoácidos se sustituyen y/o

añaden en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Los péptidos preferidos son nonapéptidos y decapeptidos.

La presente invención también contempla péptidos modificados que tienen una secuencia de aminoácidos en donde uno o dos aminoácidos se sustituyen y/o añaden a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, siempre que los péptidos modificados resultantes retengan la inducibilidad de CTL requerida del péptido no modificado original.

En una realización, cuando el péptido original es un 9-mer (aquel de la SEQ ID NO: 7), el tamaño del péptido modificado está en el intervalo de 9 a 11 aminoácidos, tal como en el intervalo de 9 a 20 aminoácidos, por ejemplo en el intervalo de 9 a 15 aminoácidos. También se describen en el contexto de la presente invención péptidos modificados, en donde cuando el péptido original es un 9-mer (p. ej., uno de SEQ ID NO: 2, 3, 7 y 17), el tamaño del péptido modificado puede estar en el intervalo de 9 a 11 aminoácidos, tal como en el intervalo de 9 a 20 aminoácidos, por ejemplo, en el intervalo de 9 a 15 aminoácidos. También se describen en el contexto de la presente invención péptidos modificados, en donde el péptido original es un 10-mer (p. ej., uno de SEQ ID NO: 41, 53 y 68), el tamaño del péptido modificado puede oscilar entre 10 y 40 aminoácidos, como en el intervalo de 10 a 20 aminoácidos, por ejemplo en el intervalo de 10 a 15 aminoácidos.

La presente invención abarca además polinucleótidos aislados que codifican uno cualquiera de los péptidos de la presente invención. Estos polinucleótidos se pueden usar en un método *in vitro* para inducir o preparar células presentadoras de antígenos (APC) que tienen la capacidad de inducir CTL(s). Como los péptidos de la presente invención, tal como las APC, se pueden emplear para uso en el tratamiento y/o la prevención de cáncer o tumores y/o la prevención de su recurrencia posoperatoria.

Cuando se administran a un sujeto, los péptidos de la presente invención se pueden presentar en la superficie de las APC como para inducir los CTL que se dirigen a los respectivos péptidos. En consecuencia, un objeto de la presente invención es dar a conocer agentes o composiciones que incluyen uno o más péptidos de la presente invención, o uno o más polinucleótidos que codifican dichos péptidos. La composición de la presente invención se puede usar para inducir un CTL y es por lo tanto para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un cáncer, y/o la prevención de una metástasis o su recurrencia posoperatoria. Los ejemplos de tipos de cáncer dirigidos contemplados por la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a ello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos.

La presente invención contempla además composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención. La composición farmacéutica preferiblemente se formula para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de cáncer, más particularmente un cáncer primario y/o la prevención de su recurrencia metastásica o posoperatoria. En lugar de o en adición a los péptidos o polinucleótidos de la presente invención, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir como ingredientes activos las APC o exosomas que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención.

Los péptidos o polinucleótidos de la presente invención se pueden usar en un método *in vitro* para inducir las APC que se presentan en la superficie de un complejo de antígeno de leucocitos humanos (HLA) y un péptido de la presente invención poniendo en contacto las APC derivadas de un sujeto con un péptido de la presente invención o introduciendo un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en las APC. Dichas APC tienen la capacidad de inducir los CTL que reconocen específicamente células que presentan péptidos diana en la superficie y por lo tanto son útiles en el contexto de la inmunoterapia del cáncer. Por consiguiente, la presente invención abarca los métodos *in vitro* para inducir las APC con inducibilidad de CTL además de las APC obtenidas por dichos métodos.

Además, la presente invención también abarca composiciones que inducen las APC que tienen la capacidad de inducir CTL, como composiciones que incluyen cualquiera de los péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

Es otro objeto de la presente invención dar a conocer métodos *in vitro* para inducir los CTL, como métodos que incluyen la etapa de co-cultivar células T CD8 positivas con las APC que presentan en su superficie un complejo de un antígeno de HLA y un péptido de la presente invención, la etapa de co-cultivar células T CD8 positivas con exosomas que presentan en su superficie un complejo de un antígeno de HLA y un péptido de la presente invención, o la etapa de introducir un polinucleótido que codifica ambas subunidades de los receptores de células T (TCR) o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades del TCR, en donde el TCR se puede unir a un complejo del péptido de la presente invención y un antígeno HLA presentado en la superficie celular. Los CTL obtenidos por dichos métodos pueden ser útiles en el tratamiento y/o la prevención de cáncer, que incluye, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos. Por consiguiente, la presente invención abarca métodos *in vitro* para inducir tanto los CTL como los CTL obtenidos por dichos métodos.

Incluso otro objeto de la presente invención consiste en proveer APC aisladas que presentan en la superficie un complejo de un antígeno de HLA y un péptido de la presente invención. La presente invención da a conocer además CTL que se dirigen a los péptidos de la presente invención. Dichos CTL pueden también definirse como CTL que reconocen (o se unen a) un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno de HLA en la superficie de la célula. Estas APC y CTL son útiles en el contexto de la inmunoterapia para el cáncer.

Es otro objeto de la presente invención dar a conocer una composición que incluye por lo menos un componente seleccionado entre (a) un péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica dicho péptido, (b) una APC o exosoma que presenta dicho péptido(s) y (c) un CTL que puede reconocer una célula que presenta un péptido de la presente invención en su superficie para uso en el tratamiento y/o la prevención de cáncer o tumores y/o la prevención de su recurrencia posoperatoria.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un péptido de la presente invención, un agente o composición que contiene dicho péptido para uso como medicamento.

La aplicabilidad de la presente invención se extiende a cáncer, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos.

Más específicamente, la presente invención da a conocer lo siguiente:

[1] Un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos con la capacidad de inducir linfocito(s) T citotóxico (CTL), en donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) o (b) siguientes:

(a) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

(b) una secuencia de aminoácidos en donde 1 o 2 aminoácido(s) se sustituyen y/o añaden en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7;

[2] El péptido de [1], en donde el péptido tiene una o ambas de las siguientes características: (a) el segundo aminoácido del término N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se sustituye con metionina; y (b) el aminoácido C terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se sustituye con valina o leucina;

[3] El péptido de [2], en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

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

[5] Una composición que comprende por lo menos un ingrediente activo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) el péptido según uno cualquiera de [1] a [3];

(b) el polinucleótido de [4];

(c) una célula presentadora de antígenos (APC) que presenta el péptido según uno cualquiera de [1] a [3] en su superficie;

(d) un exosoma que presenta el péptido de uno cualquiera de [1] a [3] en su superficie; y

(e) un CTL que se dirige al péptido de uno cualquiera de [1] a [3];

[6] Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de cáncer, y/o la prevención de su recurrencia posoperatoria, en donde la composición comprende por lo menos un ingrediente activo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) el péptido de uno cualquiera de [1] a [3];

(b) el polinucleótido de [4];

(c) una APC que presenta el péptido de uno cualquiera de [1] a [3] en su superficie;

(d) un exosoma que presenta el péptido de uno cualquiera de [1] a [3] en su superficie; y

(e) un CTL que puede reconocer una célula que presenta el péptido de uno cualquiera de [1] a [3];

[7] La composición farmacéutica para uso de acuerdo con [6], en donde la composición farmacéutica se formula para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2;

[8] Un método *in vitro* para inducir una APC que tiene la capacidad de inducir uno o más CTL, en donde el método comprende la etapa seleccionada del grupo que consiste en:

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

5 [9] Un método *in vitro* para inducir un CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

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

10 (b) co-cultivar una célula T CD8 positiva con un exosoma que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [3]; y

(c) introducir en una célula T CD8 positiva un polinucleótido que codifica ambas subunidades de los receptores de células T (TCR) o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades del TCR, en donde el TCR formado por dichas subunidades puede unirse a un complejo del péptido de uno cualquiera de [1] a [3] y un antígeno HLA en una superficie celular;

15 [10] Una APC aislada que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [3];

[11] La APC de [10], que es inducida por el método de [8];

[12] Un CTL aislado que se dirige al péptido de uno cualquiera de [1] a [3];

[13] El CTL de [12], que es inducido por el método de [9];

20 [14] El péptido de uno cualquiera de [1] a [3], o un polinucleótido que codifica el péptido para uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer o tumores, y/o la prevención de su recurrencia posoperatoria;

[15] Un anticuerpo o su fragmento inmunológicamente activo que se une específicamente al péptido de uno cualquiera de [1] a [3];

25 [16] Un método para estudiar un péptido que tiene la capacidad de inducir un CTL que tiene actividad citotóxica específica contra una célula que presenta un fragmento derivado de KNTC2, en donde el método comprende las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia candidata de una secuencia de aminoácidos modificada sustituyendo, eliminando, insertando y/o añadiendo uno, dos o varios residuos de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos original, en donde la secuencia de aminoácidos original es la SEQ ID NO:7;

30 (ii) seleccionar una secuencia candidata que no tiene homología (o identidad de secuencia) con los péptidos derivados de cualquiera de los productos génicos humanos conocidos distintos de KNTC2;

(iii) poner en contacto un péptido que consiste en la secuencia candidata seleccionada en la etapa (ii) con una célula presentadora de antígenos;

(iv) poner en contacto la célula presentadora de antígenos de la etapa (iii) con una célula T CD8 positiva; y

35 (v) identificar el péptido cuya capacidad de inducir uno o más CTL es la misma o mayor que la de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos original;

[17] Una composición farmacéutica que comprende un péptido de uno cualquiera de [1] a [3];

[18] Un péptido de uno cualquiera de [1] a [3] para uso como medicamento; y

[19] Un polinucleótido de [4] para uso como medicamento.

40 También se describe en el contexto de la presente invención:

[1] Un péptido aislado que tiene inducibilidad de linfocitos T citotóxicos (CTL), en donde el CTL inducido por el péptido tiene actividad citotóxica específica contra una célula que presenta un fragmento derivado de KNTC2, en donde además el péptido tiene una secuencia de aminoácidos de (a) o (b) siguientes:

(a) una secuencia de aminoácidos de un fragmento inmunológicamente activo de KNTC2;

45 (b) una secuencia de aminoácidos en donde 1, 2 o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden en una secuencia de aminoácidos de un fragmento inmunológicamente activo de KNTC2;

- [2] El péptido de [1], en donde el péptido posee una secuencia de aminoácidos de (a) o (b) siguientes: (a) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 y 68; (b) una secuencia de aminoácidos en donde 1, 2 o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 y 68;
- 5 [3] El péptido de [2], en donde el péptido tiene una o ambas de las siguientes características (a) el segundo aminoácido del término N es leucina o metionina; y (b) el aminoácido C terminal es valina o leucina;
- [4] El péptido de una cualquiera de [1] a [3], en donde el péptido es un nonapéptido o un decapeptido;
- [5] Un polinucleótido aislado que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];
- 10 [6] Una composición para inducir un CTL, en donde la composición incluye por lo menos un ingrediente activo seleccionado entre:
- (a) el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];
- (b) el polinucleótido de [5];
- (c) una célula presentadora de antígenos (APC) que presenta el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] en su superficie; y
- 15 (d) un exosoma que presenta el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] en su superficie;
- [7] Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un cáncer primario, y/o la prevención de su recurrencia metastásica o posoperatoria, o la inducción de una respuesta inmune contra dicho cáncer, en donde la composición incluye por lo menos un ingrediente activo seleccionado entre:
- (a) el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];
- 20 (b) el polinucleótido de [5];
- (c) una APC que presenta el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] en su superficie;
- (d) un exosoma que presenta el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] en su superficie; y
- (e) un CTL que puede reconocer una célula que presenta el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];
- 25 [8] La composición farmacéutica para uso según [7], en donde la composición farmacéutica se formula para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2;
- [9] Un método *in vitro* para inducir una APC que tiene la capacidad de inducir uno o más CTL, en donde el método incluye la etapa seleccionada entre:
- (a) poner en contacto una APC con el péptido de uno cualquiera de [1] a [4], y
- (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [4] en una APC;
- 30 [10] Un método *in vitro* para inducir un CTL, en donde el método incluye una etapa seleccionada entre:
- (a) co-cultivar una célula T CD8 positiva con una APC que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];
- (b) co-cultivar una célula T CD8 positiva con un exosoma que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [4]; y
- 35 (c) introducir en una célula T CD8 positiva un polinucleótido que codifica ambas subunidades del receptor de células T (TCR) o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades del TCR, en donde el TCR formado por dichas subunidades puede unirse a un complejo del péptido de uno cualquiera de [1] a [4] y un antígeno HLA en una superficie celular;
- [11] Una APC aislada que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];
- 40 [12] Una APC de [11] inducida por el método de [9];
- [13] Un CTL aislado que se dirige al péptido de uno cualquiera de [1] a [4];
- [14] Un CTL de [13] inducido por el método de [10];

[15] El péptido de uno cualquiera de [1] a [4], o un polinucleótido que codifica el péptido para uso en el tratamiento y/o la prevención de cáncer o tumores, y/o la prevención de su recurrencia posoperatoria;

[16] Un anticuerpo o su fragmento inmunológicamente activo que se une específicamente al péptido de uno cualquiera de [1] a [4];

5 [17] Un vector que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de uno cualquiera de [1] a [4];

[18] Una célula hospedante transformada o transfectada con un vector de [17];

[19] Un kit diagnóstico que incluye el péptido de uno cualquiera de [1] a [4], el polinucleótido de [5] o el anticuerpo o su fragmento inmunológicamente activo de [16];

10 [20] Un método para estudiar un péptido que tiene la capacidad de inducir un CTL que tiene actividad citotóxica específica contra una célula que presenta un fragmento derivado de KNTC2, en donde el método incluye las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia candidata que posee una secuencia de aminoácidos modificada sustituyendo, eliminando, insertando y/o añadiendo, uno dos o varios residuos de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos original, en donde la secuencia de aminoácidos original se selecciona entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 y 68;

15 (ii) seleccionar una secuencia candidata que no tiene homología significativa sustancial con los péptidos derivados de cualquiera de los productos génicos humanos conocidos distintos de KNTC2;

(iii) poner en contacto un péptido que tiene la secuencia candidata seleccionada en la etapa (ii) con una célula presentadora de antígenos;

(iv) poner en contacto la célula presentadora de antígenos (iii) con una célula T CD8 positiva; y

20 (v) identificar el péptido del cual la capacidad de inducir uno o más CTL es la misma o mayor que aquella de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos original;

[21] Una composición farmacéutica que incluye un péptido de uno cualquiera de [1] a [4];

[22] Un péptido de uno cualquiera de [1] a [4] para uso como medicamento; y

[23] Un polinucleótido de [5] o un vector de [17] para uso como medicamento.

25 Los objetos y características de la invención serán más obvios al leer la siguiente descripción detallada junto con las figuras anejas y los ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

30 Varios aspectos y aplicaciones de la presente invención serán obvios para el experto en la técnica después de considerar la breve descripción de las figuras y la descripción detallada de la presente invención y sus realizaciones preferidas a continuación.

La Figura 1 está compuesta por una serie de fotografías, (a) a (h), que representan los resultados del ensayo de inmunotransferencia unido a enzimas interferón (IFN)-gamma (ELISPOT) en los CTL que se indujeron con péptidos derivados de KNTC2. Los CTL en el pocillo número #8 inducidos con KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), en #4 con KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b), en #7 con KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c), en #5 con KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17) (d), en #3 con KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41) (e), en #2 con KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53) (f) y en #6 con KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68) (g) demostraron producción potente de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadrado en el pocillo de estos dibujos indica que las células del correspondiente pocillo fueron expandidas para establecer líneas de CTL. En contraste, como es típico de datos negativos, no se observó ninguna producción específica de IFN-gamma de los CTL estimulados con KNTC2-A02-9-330 (SEQ ID NO: 1) (h). En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ningún péptido.

La Figura 2 está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (a) a (c), que ilustran la producción de IFN-gamma de las líneas de CTL estimuladas con KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b) y KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c). La cantidad de IFN-gamma que produjeron los CTL se midió con el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de IFN-gamma (ELISA). Los resultados demuestran que las líneas de CTL establecidas por estimulación con cada péptido exhibieron producción potente de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ningún péptido. La relación R/S indica la relación del número de células respondedoras (línea de CTL) y células estimuladoras.

La Figura 3 muestra la producción de IFN-gamma de clones de CTL establecidos limitando la dilución de líneas de CTL estimuladas con KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b) y KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c). Los resultados demuestran que los clones de CTL establecidos por estimulación con cada péptido exhibieron producción potente de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" indica la producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma contra células diana no pulsadas con ningún péptido. La relación R/S indica la relación del número de células respondedoras (clon de CTL) y células estimuladoras.

La Figura 4 es un gráfico de líneas que ilustra la actividad de CTL específica de clones de CTL contra células diana que expresan KNTC2 y HLA-A*0201. Se prepararon como controles células COS7 transfectadas con HLA-A*0201 o el gen KNTC2 de longitud total. La línea de CTL establecida con KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) demostró actividad de CTL específica contra células COS7 transfectadas tanto con KNTC2 como con HLA-A*0201 (pastilla negra). Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica significativa contra células diana que expresan o bien HLA-A*0201 (triángulo) o KNTC2 (círculo).

Descripción de realizaciones

La terminología utilizada en la descripción tiene el propósito de describir versiones o realizaciones particulares solamente, y no tiene como fin limitar el alcance de la presente invención que estará limitado solamente por las reivindicaciones anejas.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos científico-técnicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende el experto en la técnica a la cual pertenece la presente invención. En caso de controversia, regirá la presente solicitud, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solamente y no tienen como fin ser limitativos.

I. Definiciones

Los términos "uno", "una", y "el", "la", tal como se emplean en la presente memoria, significan "por lo menos uno" a menos que se indique concretamente otra cosa.

Los términos "aislado" y "purificado" utilizados en relación con una sustancia (p. ej., péptido, anticuerpo, polinucleótido, etc.) indican que esa sustancia está sustancialmente libre de por lo menos otra sustancia que pueda estar incluida en la fuente natural. Por lo tanto, un péptido aislado o purificado se refiere a un péptido que está sustancialmente libre de material celular tal como carbohidrato, lípido u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente de tejido del cual deriva el péptido, o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un péptido en donde el péptido se separa de los componentes celulares de las células de las cuales se aísla o se produce en forma recombinante. Por lo tanto, un péptido sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de polipéptido que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en este documento "proteína contaminante"). Cuando el péptido se produce en forma recombinante, también está preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, lo que incluye preparaciones de péptido con medio de cultivo de menos de aproximadamente 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de péptido. Cuando el péptido se produce por síntesis química, está preferiblemente sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas, lo que incluye preparaciones de péptido con precursores químicos u otras sustancias químicas implicadas en la síntesis del péptido de menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) del volumen de la preparación de péptido. El hecho de que una preparación de péptido particular contiene un péptido aislado o purificado se puede demostrar, por ejemplo, por el aspecto de una sola banda que sigue a la electroforesis de dodecil sulfato sódico (SDS)-poliacrilamida de la preparación de proteína y tinción con azul de Coomassie brillante o similar del gel. En una realización preferida, los péptidos y polinucleótidos de la presente invención se aíslan o purifican.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos se pueden modificar, o residuos que no ocurren naturalmente, como los miméticos químicos artificiales del correspondiente aminoácido(s) natural, además de polímeros de aminoácidos naturales.

El término "oligopéptido" tal como se emplea en este documento, se refiere a un péptido compuesto por 20 residuos de aminoácidos o menos, típicamente 15 residuos de aminoácidos o menos. Tal como se emplea en esta memoria, el término "nonapéptido" se refiere a un péptido compuesto por 9 residuos de aminoácidos y el término "decapéptido" se refiere a un péptido compuesto por 10 residuos de aminoácidos.

El término "aminoácido" tal como se emplea en la presente invención se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, además de análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos pueden ser o bien L-aminoácidos o D-aminoácidos. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, además de aquellos modificados después de la traducción en células (p. ej., hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina). La expresión "análogo de aminoácido" se

refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica (un alfa carbono unido a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) como un aminoácido natural pero que tiene un grupo R modificado o un esqueleto modificado (p. ej., 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.

En la presente invención se puede hacer referencia a los aminoácidos o sus símbolos de tres letras conocidos o los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se utilizan de manera intercambiable en este documento y, a menos que se indique concretamente otra cosa, se hace referencia a ellos con sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Los términos "agente" y "composición" se usan de manera intercambiable en este documento para hacer referencia a un producto que incluye ingredientes especificados en cantidades especificadas, además de cualquier producto que resulte directa o indirectamente de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas. Dichos términos, cuando se usan en relación con el modificador "farmacéutico/a" (como en "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica") tienen como fin abarcar un producto que incluye el ingrediente(s) activo y el ingrediente(s) inerte que componen el vehículo, además de cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, la formación de complejo o la agregación de cualquiera de dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, las expresiones "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica" se refieren a cualquier producto preparado mezclando una molécula o compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

La expresión "ingrediente activo" en este documento se refiere a una sustancia en un agente o una composición que es biológica o fisiológicamente activa. Particularmente, en el contexto de agentes o composiciones farmacéuticas, la expresión "ingrediente activo" se refiere a una sustancia componente que demuestra un efecto farmacológico objetivo. Por ejemplo, en el caso de agentes o composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, los ingredientes activos en los agentes o las composiciones pueden provocar por lo menos una acción biológica o fisiológica en las células cancerosas y/o los tejidos directa o indirectamente. Preferiblemente, dicha acción puede incluir reducir o inhibir el desarrollo de células cancerosas, dañar o inactivar las células y/o los tejidos cancerosos, etc. Típicamente, los efectos indirectos de los ingredientes activos son inducciones de los CTL que pueden reconocer o inactivar las células cancerosas. Antes de formularse, el "ingrediente activo" puede también denominarse "a granel", "sustancia de fármaco" o "producto técnico".

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo fisiológicamente aceptable", tal como se emplea en la presente memoria, significa un material, composición, sustancia o vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable, incluidos, entre otros, una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente y material de encapsulación.

En algunas realizaciones, los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención son particularmente útiles como vacunas. En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" (también denominado "composición inmunogénica") se refiere a un agente o una composición que tiene la función de mejorar, potenciar y/o inducir inmunidad antitumoral tras la inoculación en animales.

A menos que se defina algo distinto, el término "cáncer" hace referencia a tipos de cáncer o tumores que expresan en forma excesiva el gen KNTC2, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos.

A menos que se defina otra cosa, las expresiones "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" se usan de modo intercambiable en este documento y a menos que se indique específicamente otra cosa, se refieren a un subgrupo de linfocitos T capaces de reconocer células no propias (p. ej., células de tumores/cáncer, células infectadas con virus) e inducir la muerte de dichas células.

A menos que se defina otra cosa, el término "HLA-A2", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere en forma representativa a los subtipos, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 y HLA-A*0250.

A menos que se defina algo distinto, el término "kit", tal como se emplea en la presente memoria, se usa en referencia a una combinación de reactivos y otros materiales. Se contempla en este documento que el kit puede incluir micromatriz, chip, marcador, etc. No se pretende que el término "kit" se limite a una combinación particular de reactivos y/o materiales.

Tal como se emplea en la presente memoria, en el contexto de un sujeto o paciente, la frase "el antígeno HLA del sujeto (o del paciente) es HLA-A2" se refiere a que el sujeto o el paciente posee en forma homocigota o heterocigota el gen del antígeno HLA-A2, y el antígeno HLA-A2 se expresa en células del sujeto o paciente como un antígeno HLA.

En la medida en que los métodos y composiciones de la presente invención sean útiles en el contexto del "tratamiento" del cáncer, un tratamiento se considera "eficaz" si produce un beneficio clínico tal como una reducción en tamaño, prevalencia o potencial metastásico de cáncer en un sujeto, prolongación del tiempo de supervivencia, supresión de recurrencia metastásica o posoperatoria, etc. Cuando el tratamiento se aplica en forma profiláctica, "eficaz" significa que retrasa o previene que se forme el cáncer o previene o mitiga un síntoma clínico del cáncer. La eficacia se determina en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar el tipo de tumor particular.

En la medida en que los métodos y composiciones de la presente invención sean útiles en el contexto de la "prevención" y "profilaxis" del cáncer, dichos términos se utilizan de manera intercambiable en este documento para hacer referencia a cualquier actividad que reduzca la carga de morbilidad de la enfermedad. La prevención y la profilaxis pueden tener lugar en "niveles de prevención primario, secundario y terciario". Si bien la prevención y la profilaxis primarias evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles secundarios y terciarios de prevención y profilaxis abarcan actividades que apuntan a la prevención y la profilaxis del progreso de una enfermedad y la emergencia de síntomas, además de reducir el impacto negativo de una enfermedad ya consolidada restaurando la función y reduciendo las complicaciones asociadas a la enfermedad. Alternativamente, la prevención y la profilaxis pueden incluir una amplia gama de terapias profilácticas destinadas a mitigar la severidad de un trastorno particular, p. ej., reducir la proliferación y la metástasis de tumores.

En el contexto de la presente invención, el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer y/o la prevención de su recurrencia metastásica o posoperatoria incluyen cualquier actividad que produzca los siguientes eventos, tal como la extirpación quirúrgica de células cancerosas, la inhibición del desarrollo de células cancerosas, la involución o regresión de un tumor, la inducción de remisión y supresión de la aparición del cáncer, la regresión del tumor y la reducción o inhibición de metástasis, la supresión de recurrencia posoperatoria del cáncer y la prolongación del tiempo de supervivencia. El tratamiento eficaz y/o la profilaxis del cáncer reducen la mortalidad y mejoran el pronóstico de las personas con cáncer, reducen los niveles de marcadores tumorales en la sangre y mitigan síntomas detectables que acompañan al cáncer. Por ejemplo, la reducción o mejora de síntomas constituye tratar eficazmente y/o la profilaxis incluye 10%, 20%, 30% o más de reducción, o la estabilidad de la enfermedad.

En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere a inmunoglobulinas y sus fragmentos que son específicamente reactivos a una proteína designada o su péptido. Un anticuerpo puede incluir anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos condensados a otras proteínas o radiomarcas, y fragmentos de anticuerpos. Asimismo, un anticuerpo de la presente invención se usa en el sentido más amplio y concretamente abarca anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada. Un "anticuerpo" indica todas las clases (p. ej., IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).

A menos que se defina otra cosa, todos los términos científico-técnicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente el experto en la materia a la cual pertenece la presente invención.

II. Péptidos:

Los péptidos de la presente invención descritos en detalle en lo sucesivo se pueden denominar "péptido(s) KNTC2" o "polipéptido(s) KNTC2".

Para demostrar que los péptidos derivados de KNTC2 funcionan como un antígeno reconocido por los CTL, se analizaron los péptidos derivados de KNTC2 (SEQ ID NO: 79) para determinar si eran epítopos de antígenos restringidos por HLA-A2 que son alelos de HLA comúnmente encontrados (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994).

Los candidatos de péptidos de unión de HLA-A2 derivados de KNTC2 se identificaron en base a sus afinidades de unión a HLA-A2. Se identificaron los siguientes péptidos: SEQ ID NO: 2 a 76.

De lo anterior, los siguientes péptidos resultaron en el establecimiento exitoso de los CTL, después de la estimulación *in vitro* de células T por células dendríticas (DC) pulsadas (cargadas) con estos péptidos, los CTL se establecieron exitosamente usando cada uno de los siguientes péptidos: KNTC2-HLA-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2), KNTC2-HLA-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3), KNTC2-HLA-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7), KNTC2-HLA-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17), KNTC2-HLA-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41), KNTC2-HLA-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53) y KNTC2-HLA-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68).

Los CTL establecidos anteriores demostraron actividad de CTL específica potente contra células diana pulsadas con los respectivos péptidos. Estos resultados demuestran que KNTC2 es un antígeno reconocido por los CTL y que los péptidos anteriores son péptidos de epítomos de KNTC2 restringidos por HLA-A2; por lo tanto, dichos péptidos pueden ser eficaces en la inmunoterapia del cáncer a través de la inducción de citotoxicidad por los CTL para pacientes HLA-A2 positivos.

Dado que el gen KNTC2 se expresa en forma excesiva en células y tejidos cancerosos, incluidos por ejemplo aquellos de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos, y no se expresa en la mayoría de los órganos normales, representa una buena diana para la inmunoterapia. Por consiguiente, la presente invención da a conocer nonapéptidos (péptidos compuestos por nueve residuos de aminoácidos) y decapéptidos (péptidos compuestos por diez residuos de aminoácidos) correspondientes a epítomos reconocidos por CTL de KNTC2 como se define en las reivindicaciones. Alternativamente, la presente invención da a conocer péptidos aislados que pueden inducir los CTL, en donde el péptido está compuesto por un fragmento inmunológicamente activo de KNTC2 como se define en las reivindicaciones. La presente invención da a conocer péptidos que tienen un aminoácido de SEQ ID NO:7. También se describen en el contexto de la presente invención péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2, 3, 17, 41, 53 y 68. En realizaciones preferidas, los péptidos de la presente invención son nonapéptidos o decapéptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. También se describen en el contexto de la presente invención péptidos que son nonapéptidos o decapéptidos que incluyen un aminoácido seleccionado entre las SEQ ID NO: 2, 3, 17, 41, 53 y 68. Los ejemplos preferidos de los péptidos de la presente invención incluyen péptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. También se describen en el contexto de la presente invención péptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2, 3, 17, 41, 53 y 68.

Los péptidos de la presente invención, particularmente los nonapéptidos y decapéptidos de la presente invención, se pueden flanquear con residuos de aminoácidos adicionales, siempre y cuando el péptido resultante retenga su inducibilidad de CTL. Los residuos de 1 o 2 aminoácidos particulares adicionales pueden estar compuestos por cualquier clase de aminoácidos, siempre y cuando no obstaculicen la inducibilidad de los CTL del péptido original. Por ende, la presente invención abarca péptidos que tienen inducibilidad de CTL derivada de la SEQ ID NO: 7, en donde 1 o 2 aminoácido(s) se sustituyen y/o añaden. Dichos péptidos tienen menos de aproximadamente 15 aminoácidos. También se describen en el contexto de la presente invención péptidos que tienen inducibilidad de CTL, en particular péptidos derivados de KNTC2. Dichos péptidos tienen, por ejemplo, menos de aproximadamente 40 aminoácidos, a menudo menos de aproximadamente 20 aminoácidos y usualmente menos de aproximadamente 15 aminoácidos.

Se sabe en general que la modificación de uno, dos o varios aminoácidos en un péptido no influye en la función del péptido, y en algunos casos potencia la función deseada del péptido original. De hecho, se sabe que los péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos por una secuencia de aminoácidos en donde 1, 2 o varios residuos de aminoácidos han sido modificados (es decir, sustituidos, añadidos, eliminados y/o insertados) en comparación con una secuencia de referencia original) retienen la actividad biológica del péptido original (Mark et al., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 1982, 79: 6409-13). Por lo tanto, en una realización, los péptidos de la presente invención tienen tanto inducibilidad de CTL como secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, en donde uno o dos aminoácidos se añaden y/o sustituyen. En otros términos, los péptidos de la presente invención tienen inducibilidad de CTL y secuencia de aminoácidos en donde uno o dos aminoácidos se sustituyen y/o añaden en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, siempre que los péptidos modificados retengan la inducibilidad de los CTL del péptido de referencia original. También se describen en el contexto de la presente invención péptidos que tienen inducibilidad de CTL y una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 y 68, en donde uno, dos o incluso más aminoácidos se añaden y/o sustituyen. En otros términos, los péptidos descritos en el contexto de la presente invención tienen inducibilidad de CTL y una secuencia de aminoácidos en donde uno, dos o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 y 68, siempre que los péptidos modificados retengan la inducibilidad de los CTL del péptido de referencia original.

Los expertos en la técnica reconocerán que las modificaciones individuales (es decir, eliminaciones, inserciones, adiciones y/o sustituciones) a una secuencia de aminoácidos que alteran un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de toda la secuencia de aminoácidos tienden a resultar en la conservación de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original. Como tales, se denominan convencionalmente "sustituciones conservadoras" o "modificaciones conservadoras", en donde la alteración de una proteína resulta en una proteína con funciones similares a la proteína original. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen en la técnica. Los ejemplos de características de cadenas laterales de aminoácidos que son deseables para conservar incluyen, por ejemplo, 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

un grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene un átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene una base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene un compuesto aromático (H, F, Y, W). Además, los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que se aceptan en la técnica como sustituciones conservadoras unos de otros:

- 5 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);
- 10 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, p. ej., Creighton, Proteins 1984).

Dichos péptidos modificados en forma conservadora también se consideran péptidos de la presente invención. No obstante, los péptidos de la presente invención no se restringen a esto y pueden incluir modificaciones no conservadoras, siempre y cuando el péptido modificado resultante retenga la inducibilidad de los CTL requerida del péptido no modificado original. Asimismo, los péptidos modificados no deben incluir los péptidos inducibles de CTL derivados de variantes polimórficas, homólogos de interespecies y alelos de KNTC2.

Los residuos de aminoácidos se pueden sustituir y/o añadir a los péptidos de la presente invención para lograr una mayor afinidad de unión. Para retener la inducibilidad de los CTL requerida, el experto en la técnica preferiblemente modifica (es decir, elimina, inserta, añade y/o sustituye) solamente un pequeño número (por ejemplo, 1, 2 o varios) o un pequeño porcentaje de aminoácidos. En la presente invención, el término "varios" significa 5 aminoácidos o menos, por ejemplo, 4 o 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos que se ha de modificar puede ser, por ejemplo, 30% o menos, 20% o menos, 15% o menos y 10% o menos, por ejemplo 1 a 5%.

Cuando se usan en el contexto de la inmunoterapia del cáncer, los péptidos de la presente invención se pueden presentar en la superficie de una célula o exosoma como un complejo con un antígeno HLA. En consecuencia, es preferible seleccionar péptidos que no solamente induzcan los CTL sino que además posean gran afinidad de unión hacia el antígeno HLA. Con este fin, los péptidos se pueden modificar por sustitución y/o adición de uno o más residuos de aminoácidos para proporcionar un péptido modificado que tenga mejor afinidad de unión hacia el antígeno HLA. Además de los péptidos que se exhiben naturalmente, dado que ya se conoce la regularidad de las secuencias de péptidos exhibidas por unión a antígenos de HLA (Kubo RT et al., J Immunol 1994, 152: 3913-24; Rammensee HG et al., Immunogenetics 1995, 41: 178-228; Kondo et al., J Immunol 1994, 155: 4307-12; Falk K, et al., Nature. 1991 Mayo 23;351(6324):290-6.), se pueden introducir modificaciones basadas en dicha regularidad en los péptidos inmunogénicos de la presente invención.

Por ejemplo, los péptidos que poseen gran afinidad de unión hacia HLA-A2 tienden a tener el segundo aminoácido desde el término N sustituido con leucina o metionina y/o el aminoácido en el término C sustituido con valina o leucina. Por consiguiente, puede ser conveniente sustituir el segundo aminoácido desde el término N con leucina o metionina, y/o el aminoácido en el término C con valina o leucina con el fin de aumentar la afinidad de unión de HLA-A2. Por lo tanto, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, en donde el segundo aminoácido desde el término N de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO está sustituido con leucina o metionina, y/o donde el término C de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO está sustituido con valina o leucina se incluyen en la presente invención. También se describen en el contexto de la presente invención péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2, 3, 17, 41, 53 y 68, en donde el segundo aminoácido desde el término N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con leucina o metionina, y/o donde el término C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con valina o leucina. Además, la presente invención abarca los péptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos en donde uno o dos aminoácidos se sustituyen y/o añaden en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, en donde dichos péptidos tienen una o ambas de las siguientes características de (a) el segundo aminoácido desde el término N es leucina o metionina; y (b) el aminoácido C-terminal es valina o leucina. En realizaciones preferidas, los péptidos de la presente invención incluyen una secuencia de aminoácidos en donde el segundo aminoácido desde el término N está sustituido con leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal está sustituido con valina o leucina en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7. También se describen en el contexto de la presente invención péptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos en donde uno, dos o varios aminoácidos se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 y 68, en donde dichos péptidos tienen una o ambas de las siguientes características de (a) el segundo aminoácido desde el término N es leucina o metionina; y (b) el aminoácido C-terminal es valina o leucina. Además, los péptidos descritos en el contexto de la presente invención incluyen una secuencia de aminoácidos en donde el segundo aminoácido

desde el término N se sustituye con leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal se sustituye con valina o leucina en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 y 68.

Las sustituciones se pueden introducir no solamente en los aminoácidos terminales sino también en las posiciones de sitios de reconocimiento de péptidos de los receptores de células T (TCR) potenciales. Varios estudios han demostrado que un péptido con sustituciones de aminoácidos puede tener función equivalente o mejor que aquel del original, por ejemplo, CAP1, p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎, Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ o gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002);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 invención también contempla que la adición de 1 o 2 aminoácidos también puede añadirse al término N y/o C de los péptidos de la presente invención. Dichos péptidos modificados que retienen la inducibilidad de los CTL también se incluyen en la presente invención.

Por ejemplo, la presente invención da a conocer un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud, que tiene una capacidad de inducir los CTL y una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) una secuencia de aminoácidos en donde 1 o 2 aminoácidos se modifican en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7,

(ii) la secuencia de aminoácidos de (i), en donde la secuencia de aminoácidos tiene una o ambas de las siguientes características: (a) el segundo aminoácido desde el término N de dicha SEQ ID NO es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina y metionina; y (b) el aminoácido C-terminal de dicha SEQ ID NO es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina y leucina.

También se describe en el contexto de la presente invención un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud, que tiene la capacidad de inducir uno o más CTL y una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) una secuencia de aminoácidos en donde 1, 2 o varios aminoácidos se modifican en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 3 y 17,

(ii) la secuencia de aminoácidos de (i), en donde la secuencia de aminoácidos tiene una o ambas de las siguientes características: (a) el segundo aminoácido desde el término N de dicha SEQ ID NO es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina y metionina; y (b) el aminoácido C-terminal de dicha SEQ ID NO es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina y leucina.

También se describe en el contexto de la presente invención un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12 u 11 aminoácidos de longitud, que tiene inducibilidad de CTL y una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i') una secuencia de aminoácidos en donde 1, 2 o varios aminoácidos se modifican en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 41, 53 y 68, (ii') la secuencia de aminoácidos de (i'), en donde la secuencia de aminoácidos tiene una o ambas de las siguientes características: (a) el segundo aminoácido desde el término N de dichas SEQ ID NO es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina y metionina; y (b) el aminoácido C-terminal de dicha SEQ ID NO es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina y leucina.

Estos péptidos se procesan en una APC para presentar un péptido seleccionado del grupo que consiste en (i) a (ii) y (i') a (ii'), cuando estos péptidos se ponen en contacto con, o se introducen en la APC.

No obstante, cuando la secuencia del péptido es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, se pueden inducir efectos colaterales negativos tales como trastornos autoinmunes y/o síntomas alérgicos contra sustancias específicas. Por consiguiente, puede ser conveniente llevar a cabo primero búsquedas de homología usando bases de datos disponibles para evitar situaciones en las que la secuencia del péptido se corresponda con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando esté claro a partir de las búsquedas de homología que no existe en la naturaleza ningún péptido idéntico a o que tenga solamente 1 o 2 diferencias de aminoácidos en comparación con el péptido objetivo, el péptido objetivo podrá modificarse con el fin de incrementar su afinidad de unión con los antígenos HLA y/o incrementar su inducibilidad de CTL sin ningún riesgo de dichos efectos colaterales.

Si bien se espera que los péptidos que tienen gran afinidad hacia los antígenos HLA sean muy eficaces, los péptidos candidatos, que se seleccionan de acuerdo con la presencia de gran afinidad de unión como un indicador, se examinan además por la presencia de inductibilidad de CTL. En este documento, la expresión "inductibilidad de CTL" indica la capacidad de un péptido de inducir un linfocito T citotóxico (CTL) cuando se presenta en una célula presentadora de antígenos (APC). A su vez, "inductibilidad de CTL" incluye la capacidad de un péptido de inducir la

activación de los CTL, la proliferación de los CTL, de promover la lisis de células diana por un CTL y de aumentar la producción de IFN-gamma por un CTL.

La confirmación de inductibilidad de CTL se logra induciendo las APC que portan antígenos MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DC)), o más concretamente DC derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana, y después de la estimulación de las APC con péptidos de ensayo, mezclando las APC con células T CD8 positivas para inducir los CTL, y luego midiendo el IFN-gamma contra las células diana producidas y liberadas por los CTL. Como el sistema de reacción, se pueden usar animales transgénicos producidos para expresar un antígeno HLA humano (por ejemplo, aquellos descritos en BenMohamed L, et al., Hum Immunol 2000, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA-A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response). Alternativamente, las células diana se pueden radiomarcarse con ⁵¹Cr, y la actividad citotóxica de los CTL se puede calcular a partir de la radiactividad liberada de las células diana. Alternativamente, la inductibilidad de los CTL se puede evaluar midiendo el IFN-gamma producido y liberado por los CTL en presencia de células que portan péptidos inmovilizados, y visualizando la zona de inhibición en el medio usando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

Además de las modificaciones anteriormente descritas, los péptidos de la presente invención se pueden enlazar a otros péptidos, siempre y cuando el péptido enlazado resultante retenga la inductibilidad de los CTL requerida del péptido original, y más preferiblemente también retenga su actividad de unión a HLA requerida. Los ejemplos de "otros" péptidos adecuados incluyen: los péptidos de la presente invención o los péptidos inducibles de CTL derivados de otros TAA. El péptido de la presente invención se puede enlazar a uno o más de "otros" péptidos o bien directa o indirectamente a través de un enlazador. Los enlazadores entre los péptidos se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (SEQ ID NO: 84) (R. P. M. Suttmüller et al., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) o K (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715).

Los péptidos enlazados anteriormente descritos se denominan en este documento "politopos", es decir, grupos de dos o más péptidos potencialmente estimulantes de respuesta inmunogénica o inmune que se pueden unir entre sí en diversas disposiciones (p. ej., concatenados, superpuestos). El politopo (o ácido nucleico que codifica el politopo) se puede administrar de acuerdo con un protocolo de inmunización estándar, p. ej., a animales, para ensayar la efectividad del politopo en estimular, potenciar y/o provocar una respuesta inmune.

Los péptidos se pueden unir entre sí o mediante el uso de secuencias flanqueantes para formar politopos, y el uso de politopos como vacunas se conoce en la técnica (véase, p. ej., Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci EE. UU. 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990). Se pueden preparar politopos que contengan varios números y combinaciones de epítomos, y ensayarse para reconocimiento por los CTL y para eficacia en aumentar una respuesta inmune.

Los péptidos de la presente invención pueden además enlazarse a otras sustancias, siempre y cuando el péptido enlazado resultante retenga la inductibilidad de los CTL requerida del péptido original. Los 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 la cadena lateral o fosforilación, etc., siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Estas clases de modificaciones se pueden efectuar para conferir funciones adicionales (p. ej., función de direccionamiento y función de administración) o para estabilizar el péptido.

Por ejemplo, para aumentar la estabilidad *in vivo* de un péptido, se conoce en la técnica la introducción de aminoácidos D, miméticos de aminoácidos o aminoácidos artificiales; este concepto puede también adaptarse a los péptidos de la presente invención. La estabilidad de un péptido se puede ensayar en un número de formas. Por ejemplo, se pueden usar peptidasas y varios medios biológicos, como plasma y suero humanos, para ensayar la estabilidad (ver, p. ej., Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

Asimismo, como se observó anteriormente, entre los péptidos modificados que son sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos por 1, 2 o varios residuos de aminoácidos, aquellos que tienen la misma o mayor actividad en comparación con los péptidos originales se pueden cribar o seleccionar. La presente invención, por lo tanto, también da a conocer el método de cribar péptidos modificados que tienen la misma o mayor actividad que los péptidos originales según se define en las reivindicaciones. Un método ilustrativo incluye las etapas de:

a: modificar (es decir, sustituir, eliminar, insertar y/o añadir) por lo menos un residuo de aminoácido de un péptido de la presente invención,

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

c: seleccionar el péptido que tiene la misma o mayor actividad que el péptido original.

En este documento, la actividad que se ha de ensayar puede incluir actividad de unión a MHC, inducibilidad de APC o CTL y actividad citotóxica. Preferiblemente, la actividad del péptido que se ha de ensayar es inducibilidad de CTL.

En realizaciones preferidas, la presente invención da a conocer un método para cribar un péptido que tiene la capacidad de inducir un CTL que tiene actividad citotóxica específica contra una célula que presenta un fragmento derivado de KNTC2, en donde el método incluye las etapas de:

(i) proporcionar una secuencia candidata que consiste en una secuencia de aminoácidos modificada sustituyendo, eliminando, insertando y/o añadiendo uno, dos o varios residuos de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos original, en donde la secuencia de aminoácidos original es la SEQ ID NO:7;

(ii) seleccionar una secuencia candidata que no tiene homología (o identidad de secuencia) con los péptidos derivados de cualquier producto génico humano conocido distinto de KNTC2;

(iii) poner en contacto un péptido que consiste en la secuencia candidata seleccionada en la etapa (ii) con una célula presentadora de antígenos;

(iv) poner en contacto la célula presentadora de antígenos de la etapa (iii) con una célula T CD8 positiva; y

(v) identificar el péptido cuya capacidad de inducir la inducibilidad de CTL es la misma o mayor que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos original.

Cuando los péptidos de la presente invención incluyen un residuo cisteína (p. ej., SEQ ID NO: 7), los péptidos tienden a formar dímeros mediante un enlace disulfuro entre los grupos SH de los residuos cisteína. Por consiguiente, la presente invención se extiende a dímeros de péptido que tienen la capacidad de inducir CTL. Se puede formar un dímero de péptido de la presente invención uniendo dos monómeros de péptido KNTC2 a través de un enlace disulfuro entre los residuos cisteína presentes en los monómeros o añadidos a estos. Cuando una secuencia de aminoácidos de cada péptido contiene un residuo cisteína (Cys), se puede formar un enlace disulfuro entre dichos residuos cisteína para formar el péptido oligomérico de la presente invención. Alternativamente, si una secuencia de aminoácidos propiamente dicha no tiene cisteína, se puede formar un enlace disulfuro entre los residuos cisteína que se añaden a dicha secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, un residuo(s) cisteína se puede introducir en cada péptido en uno o ambos de sus términos C y N para formar un enlace disulfuro. Asimismo, se pueden insertar también uno o más residuos cisteína dentro de la secuencia de aminoácidos de cada péptido.

III. Preparación de péptidos KNTC2

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar usando técnicas conocidas. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar en forma sintética, usando tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar individualmente o como péptidos más largos incluyendo dos o más péptidos. Los péptidos pueden luego aislarse, es decir, purificarse o aislarse como para estar sustancialmente libres de otras proteínas de células hospedantes naturales y sus fragmentos, o cualquier otra sustancia química.

Los péptidos de la presente invención pueden contener modificaciones, como glucosilación, oxidación de la cadena lateral o fosforilación, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Otras modificaciones ilustrativas incluyen la incorporación de uno o más aminoácidos D u otros miméticos de aminoácidos que se pueden emplear, por ejemplo, para incrementar la semivida en suero de los péptidos.

Los péptidos de la presente invención se pueden obtener a través de síntesis químicas basadas en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Por ejemplo, los métodos de síntesis de péptidos convencionales que se pueden adoptar para la síntesis incluyen:

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

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

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

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

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

(vi) WO99/67288; y

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

Alternativamente, los péptidos de la presente invención se pueden obtener adoptando cualquier método de modificación genética conocido para producir péptidos (p. ej., 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 forma expresable (p. ej., en dirección 3' de una secuencia reguladora correspondiente a una secuencia promotora) y se transforma en una célula hospedante adecuada. Dichos vectores y células hospedantes también se dan a conocer en la presente invención.

5 La célula hospedante se cultiva luego para producir el péptido de interés. El péptido también se puede producir *in vitro* adoptando un sistema de traducción *in vitro*.

Cuando los péptidos de la presente invención son dímeros de péptido, dichos dímeros se pueden preparar usando un método conocido en la técnica. Por ejemplo, si los monómeros de péptido incluyen un par de residuos cisteína, el dímero de péptido se puede preparar, por ejemplo, eliminando todos los grupos protectores incluidos aquellos en las cadenas laterales de cisteína, y luego sometiendo la disolución de monómero resultante a oxidación al aire bajo condiciones alcalinas, o añadiendo un oxidante bajo condiciones alcalinas o ácidas para formar un enlace disulfuro. Los ejemplos de los oxidantes incluyen yodo, dimetil sulfoxido (DMSO) y ferricianuro de potasio.

Los monómeros de péptido, incluidos dos o más residuos cisteína, pueden también prepararse por el método anteriormente descrito. En este caso, se obtienen isómeros que tienen diferentes tipos de enlaces disulfuro. Por otra parte, un dímero de péptido en el que se forma un enlace disulfuro entre residuos cisteína particulares se puede preparar seleccionando una combinación de grupos protectores para cadenas laterales de cisteína. Los ejemplos de las combinaciones de los grupos protectores incluyen combinaciones del grupo MeBzl (metilbencilo) y el grupo Acm (acetamidametil), el grupo Trt (trilito) y el grupo Acm, el grupo Npys (3-nitro-2-piridilito) y el grupo Acm, y del grupo S-Bu-t (S-terc-butilo) y del grupo Acm. Por ejemplo, en el caso de la combinación del grupo MeBzl y del grupo Acm, la preparación del dímero de péptido se puede llevar a cabo eliminando el grupo MeBzl y el grupo protector distinto de la cadena lateral de cisteína, sometiendo la disolución de monómero resultante a oxidación al aire para formar un enlace disulfuro entre los residuos cisteína desprotegidos, y luego desprotegiendo y oxidando mediante el uso de yodo para formar un enlace disulfuro entre los residuos cisteína previamente protegidos por Acm.

IV. Polinucleótidos:

La presente invención también da a conocer polinucleótidos que codifican cualquiera de los péptidos anteriormente mencionados de la presente invención. Estos incluyen polinucleótidos según se define en las reivindicaciones. También se describen en el contexto de la presente invención polinucleótidos derivados del gen KNTC2 natural (p. ej., núm. de acceso en GenBank NM_006101 (SEQ ID NO: 77) o AF017790 (SEQ ID NO: 78)) además de aquellos que tienen su secuencia de nucleótidos modificada en forma conservadora. En este documento, la expresión "secuencia de nucleótidos modificada en forma conservadora" 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 determinada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que se especifica una alanina mediante un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones del ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas en forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico de este documento que codifica un péptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. El experto en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina, y TGG, que es habitualmente el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por ende, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un péptido se describe en forma implícita en cada secuencia descrita.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden estar compuestos por ADN, ARN y sus derivados. Como se sabe en la técnica, un ADN está adecuadamente compuesto por bases tales como A, T, C y G, y T se reemplaza con U en un ARN. El experto en la técnica reconocerá que se pueden incluir también bases no naturales en los polipéptidos.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden codificar múltiples péptidos de la presente invención con o sin secuencias de aminoácidos intervinientes. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos interviniente puede proporcionar un sitio de escisión (p. ej., secuencia de reconocimiento de enzimas) del polinucleótido o los péptidos traducidos. Asimismo, un polinucleótido de la presente invención puede incluir cualquier secuencia adicional a la secuencia que codifica un péptido de la presente invención. Por ejemplo, un polinucleótido de la presente invención puede ser un polinucleótido recombinante que incluye secuencias reguladoras requeridas para la expresión del péptido, o puede ser un vector de expresión (plásmido) con un gen marcador, etc. En general, dichos polinucleótidos recombinantes se pueden preparar por la manipulación de polinucleótidos mediante técnicas recombinantes convencionales utilizando, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

Se pueden usar tanto técnicas de síntesis química como recombinante para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención se pueden producir por inserción en un vector apropiado, que se puede expresar cuando se transfecta en una célula competente. En forma alternativa, los polinucleótidos de la presente invención se pueden ampliar usando técnicas de PCR o expresión en hospedantes adecuados (ver, p. ej., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989). En forma alternativa, el polinucleótido de la presente invención se puede sintetizar empleando

las técnicas de fase sólida, como se describe en Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5.

V. Exosomas

- 5 La presente invención da a conocer además vesículas intracelulares llamadas exosomas que presentan complejos formados entre los péptidos de la presente invención y los antígenos HLA en su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, usando los métodos que se detallan en la publicación de patente japonesa núm. H11-510507 y en el documento WO99/03499, y se pueden preparar utilizando APC obtenidas de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención. Los exosomas de la presente invención se pueden inocular como vacunas, en un modo similar a los péptidos de la presente invención.
- 10 El tipo de antígenos HLA incluido en los complejos debe ser compatible con aquel del sujeto que requiere tratamiento y/o prevención. Por ejemplo, en la población japonesa, HLA-A2, particularmente HLA-A*0201 y HLA-A*0206, son prevalentes y por lo tanto serían apropiados para el tratamiento de pacientes japoneses. El uso del tipo HLA-A2 que frecuentemente se expresa entre la población japonesa y caucásica es favorable para obtener resultados eficaces, y los subtipos tales como HLA-A*0201 y HLA-A*0206 también resultan útiles. Típicamente, en el
- 15 escenario clínico, el tipo de antígeno HLA del paciente que necesita tratamiento se investiga por anticipado, lo que permite la selección apropiada de péptidos que tengan altos niveles de afinidad de unión hacia el antígeno particular, o que tengan inducibilidad de CTL por presentación de antígenos. Asimismo, con el fin de obtener péptidos que tengan gran afinidad de unión e inducibilidad de CTL, se puede efectuar la sustitución, inserción, eliminación y/o adición de 1, 2 o varios aminoácidos en base a la secuencia de aminoácidos del péptido parcial KNTC2 natural.
- 20 Cuando se usa el tipo HLA-A2 del antígeno HLA para el exosoma de la presente invención, los péptidos que tienen secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 son particularmente útiles.

En algunas realizaciones, los exosomas de la presente invención presentan un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA-A2 en su superficie.

VI. Células presentadoras de antígenos (APC):

- 25 La presente invención también da a conocer células presentadoras de antígenos (APC) aisladas que presentan complejos formados entre los antígenos HLA y los péptidos de la presente invención en su superficie. Las APC pueden derivar de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar como vacunas por sí mismas o combinadas con otros fármacos como los péptidos, exosomas o CTL de la presente invención.
- 30 Las APC no se limitan a una clase de células particular e incluyen células dendríticas (DC), células Langerhans, macrófagos, células B y células T activadas, que se conocen por presentar antígenos proteínicos en su superficie celular como para ser reconocidas por los linfocitos. Puesto que las DC son APC representativas que tienen la actividad inductora de CTL más fuerte entre las APC, las DC son adecuadas para las APC de la presente invención.
- 35 Por ejemplo, las APC de la presente invención se pueden obtener induciendo las DC de monocitos de sangre periférica y luego poniéndolas en contacto (estimulando) con los péptidos de la presente invención *in vitro* o *ex vivo*. Cuando los péptidos de la presente invención se administran a un sujeto, las APC que presentan los péptidos de la presente invención se inducen en el cuerpo del sujeto. En forma alternativa, las APC de la presente invención se pueden obtener poniendo en contacto las APC recogidas de un sujeto con un péptido de la presente invención.
- 40 Las APC de la presente invención se pueden administrar a un sujeto para inducir una respuesta inmune contra el cáncer en el sujeto por sí solas o combinadas con otros fármacos como los péptidos, exosomas o CTL de la presente invención. Por ejemplo, la administración *ex vivo* puede incluir las etapas de:
- a: recoger las APC de un primer sujeto,
- b: contactar las APC de la etapa a, con un péptido de la presente invención, y
- c: administrar las APC de la etapa b a un segundo sujeto.
- 45 El primer sujeto y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo, o pueden ser individuos distintos. Las APC obtenidas en la etapa b se pueden formular y administrar como una vacuna para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos, aunque sin limitarse a esto.
- 50 En el contexto de la presente invención, se pueden utilizar los péptidos de la presente invención para fabricar una composición farmacéutica capaz de inducir una APC. La presente invención también da a conocer un método o proceso para fabricar una composición farmacéutica para inducir una APC, en donde el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también da a conocer el uso de los péptidos de la presente invención para inducir las APC.

Según un aspecto de la presente invención, las APC de la presente invención tienen inducibilidad de CTL. En el contexto de las APC, la frase "inducibilidad de CTL" se refiere a la capacidad de una APC de inducir un CTL al entrar en contacto con una célula T CD8 positiva. A su vez, "inducibilidad de CTL" incluye la capacidad de una APC de inducir la activación de los CTL, la proliferación de CTL, de promover la lisis de una célula diana por un CTL y de aumentar la producción de IFN-gamma por un CTL. En particular, las APC de la presente invención poseen la capacidad de inducir los CTL específicos de KNTC2. Dichas APC que tienen inducibilidad de CTL se pueden preparar con un método que incluye la etapa de transferir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención a las APC *in vitro*, así como también el método anteriormente mencionado. El gen introducido puede tener la forma de forma de ADN o ARN. Los ejemplos de métodos para introducción incluyen, sin limitaciones particulares, varios métodos que se utilizan convencionalmente en este campo, como los métodos de lipofección, electroporación y fosfato de calcio. Más concretamente, se puede llevar a cabo como se describe en Reeves ME et al., Cancer Res 1996, 56: 5672-7; Butterfield LH et al., J Immunol 1998, 161: 5607-13; Boczkowski D et al., J Exp Med 1996, 184: 465-72; publicación de patente japonesa núm. 2000-509281. Al transferir el gen en las APC, el gen se somete a transcripción, traducción y similar en la célula, y luego la proteína obtenida se procesa por MHC Clase I o Clase II, y se procede a la vía de presentación para presentar péptidos parciales. En forma alternativa, las APC de la presente invención se pueden preparar por un método que incluye la etapa de simplemente poner en contacto las APC con un péptido de la presente invención.

En algunas realizaciones, las APC de la presente invención forman complejos del antígeno HLA-A2 y el péptido de la presente invención en su superficie.

VII. Linfocitos T citotóxicos (CTL):

Un CTL inducido contra uno cualquiera de los péptidos de la presente invención fortalece la respuesta inmune dirigida a las células cancerosas *in vivo* y por lo tanto se puede usar como vacunas, en un modo similar a los péptidos *per se*. Por lo tanto, la presente invención da a conocer CTL aislados que son específicamente inducidos o activados por uno cualquiera de los péptidos de la presente invención.

Dichos CTL se pueden obtener (1) poniendo en contacto (estimulando) las APC derivadas del sujeto y las células T CD8 positivas, o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con el péptido(s) de la presente invención, (2) contactando las células T CD8 positivas o los leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con las APC o los exosomas que presentan un complejo de un antígeno HLA y el péptido en su superficie o (3) introduciendo en una célula T CD8 positiva un polinucleótido que codifica las subunidades del receptor de células T (TCR) o los polinucleótidos que codifican cada una de las unidades del TCR, en donde el TCR formado por dichas subunidades puede unir un complejo de un péptido de la presente invención y antígeno HLA en una superficie celular. Dichas APC o exosomas se pueden preparar con los métodos anteriormente descritos. Los detalles del método de (3) se describen a continuación en la sección "VIII. T Cell Receptor (TCR)".

Los CTL de la presente invención pueden derivar de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar por sí solos o combinados con otros fármacos como los péptidos, APC o exosomas de la presente invención para los fines de regular los efectos. Los CTL obtenidos actúan específicamente contra las células diana que presentan los péptidos de la presente invención, por ejemplo, los mismos péptidos que se utilizan para inducción. Las células diana pueden ser células que expresan en forma endógena KNTC2, como células de cáncer, o células transfectadas con el gen KNTC2; y células que presentan un péptido de la presente invención en la superficie celular debido a que la estimulación por el péptido también puede servir como dianas de ataque de CTL activados.

En algunas realizaciones, los CTL de la presente invención reconocen células que presentan complejos del antígeno HLA-A2 y un péptido de la presente invención. En el contexto del CTL, la expresión "reconocer una célula" se refiere a unir un complejo del antígeno HLA-A2 y un péptido de la presente invención en la superficie de la célula mediante su TCR y exhibir actividad citotóxica específica contra la célula. En la presente invención, "actividad citotóxica específica" se refiere a exhibir actividad citotóxica contra la célula que presenta un complejo del antígeno HLA-A2 y un péptido de la presente invención, pero no otras células. Por consiguiente, los CTL que exhiben actividad citotóxica específica contra una célula que presenta un péptido de la presente invención se incluyen en la presente invención. Concretamente los CTL de la presente invención pueden reconocer una célula que expresa KNTC2 y un HLA-A2 (p. ej., una célula de cáncer HLA-A2 positiva) y exhiben actividad citotóxica específica contra dicha célula.

VIII. Receptor de células T (TCR):

También se describe en el contexto de la presente invención una composición que incluye uno o más polinucleótidos que codifican ambas subunidades del TCR o polinucleótidos que codifican cada subunidad del TCR, en donde el TCR formado por dichas subunidades puede unirse a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención en una superficie celular. El método para usarla se da a conocer en la presente invención. Dichas subunidades del TCR tienen la capacidad de formar TCR que confieren especificidad a las células T contra células tumorales que expresan KNTC2. Al usar los métodos conocidos en la técnica, se pueden identificar polinucleótidos

que codifican cada cadena alfa y beta de las subunidades TCR del CTL inducido con uno o más péptidos de la presente invención (WO2007/032255 y Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Por ejemplo, se prefiere el método de PCR para analizar el TCR. Los cebadores PCR para análisis pueden ser, por ejemplo, cebadores 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgctcat-3') como cebadores laterales 5' (SEQ ID NO: 80) y cebadores 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgagcgt-3') específicos para la región C de la cadena de TCR alfa (SEQ ID NO: 81), cebadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatccttctcttgac-3') específicos para la región C1 de la cadena de TCR beta (SEQ ID NO: 82) o cebadores 3-TRb-C2 (5'-ctagcctctggaatccttctctt-3') específicos para la región C2 de la cadena de TCR beta (SEQ ID NO: 83) como cebadores laterales 3', aunque sin limitarse a ello. Los TCR derivados pueden unirse a células diana que presentan un péptido de la presente invención con gran avidez, y opcionalmente median en la activación eficiente de las células diana que presentan un péptido de la presente invención *in vivo* e *in vitro*.

El polinucleótido que codifica ambas subunidades del TCR o los polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades del TCR se pueden incorporar en vectores adecuados, p. ej., vectores retrovíricos. Estos vectores se conocen en la técnica. Los polinucleótidos o los vectores que los incluyen se pueden de transferir con fines útiles a una célula T (p. ej., célula T CD8 positiva), por ejemplo, una célula T de un paciente. Ventajosamente, la presente invención da a conocer una composición lista para usar que permite la rápida modificación de las propias células T de un paciente (o aquellas de otro mamífero) para producir rápida y fácilmente células T modificadas que tienen excelentes propiedades de inactivación de las células cancerosas.

Los TCR específicos contra los péptidos de la presente invención deben ser capaces de reconocer específicamente un complejo de un péptido de la presente invención y una molécula de HLA, proporcionando una actividad específica de las células T contra una célula diana que presenta un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA cuando el TCR se presenta en la superficie de la célula T. Un reconocimiento específico del complejo mencionado se puede confirmar con cualquier método conocido, cuyos ejemplos preferidos incluyen análisis de tinción con multímeros de HLA utilizando moléculas de HLA y péptidos de la presente invención, y ensayo ELISPOT. Al efectuar el ensayo ELISPOT, se puede confirmar que una célula T que expresa el TCR en la superficie de la célula reconoce una célula por el TCR, y que las señales son transmitidas en forma intracelular. La confirmación de que el TCR mencionado anteriormente puede provocar actividad citotóxica de las células T cuando el TCR existe en la superficie de las células T puede también llevarse a cabo por un método conocido. Un método preferido incluye, por ejemplo, la determinación de actividad citotóxica contra una célula diana HLA positiva, tal como el ensayo de liberación de cromo.

Además, la presente invención da a conocer CTL que se preparan por transducción con los polinucleótidos que codifican ambas subunidades del TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades del TCR en donde el TCR formado por dichas subunidades del TCR se puede unir a un complejo del péptido según se define en las reivindicaciones en el contexto de HLA-A2. También se describen en el contexto de la presente invención CTL que se preparan por transducción con los polinucleótidos que codifican ambas subunidades del TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades del TCR, en donde el TCR formado por dichas subunidades del TCR se puede unir al péptido KNTC2, p. ej., SEQ ID NO: 2, 3, 17, 41, 53 y 68 en el contexto de HLA-A2.

Los CTL transducidos son capaces de dirigirse a las células cancerosas *in vivo*, y pueden expandirse por métodos de cultivo conocidos *in vitro* (p. ej., Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Los CTL de la presente invención se pueden usar para formar una composición inmunogénica útil tanto en el tratamiento como en la prevención del cáncer en un paciente que necesita terapia o protección (Véase, WO2006/031221).

IX. Composiciones farmacéuticas:

Puesto que la expresión de KNTC2 se eleva específicamente en el cáncer, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos en comparación con tejidos normales, los péptidos o polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para inducir una respuesta inmune contra una célula cancerosa o tumoral y por lo tanto servir en el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/o para la prevención de su recurrencia metastásica o posoperatoria. Por consiguiente, la presente invención da a conocer composiciones farmacéuticas o agentes formulados para uso en el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/o para la prevención de su recurrencia metastásica o posoperatoria, en donde dichas composiciones o agentes incluyen por lo menos uno de los péptidos o polinucleótidos de la presente invención como ingrediente activo. Alternativamente, los péptidos de la presente invención se pueden expresar en la superficie de cualquiera de los exosomas o células mencionados, como las APC para uso como composiciones farmacéuticas o agentes. Además, los CTL precedentemente mencionados que se dirigen a uno cualquiera de los péptidos de la presente invención también se pueden utilizar como el ingrediente activo de las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención da a conocer agentes o composiciones que incluyen por lo menos un ingrediente activo seleccionado entre:

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en forma expresable;
- (c) una APC de la presente invención;
- (d) un exosoma de la presente invención; y

5 (e) un CTL de la presente invención.

En la composición o agente farmacéutico, dichos péptido, polinucleótido, APC y CTL están presentes en una cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz.

10 Las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención son también útiles como vacunas. En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" (también denominado "composición inmunogénica") hace referencia a un agente o una composición que tiene la función de mejorar, potenciar y/o inducir inmunidad antitumoral tras la inoculación en un animal. En otros términos, la presente invención da a conocer agentes o composiciones farmacéuticas para inducir una respuesta inmune contra el cáncer en un sujeto.

15 Las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención se pueden utilizar para tratar y/o prevenir cáncer, y/o para prevenir su recurrencia metastásica o posoperatoria en sujetos o pacientes como seres humanos y cualquier otro mamífero, entre ellos, ratón, rata, cobaya, conejo, gato, perro, oveja, cabra, cerdo, ganado, caballo, mono, babuino y chimpancé, particularmente un animal importante desde el punto de vista comercial o un animal domesticado. En algunas realizaciones, los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular para administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2.

20 También se describe en este documento el uso de un ingrediente activo en la fabricación de una composición o agente farmacéutico para tratar y/o prevenir una afección cancerosa o tumoral, y/o prevenir su recurrencia metastásica o posoperatoria, en donde dicho agente se selecciona entre:

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en forma expresable;
- (c) una APC que presenta un péptido de la presente invención en su superficie;
- 25 (d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención en su superficie; y
- (e) un CTL de la presente invención.

Alternativamente, la presente invención da a conocer también un ingrediente activo para uso en el tratamiento y/o la prevención de cáncer o tumores, y/o la prevención de su recurrencia posoperatoria, en donde dicho ingrediente activo se selecciona entre:

- 30 (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en forma expresable;
- (c) una APC que presenta un péptido de la presente invención en su superficie;
- (d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención en su superficie; y
- (e) un CTL de la presente invención.

35 También se describe en este documento un método o procedimiento para fabricar una composición o agente farmacéutico para tratar y/o prevenir una afección cancerosa o tumoral, y/o prevenir su recurrencia metastásica o posoperatoria, en donde el método o procedimiento incluye la etapa de formular un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable con un ingrediente activo seleccionado entre:

- (a) un péptido de la presente invención;
- 40 (b) un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en una forma expresable;
- (c) una APC que presenta un péptido de la presente invención en su superficie;
- (d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención en su superficie; y
- (e) un CTL de la presente invención.

También se describe en este documento un método o procedimiento para fabricar una composición o agente farmacéutico para tratar y/o prevenir una afección cancerosa o tumoral, y/o prevenir su recurrencia metastásica o posoperatoria, en donde el método o procedimiento incluye las etapas de mezclar un ingrediente activo con un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable, en donde el ingrediente activo se selecciona entre:

- 5 (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en forma expresable;
- (c) una APC que presenta un péptido de la presente invención en su superficie;
- (d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención en su superficie; y
- (e) un CTL de la presente invención.

10 La presente invención también da a conocer un ingrediente activo seleccionado entre:

- (a) un péptido de la presente invención;
- (b) un polinucleótido que codifica dicho péptido de la presente invención en forma expresable;
- (c) una APC que presenta un péptido de la presente invención en su superficie;
- (d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención en su superficie; y

15 (e) un CTL de la presente invención

para uso en el tratamiento y/o la prevención de una afección cancerosa o tumoral, y/o en la prevención de su recurrencia metastásica o posoperatoria.

De acuerdo con la presente invención, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 han demostrado ser péptidos de epítomos restringidos a HLA-A2 y por lo tanto sirven como candidatos que pueden inducir respuesta inmune potente y específica contra el cáncer que expresa HLA-A2 y KNTC2 en un sujeto. En consecuencia, las composiciones o agentes farmacéuticos, incluidos cualquiera de estos péptidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 son particularmente adecuados para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Se describen en el contexto de la presente invención péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2, 3, 17, 41, 53 y 68 que se ha demostrado que son péptidos de epítomo restringidos a HLA-A2 y por lo tanto pueden servir como candidatos que pueden inducir respuesta inmune potente y específica contra el cáncer que expresa HLA-A2 y KNTC2 en un sujeto. Por consiguiente, las composiciones o agentes farmacéuticos, incluidos cualquiera de estos péptidos, con la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2, 3, 17, 41, 53 y 68 son particularmente adecuados para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A2. La cantidad del péptido en dicho agente o composición puede ser una cantidad eficaz para inducir respuesta inmunológica potente y específica en un sujeto que porta un cáncer que expresa KNTC2 y HLA-A2. Lo mismo aplica a composiciones o agentes farmacéuticos que contienen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de la presente invención).

Los tipos de cáncer que se han de tratar y/o prevenir con las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención no están limitados e incluyen todas las clases de cáncer en donde está implicado KNTC2, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos. Preferiblemente, el cáncer expresa HLA-A2 (es decir, cáncer HLA-A2 positivo).

Las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden contener, además de los ingredientes activos antes mencionados, otros péptidos que tienen la capacidad de inducir los CTL contra células cancerosas, polinucleótidos que codifican dichos péptidos, células que presentan dichos péptidos, y similares. Los ejemplos de dichos "otros" péptidos que tienen la capacidad de inducir los CTL contra células cancerosas incluyen, entre otros, péptidos derivados de antígenos específicos de cáncer (p. ej., TAA identificados).

Si es necesario, las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden opcionalmente incluir otras sustancias terapéuticas como ingredientes activos adicionales, siempre y cuando la sustancia no inhiba el efecto antitumoral del ingrediente activo de la presente invención, p. ej., cualquiera de los péptidos, polinucleótidos, exosomas, APC, CTL de la presente invención. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir sustancias antiinflamatorias, analgésicos, agentes quimioterapéuticos y similares. Además de incluir otras sustancias terapéuticas en el medicamento propiamente dicho, los medicamentos de la presente invención pueden también administrarse secuencial o concurrentemente con una o más de otras composiciones farmacológicas. Las cantidades de medicamento y composición farmacológica dependen, por ejemplo, del tipo de composición o

composiciones farmacológicas que se utilicen, la enfermedad que se esté tratando, y el esquema y las rutas de administración.

Los expertos en la técnica reconocerán que además de los ingredientes particularmente mencionados en este documento, las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden incluir otras sustancias convencionales en la técnica, teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión.

En una realización de la presente invención, las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención se pueden envasar en artículos de manufactura y kits que contienen materiales útiles para tratar las condiciones patológicas de la enfermedad que se ha de tratar, p. ej., cáncer. El artículo de manufactura puede incluir un envase de cualquiera de las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención con una etiqueta. Dichos envases incluyen frascos, viales y tubos de ensayo. Los envases se pueden formar con una diversidad de materiales, como vidrio o plástico. La etiqueta en el envase debe indicar que la composición o el agente se usa para tratar o prevenir una o más de las condiciones de la enfermedad. La etiqueta puede además indicar instrucciones para administración, etc.

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

Las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden, si se desea, envasarse en un recipiente o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de administración unitaria que contienen el ingrediente activo. El recipiente puede, por ejemplo, incluir aluminio metálico o plástico, como un blíster. El recipiente o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para administración.

(1) Composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos

Los péptidos de la presente invención se pueden administrar directamente como composiciones o agentes farmacéuticos, o si es necesario, se pueden formular por métodos de formulación convencionales. En este último caso, además de los péptidos de la presente invención, se pueden incluir vehículos, excipientes y similares que se utilizan habitualmente para fármacos, según sea apropiado sin limitaciones particulares. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen, aunque sin limitarse a ello, agua esterilizada, disolución salina fisiológica, tampón de fosfato, fluido de cultivo y similar. Asimismo, las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden contener, según sea necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares. Las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención se pueden emplear para fines antineoplásicos.

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar en combinación, lo que incluye dos o más de los péptidos de la presente invención, para inducir los CTL *in vivo*. Los péptidos pueden estar en un cóctel o pueden conjugarse entre sí usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los péptidos se pueden enlazar químicamente o expresarse como un solo polipéptido de fusión. Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes. Al administrar los péptidos de la presente invención, los péptidos son presentados en alta densidad por los antígenos HLA en las APC, y luego se inducen los CTL que reaccionan específicamente hacia el complejo formado entre el péptido exhibido y el antígeno HLA. Alternativamente, las APC (p. ej., DC) se pueden extraer de un sujeto y luego estimularse con los péptidos de la presente invención para obtener APC que presenten cualquiera de los péptidos de la presente invención en su superficie celular. Estas APC pueden re-administrarse al sujeto para inducir los CTL en el cuerpo del sujeto, y como resultado, se puede aumentar la agresividad hacia el endotelio asociado al tumor.

Las composiciones o agentes farmacéuticos para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que incluyen cualquiera de los péptidos de la presente invención como el ingrediente activo, pueden además incluir un adyuvante como para establecer eficazmente la inmunidad celular. Alternativamente, las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención se pueden administrar con otros ingredientes activos, o se pueden administrar por formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a cualquier compuesto, sustancia o composición que potencie la respuesta inmune contra la proteína cuando se administra junto (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Los adyuvantes contemplados en este documento incluyen aquellos descritos en la bibliografía (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Los ejemplos de adyuvantes incluyen, aunque sin limitarse a ello, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, toxina de cólera, toxina de salmonella, IFA (adyuvante de Freund incompleto), CFA (adyuvante de Freund completo), ISCOMATRIX, GM-CSF, CpG, emulsión aceite en agua y similares.

Asimismo, se pueden emplear formulaciones de liposomas, formulaciones granulares en donde el péptido está unido a esferas con un diámetro de pocos micrómetros y formulaciones en las que un lípido está unido al péptido.

El péptido de la presente invención también se puede administrar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales preferidas incluyen, aunque sin limitarse a ello, sales con un metal alcalino, sales con un metal, sales con una base orgánica, sales con una amina, sales con un ácido orgánico (p. ej., ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido

málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, etc.) y sales con un ácido inorgánico (p. ej., ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, etc.). Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la efectividad biológica y las propiedades del compuesto y que se obtienen por reacción con ácidos inorgánicos u orgánicos o bases tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

En algunas realizaciones, las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden además incluir un componente que cebe los CTL. Se han identificado los lípidos como componentes capaces de cebar los CTL *in vivo* contra antígenos víricos. Por ejemplo, los residuos de ácido palmítico se pueden unir a los grupos amino épsilon y alfa de un residuo lisina y luego unirse a un péptido de la presente invención. El péptido lipidado puede luego administrarse o bien directamente en una micela o partícula, incorporarse a un liposoma o emulsionarse en un adyuvante. Como otros ejemplos de lípidos, se pueden usar lipoproteínas de *E. coli*, como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS) para cebar los CTL cuando se unen covalentemente a un péptido apropiado (ver, p. ej., Deres et al., *Nature* 1989, 342: 561-4).

Los ejemplos de métodos de administración adecuados incluyen, aunque sin limitarse a ello, oral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraósea, peritoneal e intravenosa, o similar. La administración puede ser administración sistémica o administración local próxima a los sitios diana (es decir, inyección directa). La administración se puede efectuar por administración individual o en múltiples administraciones. Una cantidad farmacéutica o terapéuticamente eficaz del péptido de la presente invención se puede administrar a un sujeto que necesita tratamiento del cáncer o de un tumor que expresa KNTC2. Alternativamente, una cantidad de un péptido de la presente invención suficiente para inducir los CTL contra el cáncer o contra un tumor que expresa KNTC2 se puede administrar a un sujeto que padece cáncer que expresa KNTC2. La dosis de los péptidos de la presente invención se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad a tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración y similares, y habitualmente es 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 30 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 10 mg, por ejemplo, 0,5 mg a 5 mg, y se puede administrar una vez al día durante algunos días a algunos meses, por ejemplo, una vez por semana. El experto en la técnica puede determinar fácilmente las dosis adecuadas y óptimas.

(2) Composiciones farmacéuticas que contienen los polinucleótidos

Las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención pueden además contener ácidos nucleicos que codifican el péptido(s) definido en las reivindicaciones en forma expresable. En este documento, la expresión "en forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando se introduce en una célula, se expresará *in vivo* como un polipéptido que induce inmunidad antitumoral. En una realización ilustrativa, la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido de interés incluye elementos reguladores necesarios para expresión del polinucleótido. El polinucleótido(s) puede estar equipado como para lograr la inserción estable en el genoma de la célula diana (ver, p. ej., Thomas KR & Capecchi MR, *Cell* 1987, 51: 503-12 para una descripción de vectores cassette homólogos). Ver, p. ej., Wolff et al., *Science* 1990, 247: 1465-8; patentes de EE. UU. núm. 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y WO 98/04720. Los ejemplos de tecnología de administración basada en ADN incluyen "ADN desnudo", administración facilitada (mediada por péptidos, bupivacaína, polímeros), complejos de lípidos catiónicos y administración mediada por partículas ("pistola de genes") o administración mediada por presión (ver, p. ej., patente de EE. UU. núm. 5.922.687).

Los péptidos de la presente invención pueden además expresarse por vectores víricos o bacterianos. Los ejemplos de vectores de expresión incluyen hospedantes víricos atenuados, como vaccinia o viruela aviar. Este planteamiento implica el uso de un virus de vaccinia, p. ej., como un vector para expresar secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. Tras la introducción en un hospedante, el virus de vaccinia recombinante expresa el péptido inmunogénico, y produce así una respuesta inmune. Los vectores de vaccinia y los métodos útiles en los protocolos de inmunización se describen, p. ej., en la patente de EE. UU. núm. 4.722.848. Otro vector es BCG (*Bacille Calmette Guérin*). Los vectores BCG se describen en Stover et al., *Nature* 1991, 351: 456-60. Será obvia una amplia variedad de otros vectores útiles para administración terapéutica o inmunización, p. ej., virus adeno y asociados con adeno, vectores retrovíricos, vectores de *Salmonella typhi*, vectores de toxina de ántrax destoxificados y similares. Ver, p. ej., Shata et al., *Mol Med Today* 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., *J Leukoc Biol* 2000, 68: 793-806; Hipp et al., *In Vivo* 2000, 14: 571-85.

La administración de un polinucleótido al cuerpo de un paciente puede ser o bien directa, en cuyo caso el paciente se expone directamente a un vector que porta un polinucleótido, o indirecta, en cuyo caso las células se transforman primero con el polinucleótido de interés *in vitro*, y luego las células se trasplantan al paciente. Estos dos planteamientos se conocen, respectivamente, como terapias génicas *in vivo* y *ex vivo*.

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

(John Wiley & Sons, NY, 1993); y Krieger en Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual (Stockton Press, NY, 1990).

Al igual que la administración de péptidos, la administración de polinucleótidos se puede efectuar por administración oral, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraósea o peritoneal, o similar. La administración puede ser administración sistémica o administración local (es decir, inyección directa) próxima a los sitios diana. La administración se puede efectuar por una sola administración o por múltiples administraciones. Una cantidad farmacéutica o terapéuticamente eficaz del polinucleótido de la presente invención se puede administrar a un sujeto que necesita tratamiento del cáncer o de un tumor que expresa KNTC2. Alternativamente, una cantidad del polinucleótido de la presente invención suficiente para inducir los CTL contra el cáncer o un tumor que expresa KNTC2 se puede administrar a un sujeto que tiene cáncer que expresa KNTC2. La dosis del polinucleótido en el vehículo adecuado o las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de la presente invención se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad a tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración y similares, y es habitualmente 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 30 mg, por ejemplo, 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 10 mg, por ejemplo, 0,5 mg a 5 mg, y se puede administrar una vez cada algunos días a una vez cada algunos meses, por ejemplo, una vez por semana. El experto en la técnica puede determinar fácilmente las dosis adecuadas y óptimas.

X. Métodos para usar los péptidos, exosomas, APC y CTL:

Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para preparar o inducir APC y CTL. Los exosomas y APC de la presente invención también se pueden utilizar para preparar o inducir CTL. Los péptidos, polinucleótidos, exosomas y APC se pueden utilizar en combinación con cualquier otro compuesto siempre y cuando los compuestos adicionales no inhiban la inducibilidad de los CTL. Por lo tanto, cualquiera de las composiciones o agentes farmacéuticos anteriormente mencionados de la presente invención se puede emplear para preparar o inducir los CTL. Asimismo, aquellos que incluyen los péptidos y polinucleótidos también se pueden usar para preparar o inducir APC como se explica a continuación.

(1) Métodos para inducir células presentadoras de antígenos (APC)

La presente invención da a conocer métodos *in vitro* para inducir APC que tienen la capacidad de inducir uno o más CTL usando los péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

Los métodos de la presente invención incluyen la etapa de poner en contacto las APC con los péptidos de la presente invención *in vitro*. Por ejemplo, el método para poner en contacto una APC con el péptido *in vitro* pueden incluir las etapas de:

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

Las APC no se limitan a una clase de células particular e incluyen DC, células Langerhans, macrófagos, células B y células T activadas, que se sabe presentan antígenos proteínicos en su superficie celular como para ser reconocidas por los linfocitos. Preferiblemente, se pueden utilizar las DC, puesto que poseen la inducibilidad de CTL más fuerte entre las APC. Cualquiera de los péptidos de la presente invención se puede utilizar por sí solo o combinado con uno o más de otros péptidos de la presente invención y/o uno o más de los péptidos inducibles de CTL derivados de TAA distintos de KNTC2.

Por otra parte, cuando los péptidos de la presente invención se administran a un sujeto, las APC se ponen en contacto con los péptidos *in vivo*, y en consecuencia, las APC con inducibilidad de CTL se inducen en el cuerpo del sujeto. De modo similar, cuando el polinucleótido de la presente invención se administra a un sujeto en una forma expresable, el péptido se expresa y se pone en contacto con las APC *in vivo*, y en consecuencia, las APC con inducibilidad de CTL se inducen en el cuerpo del sujeto. La expresión "forma expresable" se describió precedentemente en la sección "IX. Composiciones farmacéuticas (2) Composiciones farmacéuticas que contienen polinucleótidos".

El método de la presente invención puede además incluir la etapa de introducir un polinucleótido de la presente invención en una APC para inducir una APC que tiene la capacidad de inducir CTL. Por ejemplo, el método puede incluir las etapas de:

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

La etapa a se puede llevar a cabo según se describió anteriormente en la sección "VI. Células presentadoras de antígenos (APC)".

Alternativamente, los métodos de la presente invención pueden incluir la etapa de preparar una APC que puede inducir específicamente la actividad de CTL contra KNTC2, mediante una de las siguientes etapas:

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

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

Alternativamente, los métodos *in vitro* de la presente invención pueden incluir la etapa de inducir una APC que tiene inducibilidad de CTL, mediante una de las siguientes etapas:

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

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

Los métodos de la presente invención se pueden llevar a cabo *in vitro*. Las APC utilizadas para inducción de APC que tienen la capacidad de inducir CTL pueden ser preferiblemente APC que expresan el antígeno HLA-A2 (es decir, APC HLA-A2 positivas). Dichas APC se pueden preparar por los métodos conocidos en la materia a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Las APC
10 inducidas por el método de la presente invención pueden ser APC que presentan un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA (antígeno HLA-A2) en su superficie. Cuando las APC inducidas por el método de la presente invención se administran a un sujeto con el fin de inducir respuestas contra el cáncer en el sujeto, el sujeto es preferiblemente el mismo del cual derivan las APC. No obstante, el sujeto puede ser uno diferente del donante de las APC siempre y cuando el sujeto tenga el mismo tipo de HLA con el tipo de HLA del donante de las
15 APC.

También se describen agentes o composiciones para uso en inducir una APC que tiene inducibilidad de CTL y dichos agentes o composiciones incluyen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

También se describe en este documento el uso de un péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica dicho péptido en la fabricación de una composición formulada para inducir las APC.

20 Alternativamente, la presente invención da a conocer además del péptido de la presente invención el polipéptido que codifica el péptido para uso en inducir una APC que tiene inducibilidad de CTL.

(2) Método para inducir los CTL:

La presente invención también da a conocer métodos *in vitro* para inducir los CTL, usando los péptidos, polinucleótidos o exosomas o APC de la presente invención.

25 La presente invención también da a conocer métodos *in vitro* para inducir CTL, usando un polinucleótido que codifica ambas subunidades del TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades del TCR, en donde el TCR formado por dichas subunidades puede reconocer (es decir, unirse a) un complejo de la superficie celular de un péptido de la presente invención y un antígeno de HLA. Preferiblemente, los métodos para inducir los CTL pueden incluir por lo menos una etapa seleccionada entre:

30 a: poner en contacto una célula T CD8 positiva con una célula presentadora de antígenos que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención

b: poner en contacto una célula T CD8 positiva con un exosoma que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención; y

35 c: introducir un polinucleótido que codifica ambas subunidades del TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades del TCR en una célula T CD8 positiva, en donde el TCR formado por dichas subunidades puede reconocer (unirse a) un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA en una superficie celular.

Cuando los péptidos, polinucleótidos, APC o exosomas de la presente invención se administran a un sujeto, los CTL se inducen en el cuerpo del sujeto, y la potencia de las respuestas inmunes que se dirigen a las células cancerosas que expresan KNTC2 se potencia. De manera alternativa, los CTL pueden también inducirse usándolos *ex vivo* o *in vitro*, y después de inducir los CTL, los CTL activados pueden ser retornados al sujeto. Por ejemplo, el método para inducir CTL puede incluir las etapas de:

a: poner en contacto las APC con un péptido de la presente invención, y

b: co-cultivar las APC de la etapa a con células T CD8 positivas.

45 La APC que se ha de co-cultivar con la célula T CD8 positiva en la etapa b anterior se puede preparar transfiriendo un polinucleótido de la presente invención a una APC descrita anteriormente en la sección "VI. Células presentadoras de antígenos (APC)", aunque la presente invención no se limita a esto y por ende abarca cualquiera de las APC que presentan eficazmente en su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención.

50 Uno puede opcionalmente utilizar exosomas que presentan en la superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención en lugar de las APC anteriormente mencionadas. A saber, la presente invención

incluye la etapa de co-cultivar los exosomas que presentan en su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención y células T CD8 positivas. Dichos exosomas se pueden preparar por los métodos descritos anteriormente en la sección "V. Exosomas". Las APC y los exosomas adecuados para el método de la presente invención presentan un complejo de un péptido de la presente invención y HLA-A2 en la superficie.

- 5 Asimismo, los CTL se pueden inducir introduciendo un polinucleótido que codifica ambas subunidades del TCR o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades del TCR en una célula T CD8 positiva, en donde el TCR formado por dichas subunidades puede unirse a un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA en una superficie celular. Dicha transducción se puede llevar a cabo como se describió anteriormente en la sección "VIII. Receptor de células T (TCR)".
- 10 Los métodos de la presente invención se llevan a cabo *in vitro*. Las células T CD8 positivas utilizadas para la inducción de CTL se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica a partir de PBMC obtenidas de un sujeto. En realizaciones preferidas, el donante de las células T CD8 positivas puede ser un sujeto cuyo antígeno HLA sea HLA-A2. Los CTL inducidos por los métodos de la presente invención pueden reconocer células que presentan un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA (p. ej., HLA-A2) en su superficie. Dichos CTL
- 15 pueden exhibir actividad citotóxica específica contra células que presentan un péptido de la presente invención en la superficie, y por ende pueden exhibir actividad citotóxica específica contra células que expresan KNTC2 (p. ej., células cancerosas). Cuando los CTL inducidos por el método de la presente invención se administran a un sujeto con el fin de inducir respuestas contra el cáncer en el sujeto, el sujeto preferiblemente es el mismo de quien derivan las células T CD8 positivas. No obstante, el sujeto puede ser uno diferente del donante de células T CD8 positivas,
- 20 siempre y cuando el sujeto tenga el mismo tipo de HLA con el tipo de HLA del donante de células T CD8 positivas.

Se describe además un método o procedimiento para la fabricación de una composición farmacéutica para uso en la inducción de un CTL, en donde el método o procedimiento incluye la etapa de mezclar o formular un péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 En otra realización, la presente invención da a conocer una composición para inducir un CTL, en donde el agente o la composición incluye uno o más péptidos, uno o más polinucleótidos, uno o más APC y/o uno o más exosomas de la presente invención.

También se describe el uso del péptido, polinucleótido, APC o exosoma de la presente invención en la fabricación de una composición formulada para inducir un CTL. Alternativamente, la presente invención da a conocer también el péptido, polinucleótido, APC o exosoma de la presente invención para uso en la inducción de un CTL.

- 30 XI. Métodos para inducir respuestas inmunes:

También se describen los péptidos, polinucleótidos definidos en las reivindicaciones, exosomas o APC que presentan los péptidos definidos en las reivindicaciones para uso en la inducción de respuestas inmunes contra enfermedades relacionadas con KNTC2. Las enfermedades contempladas incluyen cáncer, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos. Preferiblemente, el cáncer expresa HLA-A2 (es decir., cáncer HLA-A2 positivo).

- 35 Para detalles, ver la sección "IX. Composiciones farmacéuticas", particularmente la parte que describe el uso de las composiciones farmacéuticas de la presente invención como vacunas. Además, los exosomas y APC que se pueden emplear para los presentes métodos para inducir respuesta inmune se describen en detalle en las secciones "V. Exosomas", "VI. Células presentadoras de antígenos (APC)", y (1) y (2) de "X. Métodos para usar los péptidos, exosomas, APC y CTL", supra.

- 45 También se describe un método o procedimiento para la fabricación de una composición o agente farmacéutico para uso en la inducción de respuesta inmune contra el cáncer, en donde el método o el procedimiento puede incluir la etapa de mezclar o formular un péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Alternativamente, el método de la presente invención puede incluir una vacuna o una composición o agente farmacéutico de la presente invención que contiene:

- (a) un péptido de la presente invención;
- 50 (b) un polinucleótido que codifica dicho péptido de la invención en forma expresable;
- (c) una APC que presenta un péptido de la presente invención en su superficie;
- (d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención en su superficie; o
- (e) un CTL de la presente invención

para uso en el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/o la prevención de su recurrencia posoperatoria.

En el contexto de la presente invención, un cáncer que expresa en forma excesiva KNTC2 se puede tratar con estos ingredientes activos. Los ejemplos de dicho cáncer incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos.

Por consiguiente, antes de la administración de las vacunas o las composiciones o el agente farmacéutico que incluye cualquiera de los ingredientes activos antes mencionados, es preferible confirmar si el nivel de expresión de KNTC2 en las células o tejidos cancerosos del sujeto que se ha de tratar es elevado en comparación con las células o tejidos normales obtenidos del mismo sujeto. Por lo tanto, se describe en este documento por lo menos un componente seleccionado entre (a) a (e) anteriormente descritos para uso en el tratamiento del cáncer que expresa (en forma excesiva) KNTC2 en un paciente que lo necesita, incluidas las etapas de:

i) determinar el nivel de expresión de KNTC2 en una muestra biológica obtenida de un sujeto con el cáncer que se ha de tratar;

ii) comparar el nivel de expresión de KNTC2 con el control normal; y

iii) administrar por lo menos un componente seleccionado entre (a) a (e) anteriormente descritos a un sujeto con cáncer que expresa en forma excesiva KNTC2 en comparación con el control normal.

Alternativamente, la presente invención da a conocer una vacuna o composición farmacéutica que incluye por lo menos un componente seleccionado entre (a) a (e) anteriormente descritos, que se ha de administrar a un sujeto que tiene cáncer que expresa en forma excesiva KNTC2. También se describe en este documento un método para identificar a un sujeto que se ha de tratar con un péptido de la presente invención, en donde dicho método incluye la etapa de determinar un nivel de expresión de KNTC2 en una muestra biológica derivada de un sujeto, en donde un incremento del nivel de expresión comparado con un nivel control normal de KNTC2 indica que el sujeto puede tener cáncer que se puede tratar con un péptido de la presente invención.

A su vez, en realizaciones preferidas, el tipo de HLA de un sujeto se puede identificar antes de administrar los péptidos de la presente invención. Los sujetos HLA-A2 positivos se pueden seleccionar preferiblemente para la administración de una vacuna o composición farmacéutica de la presente invención.

Cualquier célula o tejido derivado de un sujeto se puede usar para determinar el nivel de expresión de KNTC2 siempre y cuando pueda incluir el producto de transcripción o traducción de KNTC2. Los ejemplos de muestras adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a ello, tejidos y fluidos corporales, como sangre, esputo y orina. Preferiblemente, la muestra de células o tejido del sujeto contiene una población de células que incluye una célula epitelial, más preferiblemente una célula epitelial cancerosa o una célula epitelial derivada de tejido canceroso. A su vez, si es necesario, la célula se puede purificar de los tejidos y fluidos corporales obtenidos, y luego usarse como la muestra derivada del sujeto.

De acuerdo con la presente invención, se puede determinar el nivel de expresión de KNTC2 en una muestra biológica obtenida de un sujeto. El nivel de expresión de KNTC2 se puede determinar a nivel del producto de transcripción (ácido nucleico), usando métodos conocidos en la industria. Por ejemplo, el ARNm de KNTC2 se puede cuantificar usando sondas por métodos de hibridación (p. ej., hibridación Northern). La detección se puede llevar a cabo en un chip o una matriz. Se prefiere el uso de una matriz para detectar el nivel de expresión de KNTC2. Los expertos en la técnica pueden preparar dichas sondas utilizando la información de la secuencia de KNTC2. Por ejemplo, el ADNc de KNTC2 se puede usar como las sondas. Si es necesario, las sondas se pueden etiquetar con una etiqueta adecuada, como tintes, sustancias fluorescentes e isótopos, y el nivel de expresión de KNTC2 se puede detectar como la intensidad de las etiquetas hibridadas.

Asimismo, el producto de transcripción de KNTC2 se puede cuantificar usando cebadores por métodos de detección basados en ampliación (p. ej., RT-PCR). Dichos cebadores se pueden preparar en base a la información de secuencias de KNTC2 disponibles.

Concretamente, una sonda o un cebador utilizado para el presente método se hibrida bajo condiciones rigurosas, moderadamente rigurosas o de baja rigurosidad al ARNm de KNTC2. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "condiciones rigurosas (de hibridación)" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda o cebador se hibridará a su secuencia diana, pero no a otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes bajo circunstancias diferentes. La hibridación específica de secuencias más largas se observa a temperaturas superiores que las secuencias más cortas. En general, la temperatura de una condición rigurosa se selecciona para ser aproximadamente de aproximadamente 5 grados centígrados menos que el punto de fusión térmico (T_m) para una secuencia específica en una fuerza iónica y pH definidos. El T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica definida, pH y concentración de ácido nucleico) a la cual el 50% de las sondas complementarias a su secuencia diana se hibridan a la secuencia diana en equilibrio. Dado que las secuencias diana están en general

presentes en exceso, a T_m , el 50% de las sondas son ocupadas en equilibrio. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente ion sódico 1,0 M, típicamente aproximadamente ion sódico (u otras sales) 0,01 a 1,0 M a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es por lo menos aproximadamente 30 grados centígrados para cebadores o sondas cortas (p. ej., 10 a 50 nucleótidos) y por lo menos aproximadamente 60 grados centígrados para cebadores o sondas más largas. Las condiciones rigurosas pueden también lograrse con la adición de sustancias desestabilizantes tales como formamida.

Una sonda o cebador utilizado en el contexto de la presente invención es típicamente un oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido típicamente incluye una región de secuencias de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas a por lo menos aproximadamente 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 o 25, secuencias de nucleótidos consecutivos de una hebra sentido de un ácido nucleico que incluye una secuencia de KNTC2, o una secuencia de nucleótidos de hebra antisentido de un ácido nucleico que incluye una secuencia de KNTC2, o de un mutante natural de estas secuencias. En particular, por ejemplo, en una realización preferida, un oligonucleótido que tiene 5-50 de longitud se puede usar como cebador para ampliar los genes que se han de detectar. Más preferiblemente, el ARNm o ADNc de un gen KNTC2 se puede detectar con una sonda o cebador de oligonucleótidos de un tamaño específico, en general 15- 30 bases de longitud. El tamaño puede oscilar entre por lo menos 10 nucleótidos, por lo menos 12 nucleótidos, por lo menos 15 nucleótidos, por lo menos 20 nucleótidos, por lo menos 25 nucleótidos, por lo menos 30 nucleótidos y las sondas y cebadores pueden oscilar en tamaño entre 5-10 nucleótidos, 10-15 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-25 nucleótidos y 25-30 nucleótidos. En realizaciones preferidas, la longitud de la sonda o cebador de oligonucleótidos se puede seleccionar entre 15-25 nucleótidos. Los procedimientos, dispositivos o reactivos de ensayo para detección de genes usando dicha sonda o cebador de oligonucleótidos se conocen bien (p. ej., micromatriz de oligonucleótidos o PCR). En estos ensayos, las sondas o cebadores pueden además incluir marcas o secuencias enlazadoras. A su vez, las sondas o cebadores se pueden modificar con etiquetas detectables o ligandos de afinidad que se han de capturar. Alternativamente, en procedimientos de detección basados en hibridación, un polinucleótido que tiene algunos cientos (p. ej., aproximadamente 100-200) de bases hasta algunos kilos (p. ej., aproximadamente 1000-2000) de bases de longitud también se puede utilizar para una sonda (p. ej., ensayo de inmunotransferencia northern o análisis de micromatrices de ADNc).

Alternativamente, el producto de traducción de KNTC2 se puede detectar para la identificación de un sujeto que se ha de tratar. Por ejemplo, se puede determinar la cantidad de proteína KNTC2 (p. ej., SEQ ID NO: 79). Los ejemplos de métodos para determinar la cantidad de la proteína KNTC2 como el producto de traducción incluyen, aunque sin limitarse a ello, métodos de inmunoensayo que usan un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína KNTC2. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Asimismo, cualquier fragmento o modificación (p. ej., anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo se puede usar para detección, siempre y cuando el fragmento o anticuerpo modificado retenga la capacidad de unión a la proteína KNTC2. Los métodos para preparar cualquiera de estas clases de anticuerpos se conocen en la técnica, y se puede emplear cualquier método para preparar dichos anticuerpos y sus equivalentes.

Como otro método para detectar el nivel de expresión de KNTC2 basado en su producto de traducción, la intensidad de la tinción se puede medir con análisis de inmunohistoquímica que emplean un anticuerpo contra la proteína KNTC2. A saber, en esta medición, una tinción fuerte indica mayor presencia/nivel de la proteína KNTC2 y, al mismo tiempo, mayor nivel de expresión de KNTC2.

Se puede determinar el nivel de expresión del gen KNTC2 en una muestra derivada de un sujeto como para ser aumentado si el nivel de expresión aumenta del nivel control (p. ej., el nivel de expresión en células normales) de KNTC2 en, por ejemplo, 10%, 25% o 50%; o aumenta más de 1,1 vez, más de 1,5 veces, más de 2,0 veces, más de 5,0 veces, más de 10,0 veces, o más.

El nivel control se puede determinar al mismo tiempo que las células cancerosas usando una muestra(s) previamente recogida y conservada de un sujeto/sujetos sanos. Además, las células normales obtenidas de regiones no cancerosas de un órgano que presenta el cáncer que se ha de tratar se pueden usar como el control normal. Alternativamente, el nivel control se puede determinar por un método estadístico en base a los resultados obtenidos analizando el nivel o los niveles de expresión previamente determinados de KNTC2 en muestras de sujetos cuyos estados de enfermedad se conocen. Asimismo, el nivel control puede derivar de una base de datos de patrones de expresión de células previamente ensayadas. Asimismo, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, el nivel de expresión de KNTC2 en una muestra biológica se puede comparar con múltiples niveles control, que se determinan a partir de múltiples muestras de referencia. Se prefiere usar un nivel control determinado a partir de una muestra de referencia derivada de un tipo de tejido similar a aquel de la muestra biológica derivada del sujeto. Asimismo, se prefiere usar el valor estándar de los niveles de expresión del gen KNTC2 en una población con un estado de enfermedad conocida. El valor estándar se puede obtener por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un intervalo de media $\pm$ 2 S.D. o mediana $\pm$ 3 S.D. como el valor estándar.

En el contexto de la presente invención, un nivel control determinado a partir de una muestra biológica que se conoce por ser no canceroso se denomina "nivel control normal". Por otra parte, si el nivel control se determina a partir de una muestra biológica cancerosa, se denomina "nivel control canceroso".

La diferencia entre un nivel de expresión de la muestra y un nivel control se puede normalizar al nivel de expresión de ácidos nucleicos control, p. ej., genes constitutivos, cuyos niveles de expresión se conocen por diferir dependiendo del estado canceroso o no canceroso de la célula. Los genes control ilustrativos incluyen, aunque sin limitarse a ello, beta-actina, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa y proteína ribosomal P1.

- 5 Cuando el nivel de expresión de KNTC2 aumenta en comparación con el nivel control normal, el sujeto se puede identificar como un sujeto con cáncer a tratar por administración de una composición farmacéutica o agente de la presente invención.

También se describe en este documento un método para seleccionar a un sujeto para el tratamiento del cáncer usando composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención, en donde dicho método incluye las etapas de:

- 10 a) determinar el nivel de expresión de KNTC2 en una muestra(s) biológica obtenida de un sujeto con cáncer;
- b) comparar el nivel de expresión de KNTC2 determinado en la etapa a) con un nivel control normal; y c) seleccionar al sujeto para tratamiento del cáncer por las composiciones o agentes farmacéuticos de la presente invención, si el nivel de expresión de KNTC2 aumenta en comparación con el nivel control normal.

- 15 Dicho método puede además incluir la etapa de identificar a un sujeto que tiene un HLA-A2 (es decir, un sujeto HLA-A2 positivo) después o antes de las etapas a) a c) anteriormente definidas. Los métodos para tipificar HLA se conocen en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar métodos basados en PCR para tipificar alelos de HLA. Los anticuerpos contra HLA-A2 son también herramientas apropiadas para identificar tipos de HLA de un sujeto.

20 En una realización, la presente invención da a conocer además un kit diagnóstico que incluye uno o más péptidos de la presente invención.

El cáncer se puede diagnosticar detectando anticuerpos contra uno o más péptidos de la presente invención en una muestra derivada del sujeto (p. ej., sangre, tejido) usando un péptido de la presente invención.

- 25 Se sospecha que el sujeto padece cáncer, si la muestra derivada de un sujeto (p. ej., muestra de sangre) contiene anticuerpos contra un péptido de la presente invención y se determina que la cantidad de los anticuerpos es más que el valor umbral en comparación con el nivel control.

30 En otra realización, un kit diagnóstico de la presente invención puede incluir un péptido de la presente invención y una molécula de HLA unida a este. El método para detectar CTL específicos de antígenos usando péptidos antigénicos y moléculas de HLA ya se ha establecido (por ejemplo, Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6). Por lo tanto, el complejo del péptido de la presente invención y la molécula de HLA pueden aplicarse al método de detección para detectar CTL específicos de antígenos tumorales, permitiendo así la detección más temprana de recurrencia y/o metástasis del cáncer. Asimismo, se puede emplear para la selección de sujetos aplicables con las composiciones farmacéuticas que incluyen un péptido de la presente invención como ingrediente activo, o la evaluación del efecto del tratamiento de las composiciones farmacéuticas.

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

40 También se describen en este documento agentes diagnósticos y métodos para evaluar la respuesta inmunológica de un sujeto usando el péptido de la presente invención. Los péptidos de la presente invención se pueden usar como reactivos para evaluar o predecir una respuesta inmune de un sujeto. La respuesta inmune que se ha de evaluar se induce poniendo en contacto un inmunógeno (es decir, el péptido de la presente invención) con células inmunocompetentes *in vitro* o *in vivo*. Las células inmunocompetentes para evaluar una respuesta inmunológica se pueden seleccionar entre sangre periférica, linfocitos de sangre periférica (PBL) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los métodos para obtener o aislar dichas células inmunocompetentes se conocen en la técnica. Cualquier agente que puede resultar en la producción de CTL específicos de antígenos que reconocen y se unen al epítipo(s) de péptido se puede emplear como el reactivo. No es necesario que el reactivo de péptido se use como el inmunógeno. Los sistemas de ensayo que se usan para dicho análisis incluyen desarrollos técnicos relativamente recientes tales como ensayos de tinción de tetrámeros, tinción para linfocinas intracelulares y ensayos de liberación de interferón, o ensayos ELISPOT. Las células inmunocompetentes que se han de contactar con el reactivo de péptido pueden ser células presentadoras de antígenos, incluidas células dendríticas.

55 Por ejemplo, los péptidos de la presente invención se pueden usar en ensayos de tinción de tetrámeros para evaluar las células mononucleares de sangre periférica para la presencia de CTL específicos de antígenos que le sigue a la exposición a un antígeno de célula tumoral o un inmunógeno. El complejo tetramérico de HLA se puede usar para visualizar directamente los CTL específicos de antígenos (ver, p. ej., Ogg et al., Science 279 : 2103-2106, 1998 ;

y Altman et al, Science 174 : 94-96, 1996) y determinar la frecuencia de la población de CTL específica de antígenos en una muestra de células mononucleares de sangre periférica. Un reactivo de tetrámero que usa un péptido de la invención se puede generar como se describe a continuación.

Un péptido que se une a una molécula de HLA se repliega en presencia de la correspondiente cadena pesada de HLA y beta 2-microglobulina para generar un complejo trimolecular. En el complejo, el carboxilo terminal de la cadena pesada se biotinila en un sitio que se modificó genéticamente previamente en la proteína. Luego se añade estreptavidina al complejo para formar un tetrámero compuesto por el complejo trimolecular y estreptavidina. Mediante la estreptavidina marcada en forma fluorescente, se puede usar el tetrámero para teñir células específicas de antígenos. Las células pueden luego identificarse, por ejemplo, por citometría de flujo. Dicho análisis se puede usar para fines de diagnóstico o pronóstico. Las células identificadas por el procedimiento pueden también usarse para fines terapéuticos.

Los péptidos de la presente invención pueden también usarse para elaborar anticuerpos, usando técnicas conocidas en el campo (ver, p. ej., CURRENT PROTOCOLS IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY ; y Antibodies A Laboratory Manual, Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), que son útiles como reactivos para diagnosticar o monitorear cáncer. Dichos anticuerpos pueden incluir aquellos que reconocen un péptido en el contexto de una molécula de HLA, es decir, anticuerpos que se unen a un complejo de péptido-MHC.

Los péptidos y composiciones de la presente invención poseen un número de usos adicionales, algunos de los cuales se describen en este documento. Por ejemplo, se describe en este documento un método para diagnosticar o detectar un trastorno caracterizado por expresión de un polipéptido de KNTC2.

Por ejemplo, el diagnóstico se puede efectuar con un método que permite la cuantificación directa de células T específicas de antígenos, tiñendo con complejos multiméricos de HLA marcados con fluoresceína (por ejemplo, Altman, J. D. et al., 1996, Science 274 : 94; Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90 : 10330 ;). Los ensayos de tinción de linfocinas intracelulares y liberación de interferón gamma o ensayos ELISPOT también se han dado a conocer. La tinción de tetrámeros, tinción de linfocinas intracelulares y los ensayos ELISPOT parecen ser todos por lo menos 10 veces más sensibles que los ensayos más convencionales (Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8 : 177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186 : 859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8 : 413;). Los pentámeros (p. ej., documento US 2004-209295A), dextrámeros (p. ej., documento WO 02/072631) y estreptámeros (p. ej., Nature medicine 6. 631-637 (2002)) también se pueden utilizar.

Por ejemplo, se describe en este documento un método para diagnosticar o evaluar una respuesta inmunológica de un sujeto al que se le administra por lo menos un péptido KNTC2 de la presente invención, en donde el método incluye las etapas de:

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

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

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

En el contexto de la presente invención, el inmunógeno preferiblemente incluye por lo menos uno de (a) un péptido KNTC2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y péptidos en los que dichas secuencias de aminoácidos se han modificado con 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. Mientras tanto, las condiciones adecuadas de inducción de CTL específicos de inmunógenos se conocen en la técnica. Por ejemplo, las células inmunocompetentes se pueden cultivar *in vitro* bajo la presencia de uno o más inmunógenos para inducir CTL específicos de inmunógenos. Con el fin de inducir CTL específicos de inmunógenos, se puede añadir cualquier factor estimulante al cultivo celular. Por ejemplo, IL-2 consiste en factores estimulantes preferibles para la inducción de CTL.

En algunas realizaciones, la etapa de monitorear o evaluar la respuesta inmunológica de un sujeto que se ha de tratar con terapia para el cáncer de péptidos se puede llevar a cabo antes, durante y/o después del tratamiento. En general, durante un protocolo de terapia del cáncer, los péptidos inmunogénicos se administran repetidas veces a un sujeto que se ha de tratar. Por ejemplo, los péptidos inmunogénicos se pueden administrar cada semana durante 3-10 semanas. Por consiguiente, la respuesta inmunológica del sujeto se puede evaluar o monitorear durante el protocolo de la terapia del cáncer. Alternativamente, la etapa de evaluación o monitoreo de la respuesta inmunológica a la terapia del cáncer puede tener lugar al finalizar el protocolo de la terapia.

De acuerdo con la presente invención, la inducción potenciada de los CTL específicos de inmunógenos en comparación con un control indica que el sujeto a evaluar o diagnosticar inmunológicamente respondió al inmunógeno(s) que se le ha administrado. Los controles adecuados para evaluar la respuesta inmunológica pueden incluir, por ejemplo, un nivel de inducción de CTL cuando las células inmunocompetentes no se ponen en contacto con ningún péptido, o se ponen en contacto con el péptido(s) control que tiene secuencias de aminoácidos distintas de los péptidos KNTC2. (p. ej., secuencia de aminoácidos aleatoria).

XII. Anticuerpos:

La presente invención da a conocer además anticuerpos que se unen a los péptidos de la presente invención. Los anticuerpos preferidos se unen específicamente a los péptidos de la presente invención y no se unen (o se unen en forma débil) a otros péptidos. Los anticuerpos contra los péptidos de la invención pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico y pronóstico del cáncer. De manera similar, dichos anticuerpos pueden ser útiles en el tratamiento, diagnóstico y/o pronóstico de cáncer. Asimismo, los anticuerpos expresados en forma intracelular (p. ej., anticuerpos monocatenarios) pueden ser terapéuticamente útiles para tratar cáncer en donde está implicada la expresión de KNTC2, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular.

También se describen en este documento diversos ensayos inmunológicos para la detección y/o cuantificación de la proteína KNTC2 (SEQ ID NO: 79) o sus fragmentos, incluidos péptidos que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En el contexto de la presente invención, los anticuerpos anti-KNTC2 que se unen a un polipéptido KNTC2 reconocen el péptido que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 7. La especificidad de unión del anticuerpo se puede confirmar mediante un ensayo de inhibición. Es decir, cuando se inhibe la unión entre un anticuerpo que se ha de analizar y la longitud total del polipéptido KNTC2 bajo la presencia de cualquier fragmento de polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 7, se considera que dicho anticuerpo se une específicamente al fragmento. En el contexto de la presente invención, dichos ensayos inmunológicos se llevan a cabo dentro de diversos formatos de ensayos inmunológicos conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, varios tipos de radioinmunoensayos, técnica inmunocromatográfica, ensayos inmunoabsorbentes de unión enzimática (ELISA), ensayos inmunofluorescentes de unión enzimática (ELIFA) y similares.

Los ensayos inmunológicos relacionados pero no de anticuerpos pueden además incluir ensayos de inmunogenicidad de células T (inhibidoras o estimulantes) además de ensayos de unión MHC. A su vez, también se contemplan métodos de obtención de imágenes inmunológicas capaces de detectar cáncer que expresa KNTC2, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, métodos de obtención de imágenes radioscintigráficos que emplean los anticuerpos etiquetados de la presente invención. Dichos ensayos encuentran uso clínico en la detección, monitoreo y pronóstico de cáncer que expresa KNTC2, cuyos ejemplos incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos.

Un anticuerpo de la invención se puede usar en cualquier forma, por ejemplo como anticuerpo monoclonal o policlonal, y puede además incluir anticuerpos obtenidos inmunizando a un animal como un conejo con el péptido de la invención, todas las clases de anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados producidos por recombinación genética.

Un anticuerpo de la presente invención puede reconocer péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Los métodos para sintetizar oligopéptidos se conocen en la técnica. Después de la síntesis, los péptidos pueden opcionalmente purificarse antes de usarse como inmunógenos. En el contexto de la presente invención, el oligopéptido (p. ej., 9 o 10 mer) se puede conjugar o enlazar con vehículos que potencian la inmunogenicidad. Se conoce la hemocianina de lapa californiana (KLH) como el vehículo. Los métodos para conjugar KLH y péptido se conocen en la técnica.

Alternativamente, un gen que codifica un péptido de la invención o su fragmento se puede insertar en un vector de expresión conocido, que se usa luego para transformar una célula hospedante descrita en este documento. Su péptido deseado se puede recuperar del exterior o interior de las células por cualquier método estándar, y posteriormente se puede usar como antígeno. Alternativamente, las células enteras que expresan el péptido o sus lisados o un péptido químicamente sintetizado se pueden usar como el antígeno.

Se puede inmunizar a cualquier animal mamífero con el antígeno, aunque preferiblemente se toma en cuenta la compatibilidad con las células parentales utilizadas para la fusión celular. En general, se pueden utilizar los animales de Rodentia, Lagomorpha o Primates. Los animales de la familia Rodentia incluyen, por ejemplo, ratón, rata y hámster. Los animales de la familia Lagomorpha incluyen, por ejemplo, conejo. Los animales de la familia Primate incluyen, por ejemplo, un mono de Catarrhini (mono del viejo mundo) como Macaca fascicularis, mono rhesus, babuino sagrado y chimpancé.

Los métodos para inmunizar a animales con antígenos se conocen en la técnica. La inyección intraperitoneal o la inyección subcutánea de antígenos es un método convencional para la inmunización de mamíferos. Más concretamente, los antígenos se pueden diluir y suspender en una cantidad adecuada de disolución salina tamponada con fosfato (PBS), disolución fisiológica, etc. Si se desea, la suspensión de antígeno se puede mezclar con una cantidad apropiada de un adyuvante estándar, como adyuvante completo de Freund, convertirse a una

emulsión y luego administrarse a animales mamíferos. Preferiblemente, le siguen varias administraciones de antígeno mezclado con una cantidad apropiada de adyuvante incompleto de Freund cada 4 a 21 días. Un vehículo apropiado también se puede usar para inmunización. Después de la inmunización anterior, se puede examinar el suero con un método convencional para comprobar el incremento de los anticuerpos deseados.

- 5 Los anticuerpos policlonales contra los péptidos de la presente invención se pueden preparar extrayendo sangre del mamífero inmunizado para el incremento de los anticuerpos deseados en el suero, y separando el suero de la sangre mediante cualquier método convencional. Los anticuerpos policlonales pueden incluir suero que contenga anticuerpos policlonales, y además la fracción que contiene los anticuerpos policlonales se puede aislar del suero. Se puede preparar inmunoglobulina G o M a partir de una fracción que reconozca solamente el péptido de la
10 presente invención usando, por ejemplo, una columna de afinidad acoplada con el péptido de la presente invención, y además purificando esta fracción con el uso de una columna de proteína A o proteína G.

- Para preparar los anticuerpos monoclonales para uso en el contexto de la presente invención, se recogen células inmunes del mamífero inmunizado con el antígeno y se comprueba el aumento del nivel de los anticuerpos deseados en el suero como se describió precedentemente, y se someten a fusión celular. Las células inmunes
15 usadas para la fusión celular pueden preferiblemente obtenerse del bazo. Otras células parentales preferidas que se pueden condensar con el inmunocito anteriormente mencionado incluyen, por ejemplo, células de mieloma de mamíferos, y más preferiblemente células de mieloma que tienen una propiedad adquirida para la selección de células condensadas por fármacos.

- Los inmunocitos y las células de mieloma descritos anteriormente se puede condensar de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein et al. (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).
20

- Los hibridomas resultantes obtenidos por fusión celular se pueden seleccionar cultivándolos en un medio de selección estándar, como medio HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo celular típicamente continúa en el medio HAT por varios días a varias semanas, en donde el tiempo es suficiente para permitir que todas las demás células, con la excepción del hibridoma deseado (células no condensadas), mueran.
25 Luego, se puede efectuar dilución limitante estándar para cribar y clonar una célula de hibridoma que produzca el anticuerpo deseado.

- Además del método anteriormente mencionado, en donde un animal no humano es inmunizado con un antígeno para preparar hibridoma, se pueden inmunizar linfocitos tales como aquellos infectados por el virus EB con un péptido, células que expresan péptido o sus lisados *in vitro*. Luego los linfocitos inmunizados se pueden condensar
30 con células de mieloma derivadas de seres humanos capaces de dividirse indefinidamente como U266, para dar un hibridoma que produce un anticuerpo humano deseado capaz de unirse al péptido (solicitud de patente japonesa publicada, no examinada JPS 63-17688).

- Los hibridomas obtenidos pueden entonces trasplantarse en forma subsiguiente en la cavidad abdominal de un ratón, y puede extraerse la ascitis. Los anticuerpos monoclonales obtenidos se pueden purificar, por ejemplo, por
35 precipitación de sulfato de amonio, una columna de proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico DEAE o una columna de afinidad a la cual se acopla un péptido de la presente invención. Un anticuerpo de la presente invención se puede usar para purificación y detección de un péptido de la presente invención, pero también como candidatos agonistas y/o antagonistas de un péptido de la presente invención.

- Los anticuerpos monoclonales así obtenidos pueden además prepararse de manera recombinante usando técnicas de modificación genética (ver, por ejemplo, Borrebaeck y Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1990)). Por ejemplo, un ADN que codifica un anticuerpo se puede clonar de una célula inmune, como un hibridoma o un linfocito inmunizado que produce el anticuerpo, insertarse en un vector apropiado e introducirse en células hospedantes para preparar un anticuerpo recombinante. La presente invención da a conocer también anticuerpos recombinantes preparados como se describió anteriormente.
40

- Un anticuerpo de la presente invención puede ser un fragmento de un anticuerpo o anticuerpo modificado, siempre y cuando se una al péptido de la invención. Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo puede ser Fab, F(ab')₂, Fv o Fv monocaténario (scFv), en donde los fragmentos Fv de las cadenas H y L se ligan mediante un enlazador apropiado (Huston et al., *Proc Natl Acad Sci EE, UU.* 85: 5879-83 (1988)). Más concretamente, un fragmento de anticuerpo se puede generar tratando un anticuerpo con una enzima, como papaína o pepsina. Alternativamente, se puede
50 construir un gen que codifica el fragmento de anticuerpo, insertarse en un vector de expresión y expresarse en una célula hospedante apropiada (ver, por ejemplo, Co et al., *J Immunol* 152: 2968-76 (1994); Better y Horwitz, *Methods Enzymol* 178: 476-96 (1989); Pluckthun y Skerra, *Methods Enzymol* 178: 497-515 (1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., *Methods Enzymol* 121: 663-9 (1986); Bird y Walker, *Trends Biotechnol* 9: 132-7 (1991)).

- Un anticuerpo se puede modificar por conjugación con una diversidad de moléculas, como polietilenglicol (PEG). La presente invención da a conocer dichos anticuerpos modificados. El anticuerpo modificado se puede obtener modificando químicamente un anticuerpo. Estos métodos de modificación son convencionales en el campo.
55

Alternativamente, un anticuerpo de la presente invención se puede obtener como anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de un anticuerpo no humano y la región constante derivada de anticuerpo humano, o como anticuerpo humanizado, incluida la región determinante de complementariedad (CDR) derivada de anticuerpo no humana, la región marco (FR) y la región constante derivada de anticuerpo humano. Dichos anticuerpos se pueden preparar de acuerdo con tecnología conocida. La humanización se puede llevar a cabo sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por las CDR o secuencias CDR de roedores (ver, p. ej., Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988)). Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en donde sustancialmente menos que el dominio variable intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana.

También se pueden utilizar anticuerpos totalmente humanos incluidas regiones variables humanas además de regiones marco humanas y constantes. Dichos anticuerpos se pueden producir usando varias técnicas conocidas en el campo. Por ejemplo, métodos *in vitro* que implican el uso de bibliotecas recombinantes de fragmentos de anticuerpo humano exhibidas en bacteriófago (p. ej., Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)). De modo similar, los anticuerpos humanos se pueden preparar introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, p. ej., ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Este planteamiento se describe, p. ej., en las patentes de EE. UU. núm. 6.150.584, 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016.

Los anticuerpos obtenidos como anteriormente se pueden purificar hasta lograr homogeneidad. Por ejemplo, la separación y purificación del anticuerpo se puede lograr de acuerdo con los métodos de separación y purificación utilizados para proteínas generales. Por ejemplo, el anticuerpo se puede separar y aislar mediante el uso apropiadamente seleccionado y combinado de cromatografías de columna, tales como cromatografía de afinidad, filtro, ultrafiltración, diálisis de desalado, electroforesis de gel de poliacrilamida SDS y focalización isoelectrica (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero sin limitarse a esto. Se puede usar una columna de proteína A y una columna de proteína G como la columna de afinidad. Las columnas de proteína A ilustrativas que se han de utilizar incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharose F.F. (Pharm)

Los ejemplos de técnicas cromatográficas adecuadas, con la excepción de cromatografía de afinidad, incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Los procedimientos cromatográficos se pueden llevar a cabo por cromatografía de fase de líquidos, como HPLC y FPLC.

Por ejemplo, el ensayo inmunoabsorbente de unión enzimática (ELISA) para medición de absorbancia, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) y/o inmunofluorescencia se pueden usar para medir la actividad de unión al antígeno del anticuerpo de la invención. En ELISA, el anticuerpo de la presente invención se inmoviliza en una placa, se aplica un péptido de la invención a la placa y luego se aplica una muestra que contiene un anticuerpo deseado, como sobrenadante de cultivo de células que producen anticuerpos o anticuerpos purificados. Después se aplica un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario etiquetado con una enzima, como fosfatasa alcalina, y se incuba la placa. Luego, después de lavar, un sustrato de enzima, como p-nitrofenil fosfato, se añade a la placa, y se mide la absorbancia para evaluar la actividad de unión al antígeno de la muestra. Se puede usar BIAcore (Pharmacia) para evaluar la actividad del anticuerpo de la presente invención.

XIII. Vectores y células hospedantes:

También se describen en este documento vectores y células hospedantes en los cuales se introduce un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención. Un vector es útil como vehículo de polinucleótidos, especialmente ADN, de la presente invención en una célula hospedante, para expresar un péptido de la presente invención, o para administrar un polinucleótido de la presente invención para terapia génica.

Cuando se selecciona *E. coli* como la célula hospedante y el vector se amplía y produce en gran cantidad en *E. coli* (p. ej., JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1Azul), el vector debe tener un "ori" adecuado para ampliación en *E. coli* y un gen marcador para seleccionar *E. coli* transformada (p. ej., un gen de resistencia a los fármacos seleccionado por un fármaco tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol o similar). Por ejemplo, se pueden emplear los vectores de la serie M13, los vectores de la serie pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, etc. Además, pGEM-T, pDIRECT y pT7 también se pueden emplear para subclonar y extraer ADNc, además de los vectores descritos precedentemente. Cuando se emplea un vector para producir el péptido de la presente invención, puede ser útil un vector de expresión. Por ejemplo, un vector de expresión que se ha de expresar en *E. coli* debe tener las características anteriores para ampliarse en *E. coli*. Cuando *E. coli*, como JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1 Azul, se usan como célula hospedante, el vector debe tener un promotor, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), promotor araB (Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)), promotor T7 o similar, que pueda expresar eficientemente el gen deseado en *E. coli*. En ese sentido, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "sistema QIAexpress" (Qiagen), pEGFP y pET (en este caso, el hospedante es preferiblemente BL21 que expresa ARN polimerasa T7), por ejemplo, se pueden usar en lugar de los vectores antes mencionados. Asimismo, el vector puede además contener una secuencia de señal para la segregación del péptido. Una secuencia de señal ilustrativa

que dirige el péptido que se ha de segregar al periplasma de *E. coli* es la secuencia de señal pelB (Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987)). Los medios para introducir los vectores en las células hospedantes diana incluyen, por ejemplo, el método de cloruro de calcio y el método de electroporación.

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

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

En lo sucesivo, la presente invención se describe en más detalle con referencia a los Ejemplos. No obstante, si bien los siguientes materiales, métodos y ejemplos pueden servir para ayudar al experto en la técnica a preparar y usar ciertas realizaciones de la presente invención, solamente tienen como fin ilustrar aspectos de la presente invención y por lo tanto no limitan en modo alguno el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Experimental 1

Materiales y métodos

Líneas celulares

C1R, HLA-A, la línea celular linfoblastoide mutante B negativa y COS7, la línea celular de riñón de mono verde africano, se adquirieron de ATCC.

Generación de las células estimuladoras que expresan en forma estable HLA-A*0201

Se usó la línea celular estable C1R que expresa HLA-A*0201 (C1R-A02) como células estimuladoras. Para generar la línea celular estable, se efectuó electroporación a 1350V, 20ms pulso y 3 veces por el sistema de transfección Neon (Invitrogen). Los constructos de HLA-A*0201 se transfectaron con el vector pcDNA3.1 (Invitrogen) que porta el gen de resistencia a neomicina. Para seleccionar células establemente transfectadas, se inició la selección G418 (Invitrogen) el día 2 después de la transfección. Dos semanas después del cultivo, las células se dispusieron en una placa de 96 pocillos que contenía medio de cultivo enriquecido con G418. Treinta días después de disponer en las placas, se analizó la expresión de HLA-A*0201 de las células proliferativas por FACS (BD Biosciences).

Selección de péptidos candidatos derivados de KNTC2

Se pronosticaron péptidos 9-mer y 10-mer derivados de KNTC2 que se unen a la molécula HLA-A*0201 usando el servidor para pronóstico de unión "NetMHC3.2" (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus et al., Tissue Antigens. 2003 Nov, 62(5):378-84; Nielsen et al., Protein Sci. 2003 Mayo, 12(5):1007-17, Bioinformatics. 2004 Jun 12;20(9):1388-97). Estos péptidos se sintetizaron por Biosynthesis (Lewisville, Texas) de acuerdo con un método de síntesis de fase sólida estándar y se purificaron por cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa (HPLC). La pureza (>90%) y la identidad de los péptidos se determinaron por HPLC analítico y análisis de espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en dimetilsulfóxido a 20 mg/ml y se conservaron a -80 grados C.

Inducción de CTL *in vitro*

Se usaron células dendríticas (DC) derivadas de monocitos como las células presentadoras de antígenos para inducir respuestas de los linfocitos T citotóxicos (CTL) contra péptidos presentados en antígeno de leucocito humano (HLA). Las DC se generaron *in vitro* como se describió en otra parte (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8). Concretamente, células mononucleares aisladas de sangre periférica de un voluntario normal (HLA-A*0201 positivo) con disolución Ficoll-Paque plus (Pharmacia) se separaron por adherencia a una placa de cultivo de tejido plástica (Becton Dickinson) como para enriquecerlas como la fracción de monocitos. La población enriquecida de monocitos se cultivó en presencia de 1000 IU/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (R&D System) y 1000 IU/ml de interleucina (IL)-4 (R&D System) en medio AIM-V (Invitrogen) que contenía 2% suero autólogo termoinactivado (AS). Después de 7 días de cultivo, las DC inducidas con citocinas se

pulsaron con 20 micro g/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en presencia de 3 micro g/ml de beta 2-microglobulina durante 3 horas a 37 grados C en medio AIM-V. Las células generadas parecieron expresar moléculas asociadas a DC, como CD80, CD83, CD86 y HLA clase II, en sus superficies celulares (no se muestran los datos). Estas DC pulsadas con péptido se inactivaron luego por irradiación de rayos X (20 Gy) y se mezclaron en una relación 1:20 con células CD8+ T autólogas, obtenidas por selección positiva con el Kit de Aislamiento Positivo CD8 (Dynal). Estos cultivos se fijaron en placas de 48 pocillos (Corning); cada pocillo contenía $1,5 \times 10^4$ DC pulsadas con péptido, 3×10^5 células CD8+ T y 10 ng/ml de IL-7 (R&D System) en 0,5 ml de medio AIM-V/2% AS. Tres días más tarde, estos cultivos se enriquecieron con IL-2 (CHIRON) hasta una concentración final de 20 IU/ml. El día 7 y el día 14, las células T se estimularon además con las DC pulsadas con péptido autólogas. Las DC se prepararon cada vez de la misma forma que se describió anteriormente. Se ensayó el CTL contra las células C1R-A02 pulsadas con péptido después de la tercera tanda de estimulación con péptido del día 21 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Ene 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Abr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dic 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Ago, 96(8): 498-506).

Procedimiento de expansión de CTL

Los CTL se expandieron en cultivo usando el método similar al descrito por Riddell et al. (Walter 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). Un total de 5×10^4 CTL se suspendieron en 25 ml de medio AIM-V/5% AS con 2 tipos de líneas celulares B-linfoblastoides humanas, inactivadas por Mitomicina C, en presencia de 40 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 monoclonal (Pharmingen). Un día después de iniciar los cultivos, se añadieron 120 IU/ml de IL-2 a los cultivos. Los cultivos se alimentaron con medio AIM-V/5% AS nuevo que contenía 30 IU/ml de IL-2 los días 5, 8 y 11 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Enero 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Abr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dic 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 Mayo, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Agosto, 96(8): 498-506).

Establecimiento de clones CTL

Se efectuaron diluciones para tener 0,3, 1 y 3 CTL/pocillo en una placa de microtitulación con fondo redondo de 96 pocillos (Nalge Nunc International). Los CTL se cultivaron con 1×10^4 células/pocillo de 2 clases de líneas celulares B-linfoblastoides humanas, 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 y 125 IU/ml de IL-2 en un total de 150 micro l/pocillo de medio AIM-V que contenía 5%AS. Se añadieron 50 micro l/pocillo de IL-2 al medio 10 días después hasta alcanzar una concentración final de 125 IU/ml IL-2. Se ensayó la actividad de los CTL el día 14, y los clones de CTL se expandieron usando el mismo método que se describió previamente (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dic 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 Mayo, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Ago, 96(8): 498-506).

Actividad de los CTL específica

Para examinar la actividad de los CTL específica, se llevaron a cabo los ensayos de IFN-gamma ELISPOT y de IFN-gamma ELISA. Se prepararon células C1R-A02 pulsadas con péptido (1×10^4 /pocillo) como células estimuladoras. Las células cultivadas en placas de 48 pocillos, las líneas de CTL y los clones CTL se usaron como células respondedoras. El ensayo IFN-gamma ELISPOT e IFN-gamma ELISA se efectuaron de conformidad con el procedimiento del fabricante.

Establecimiento de las células que expresan forzosamente uno o ambos genes diana y HLA-A*0201

El ADNc que codifica un marco de lectura abierto de genes diana o HLA-A*0201 se amplió por PCR. El producto ampliado por PCR se clonó en un vector de expresión. Los plásmidos se transfectaron en COS7, que consiste en los genes diana y línea celular nula HLA-A*0201, usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) de conformidad con el procedimiento del fabricante. Después de 2 días de la transfección, las células transfectadas se cosecharon con versene (Invitrogen) y se usaron como células estimuladoras (5×10^4 células/pocillo) para el ensayo de actividad de CTL.

Resultados

Pronóstico de péptidos de unión a HLA-A*0201 derivados de KNTC2

Las Tablas 1a y 1b muestran los péptidos 9mer y 10mer de unión a HLA-A02 de KNTC2 en el orden de gran afinidad de unión. Se seleccionó y examinó un total de 76 péptidos con una capacidad de unión a HLA-A02 potencial para determinar los péptidos de epítipo.

[Tabla 1a]

Péptidos 9mer de unión a HLA-A*0201 derivados de KNTC2
--

ES 2 739 693 T3

Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
330	GLNEEIARV	14	1
131	FLYGFLCPS	19	2
181	IVAALVWLI	21	3
274	ALNEQIARL	25	4
549	GLSEAMNEL	30	5
327	KLNGLNEEI	59	6
184	ALVWLIDCI	98	7
588	MVATHVGSV	124	8
464	LLNETEEEI	126	9
599	HLEEQIAKV	127	10
323	ILDQKLNGL	162	11
581	NLQRLLEMV	182	12
355	IIDNQKYSV	289	13
91	FIQQCIRQL	325	14
449	CLVKYRAQV	356	15
176	HTWPHIVAA	451	16
127	KIFTFLYGF	454	17
481	GLEDTLEQL	458	18
180	HIVAALVWL	478	19
417	KLARKLCLI	550	20
218	GIMHNKLFL	831	21
163	ALSKSSMYT	1032	22
585	LLEMVATHV	1060	23
72	GIFSSSEKI	1498	24
411	QLAEYHKLA	1592	25
129	FTFLYGFLC	1659	26

Péptidos 9mer de unión a HLA-A*0201 derivados de KNTC2			
Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
410	TQLAEYHKL	1725	27
560	VQREYQLVV	1938	28
564	YQLVVQTTT	2253	29
492	MITESKRSV	3246	30
502	TLKEEVQKL	3280	31
534	SLEKHKHLL	3460	32
485	TLEQLNAMI	3546	33
316	NLESHSAIL	4545	34
361	YSVADIERI	4545	35

[Tabla 1b]

Péptidos 10mer de unión a HLA-A*0201 derivados de KNTC2			
Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
584	RLLEMVATHV	24	36
131	FLYGFLCPSY	37	37
313	YMSNLESHSA	51	38
393	KL WNEELKY A	55	39
163	ALSKSSMYTV	56	40
127	KIFTFLYGFL	135	41
125	FLKIFTFLYG	164	42
354	NIIDNQKYSV	245	43
113	SMKSLQAPSV	305	44
491	AMITESKRSV	410	45
463	ELLNETEEEI	532	46
180	HIVAALVWLI	564	47
187	WLIDCIKIHT	586	48

ES 2 739 693 T3

Péptidos 10mer de unión a HLA-A*0201 derivados de KNTC2			
Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
162	FALSKSSMYT	668	49
614	CMSEDLSENI	879	50
256	DLFNVDFAKL	1047	51
509	KLDDLYQQK1	1133	52
322	AILDQKLNGL	1184	53
15	SMQELRSQDV	1270	54
183	AALVWLIDCI	1330	55
541	LLESTVNQGL	1339	56
133	YGFLCPSYEL	1489	57
223	KLFLDYTIKC	1616	58
273	RALNEQIARL	1618	59
225	FLDYTIKCYE	1778	60
587	EMVATHVGSV	1815	61
135	FLCPSYELPD	1826	62
228	YTIKCYESFM	2153	63
253	KLKDLFNVDA	2196	64
129	FTFLYGFLCP	2494	65
581	NLQRLLEMVA	2681	66
168	SMYTVGAPHT	2717	67
185	LVWLIDCIKI	2778	68
176	HTWPHIVAAL	3257	69
155	FKDLGYPFAL	3439	70
259	NVDAFKLESL	3792	71
236	FMSGADSFDE	4152	72
219	IMHNLFLDY	4307	73

Péptidos 10mer de unión a HLA-A*0201 derivados de KNTC2			
Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
327	KLNGLNEEIA	4308	74
298	KLKASLQGDV	4873	75
580	NNLQRLLEMV	4935	76

La posición inicial indica el número de residuos de aminoácidos desde el término N de la constante de disociación de KNTC2 [Kd (nM)] que deriva de "NetMHC3.2".

Inducción de CTL con los péptidos pronosticados de KNTC2 restringidos con HLA-A*0201

- 5 Los CTL para esos péptidos derivados de KNTC2 se generaron de acuerdo con los protocolos descritos en "Materiales y métodos". La actividad de los CTL específica de péptidos se detectó con el ensayo de IFN-gamma ELISPOT (Figura 1). Los números de pocillo #8 con KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), #4 con KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b), #7 con KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c), #5 con KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17) (d), #3 con KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41) (e), #2 con KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53) (f) y #6 con KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68) (g) demostraron producción de IFN-gamma potente en comparación con los pocillos control. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica por estimulación con otros péptidos que se muestran en las Tablas 1a y b, a pesar de que dichos péptidos tuvieron el potencial de actividad de unión con HLA-A*0201. Como es típico de datos negativos, no se observó ninguna producción de IFN-gamma específica de los CTL estimulados con KNTC-A02-9-330 (SEQ ID NO: 1) (h). Tomados juntos, estos resultados sugieren que los 7
- 10 péptidos seleccionados derivaos de KNTC2 pueden inducir CTL potentes.
- 15

Establecimiento de la línea y el clon de CTL contra el péptido derivado de KNTC2

- Se expandieron las células que demostraron actividad de CTL específica del péptido detectada por el ensayo de IFN-gamma ELISPOT en los números de pocillo #8 con KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), #4 con KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b) y #7 con KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c) y se establecieron las líneas de CTL. La actividad de CTL de esas líneas de CTL se midió por IFN-gamma ELISA (Figure 2). Esas líneas de CTL demostraron producción potente de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el correspondiente péptido en comparación con células diana sin pulso de péptido. Asimismo, se establecieron clones de CTL limitando la dilución de las líneas de CTL como se describe en "Materiales y métodos", y la producción de IFN-gamma de los clones de CTL contra las células C1R-A02 pulsadas con el correspondiente péptido se midió con IFN-gamma ELISA. Se observó producción potente de IFN-gamma de los clones de CTL estimulados con KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b) y KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c) (Figura 3).
- 20
- 25

Actividad de CTL específica contra células diana que expresan KNTC2 y HLA-A*0201

- Se examinó la capacidad de la línea de CTL establecida contra el péptido KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) de reconocer células diana que expresan KNTC2 y la molécula HLA-A*0201. Se prepararon células COS7 transfectadas con la longitud total de KNTC2 y el gen HLA-A*0201 (un modelo específico para las células diana que expresan KNTC2 y el gen HLA-A*0201) como células estimuladoras, y las células COS7 transfectadas o bien con la longitud total de KNTC2 o HLA-A*0201 se usaron como controles. En la Figura 4, la línea de CTL estimulada con KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) demostró actividad potente de CTL contra células COS7 que expresan tanto KNTC2 como HLA-A*0201. Por otra parte, no se detectó actividad de CTL específica importante contra los
- 30
- 35
- controles. Por consiguiente, estos datos demuestran claramente que el péptido KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) se procesa de manera endógena y se expresa en células diana con la molécula HLA-A*0201 y es reconocido por los CTL. Estos resultados indican que este péptido derivado de KNTC2 puede estar disponible para aplicar a vacunas contra el cáncer en pacientes con tumores que expresan KNTC2.

Análisis de homología de los péptidos antigénicos

- Los CTL estimulados con KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3), KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7), KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17), KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41), KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53) y KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68) son homólogos al péptido derivado de otras moléculas conocidas por sensibilizar el sistema inmune humano. Para excluir esta posibilidad, se efectuaron análisis de homología para estas secuencias de péptidos usando como consultas (*queries*) el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) que no reveló ninguna secuencia con homología significativa. Los resultados de los análisis de homología indican que las secuencias de KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2), KNTC2-
- 40
- 45

A02-9-181 (SEQ ID NO: 3), KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7), KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17), KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41), KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53) y KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68) son únicas y, por lo tanto, existe poca posibilidad, según nuestros conocimientos, de que estas moléculas produzcan una respuesta inmunológica no intencional a alguna molécula no relacionada.

- 5 En conclusión, los nuevos péptidos de epítomos HLA-A*0201 derivados de KNTC2 identificados en este documento pueden ser útiles en el campo de la inmunoterapia del cáncer.

Aplicabilidad industrial

- 10 La presente invención da a conocer nuevos péptidos de epítomos derivados de KNTC2 que pueden inducir respuestas inmunes antitumorales potentes y específicas y que tienen aplicabilidad para una amplia variedad de tipos de cáncer. Dichos péptidos pueden ser útiles como vacunas de péptidos contra enfermedades asociadas con KNTC2, p. ej., cáncer, más particularmente cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y tumores de tejidos blandos.
- 15 Si bien la presente invención se describe en este documento en detalle y con referencia a sus realizaciones específicas, se ha de entender que la descripción anterior es ilustrativa y no explicativa por naturaleza, y está destinada a ilustrar la presente invención y sus realizaciones preferidas como se define en las reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
 <120> PÉPTIDOS KNTC2 Y VACUNAS QUE LOS CONTIENEN
 <130> ONC-A1304P
 5 <150> US 61/777.334
 <151> 2013-03-12
 <160> 84
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 15 <400> 1
 Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala Arg Val
 1 5
 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 2
 Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser
 1 5
 25 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 3
 Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile
 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 4
 Ala Leu Asn Glu Gln Ile Ala Arg Leu
 1 5

5 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 5
 Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu
 1 5

<210> 6
 <211> 9

15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 6

20 Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 7

Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile
 1 5

<210> 8

30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 8
Met Val Ala Thr His Val Gly Ser Val
1 5
<210> 9
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> un péptido derivado de KNTC2
<400> 9
Leu Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile
10 1 5
<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> un péptido derivado de KNTC2
<400> 10
His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val
1 5
<210> 11
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> un péptido derivado de KNTC2
25 <400> 11
Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu
1 5
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> un péptido derivado de KNTC2
<400> 12
Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val
1 5
35 <210> 13

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 13
 Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val
 1 5
 <210> 14
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 14
 Phe Ile Gln Gln Cys Ile Arg Gln Leu
 15 1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 15
 Cys Leu Val Lys Tyr Arg Ala Gln Val
 1 5
 <210> 16
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 30 <400> 16
 His Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala
 1 5
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 17
Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe
1 5
<210> 18
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> un péptido derivado de KNTC2
<400> 18
Gly Leu Glu Asp Thr Leu Glu Gln Leu
10 1 5
<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> un péptido derivado de KNTC2
<400> 19
His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu
1 5
<210> 20
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> un péptido derivado de KNTC2
25 <400> 20
Lys Leu Ala Arg Lys Leu Lys Leu Ile
1 5
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> un péptido derivado de KNTC2
<400> 21
Gly Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu
1 5
35 <210> 22
<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de KNTC2

5 <400> 22

Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 23

Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His Val

1 5

15 <210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 24

Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile

1 5

<210> 25

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 25

Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu Ala

30 1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 26

Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys
 1 5
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 27
 Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu
 1 5
 10 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 28
 Val Gln Arg Glu Tyr Gln Leu Val Val
 1 5
 <210> 29
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 29
 Tyr Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Thr
 25 1 5
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 30
 Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val
 1 5
 <210> 31
 35 <211> 9
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 31

Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu

5 1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

$\langle 220 \rangle$

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 32

Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu

1 5

<210> 33

15 $\langle 211 \rangle$ 9

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> un péptido derivado de KNTC2

20 <400> 33

<400> 33

Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile

1 5

<210> 34

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 34

Asn Leu Glu Ser His Ser Ala Ile Leu

1 5

30 $\langle 210 \rangle$ 35

<210> 35

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

35 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 35

Tyr Ser Val Ala Asp Ile Glu Arg Ile
 1 5
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 36
 Arg Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His Val
 1 5 10
 10 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 37
 Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr
 1 5 10
 <210> 38
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 38
 Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His Ser Ala
 25 1 5 10
 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 39
 Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys Tyr Ala
 1 5 10
 <210> 40
 35 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 40

Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr Val
5 1 5 10

<210> 41

$\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 $\langle 220 \rangle$

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 41

Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu
1 5 10

<210> 42

15 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> un péptido derivado de KNTC2

20 <400> 42

Phe Leu Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly
1 5 10

<210> 43

$\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 43

```

Asn Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val
1           5           10

```

30 <210> 44

$\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

35 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 44

Ser Met Lys Ser Leu Gln Ala Pro Ser Val
 1 5 10
 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 45
 Ala Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val
 1 5 10
 10 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 46
 Glu Leu Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 47
 His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile
 25 1 5 10
 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 48
 Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile His Thr
 1 5 10
 <210> 49
 35 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 49

5 Phe Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr
 1 5 10

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 50

 Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile
 1 5 10

<210> 51

15 <211> 10

 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de KNTC2

20 <400> 51

 Asp Leu Phe Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu
 1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 52

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

30 <210> 53

 <211> 10

 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 53

Ala Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu
1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 54

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

10 <210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 55

Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile
1 5 10

<210> 56

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 56

Leu Leu Glu Ser Thr Val Asn Gln Gly Leu
25 1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 57

Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu
1 5 10

<210> 58

<211> 10

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 58

Lys	Leu	Phe	Leu	Asp	Tyr	Thr	Ile	Lys	Cys
1				5					10

5 <210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 59

Arg	Ala	Leu	Asn	Glu	Gln	Ile	Ala	Arg	Leu
1				5					10

<210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 60

Phe	Leu	Asp	Tyr	Thr	Ile	Lys	Cys	Tyr	Glu
1				5					10

20 <210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 61

Glu	Met	Val	Ala	Thr	His	Val	Gly	Ser	Val
1				5					10

<210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 62

Phe	Leu	Cys	Pro	Ser	Tyr	Glu	Leu	Pro	Asp
1				5					10

35

<210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 63
 Tyr Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met
 1 5 10
 <210> 64
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 15 <400> 64
 Lys Leu Lys Asp Leu Phe Asn Val Asp Ala
 1 5 10
 <210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 65
 Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro
 1 5 10
 25 <210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 66
 Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 67
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 67
 Ser Met Tyr Thr Val Gly Ala Pro His Thr
 1 5 10
 5 <210> 68
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 68
 Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 69
 His Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala Leu
 20 1 5 10
 <210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 70
 Phe Lys Asp Leu Gly Tyr Pro Phe Ala Leu
 1 5 10
 <210> 71
 30 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 35 <400> 71
 Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu
 1 5 10

<210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 72
 Phe Met Ser Gly Ala Asp Ser Phe Asp Glu
 1 5 10
 <210> 73
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 15 <400> 73
 Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 74
 Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala
 1 5 10
 25 <210> 75
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> un péptido derivado de KNTC2
 <400> 75
 Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln Gly Asp Val
 1 5 10
 <210> 76
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de KNTC2

<400> 76

Asn	Asn	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Glu	Met	Val
1				5					10

5 <210> 77

<211> 2209

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 77

ES 2 739 693 T3

actgcgcgcg tcgtgcgtaa tgacgtcagc gccggcggag aattttcaaat tcgaacggct	60
ttggcggggcc gaggaaggac ctggtgtttt gatgaccgct gtcctgtcta gcagatactt	120
gcacggttta cagaaattcg gtccctgggt cgtgtcagga aactggaaaa aaggtcataa	180
gcatgaagcg cagttcagtt tccagcggcg gtgctggccg cctctccatg caggagttaa	240
gatcccagga tgtaaataaa caaggcctct ataccctca aaccaaagag aaaccaacct	300
ttggaaagtt gagtataaac aaaccgacat ctgaaagaaa agtctcgcta tttggcaaaa	360
gaactagtgg acatggatcc cggaatagtc aacttggtat attttccagt tctgagaaaa	420
tcaaggaccc gagaccactt aatgacaaag cattcattca gcagtgtatt cgacaactct	480
gtgagtttct tacagaaaat ggttatgcac ataatgtgtc catgaaatct ctacaagctc	540
cctctgttaa agacttcctg aagatcttca catttcttta tggcttcctg tgcccctcat	600
acgaacttcc tgacacaaag tttgaagaag aggttccaag aatctttaa gaccttgggt	660
atccttttgc actatccaaa agctccatgt acacagtggg ggctcctcat acatggcctc	720
acattgtggc agccttagtt tggctaatag actgcatcaa gatacatact gccatgaaag	780
aaagctcacc tttatattgat gatgggcagc cttggggaga agaaactgaa gatggaatta	840
tgcataataa gttgtttttg gactacacca taaaatgcta tgagagtttt atgagtggcg	900
ccgacagctt tgatgagatg aatgcagagc tgcagtcaaa actgaaggat ttatttaatg	960
tggatgcttt taagctggaa tcattagaag caaaaaacag agcattgaat gaacagattg	1020
caagattgga acaagaaaga gaaaaagaac cgaatcgtct agagtcgttg agaaaactga	1080
aggcttcctt acaaggagat gttcaaaagt atcaggcata catgagcaat ttggagtctc	1140
attcagccat tcttgaccag aaattaaatg gtctcaatga ggaaattgct agagtagaac	1200
tagaatgtga aacaataaaa caggagaaca ctcgactaca gaatatcatt gacaaccaga	1260
agtactcagt tgcagacatt gagcgaataa atcatgaaag aaatgaattg cagcagacta	1320
ttaataaatt aaccaaggac ctggaagctg aacaacagaa gttgtggaat gaggagttaa	1380
aatatgccag aggcaaagaa gcgattgaaa cacaattagc agagtatcac aaattggcta	1440
gaaaattaaa acttattcct aaagggtgctg agaattccaa aggttatgac tttgaaatta	1500

ES 2 739 693 T3

```

agtttaatcc cgaggctggt gccaaactgcc ttgtcaaata cagggctcaa gtttatgtac 1560
ctcttaagga actcctgaat gaaactgaag aagaaattaa taaagcccta aataaaaaaa 1620
tgggtttgga ggatacttta gaacaattga atgcaatgat aacagaaagc aagagaagtg 1680
tgagaactct gaaagaagaa gttcaaaagc tggatgatct ttaccaacaa aaaattaagg 1740
aagcagagga agaggatgaa aaatgtgccg gtgagcttga gtccttggag aaacacaagc 1800
acctgctaga aagtactgtt aaccaggggc tcagtgaagc tatgaatgaa ttagatgctg 1860
ttcagcggga ataccaacta gttgtgcaaa ccacgactga agaaagacga aaagtgggaa 1920
ataacttgca acgtctgtta gagatggttg ctacacatgt tgggtctgta gagaaacatc 1980
ttgaggagca gattgctaaa gttgatagag aatatgaaga atgcatgtca gaagatctct 2040
cggaaaatat taaagagatt agagataagt atgagaagaa agctactcta attaagtctt 2100
ctgaagaatg aagataaaat gttgatcatg tatatatatc catagtgaat aaaattgtct 2160
cagtaaagtg taaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 2209

```

<210> 78

<211> 2150

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (105)..(2033)

<400> 78

```

ctcgagccac gaaggcccg ctgtcctgtc tagcagatac ttgcacggtt tacagaaatt 60
cggctccctgg gtcgtgtcag gaaactggaa aaaaggtcat aagc atg aag cgc agt 116
                               Met Lys Arg Ser
                               1

tca gtt tcc agc ggt ggt gct ggc cgc ctc tcc atg cag gag tta aga 164
Ser Val Ser Ser Gly Gly Ala Gly Arg Leu Ser Met Gln Glu Leu Arg
5 10 15 20

tcc cag gat gta aat aaa caa ggc ctc tat acc cct caa acc aaa gag 212
Ser Gln Asp Val Asn Lys Gln Gly Leu Tyr Thr Pro Gln Thr Lys Glu
25 30 35

aaa cca acc ttt gga aag ttg agt ata aac aaa ccg aca tct gaa aga 260
Lys Pro Thr Phe Gly Lys Leu Ser Ile Asn Lys Pro Thr Ser Glu Arg
40 45 50

aaa gtc tcg cta ttt ggc aaa aga act agt gga cat gga tcc cgg aat 308
Lys Val Ser Leu Phe Gly Lys Arg Thr Ser Gly His Gly Ser Arg Asn
55 60 65

agt caa ctt ggt ata ttt tcc agt tct gag aaa atc aag gac ccg aga 356
Ser Gln Leu Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile Lys Asp Pro Arg
70 75 80

```

10

ES 2 739 693 T3

cca ctt aat gac aaa gca ttc att cag cag tgt att cga caa ctc tgt Pro Leu Asn Asp Lys Ala Phe Ile Gln Gln Cys Ile Arg Gln Leu Cys 85 90 95 100	404
gag ttt ctt aca gaa aat ggt tat gca cat aat gtg tcc atg aaa tct Glu Phe Leu Thr Glu Asn Gly Tyr Ala His Asn Val Ser Met Lys Ser 105 110 115	452
cta caa gct ccc tct gtt aaa gac ttc ctg aag atc ttc aca ttt ctt Leu Gln Ala Pro Ser Val Lys Asp Phe Leu Lys Ile Phe Thr Phe Leu 120 125 130	500
tat ggc ttc ctg tgc ccc tca tac gaa ctt cct gac aca aag ttt gaa Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Thr Lys Phe Glu 135 140 145	548
gaa gag gtt cca aga atc ttt aaa gac ctt ggg tat cct ttt gca cta Glu Glu Val Pro Arg Ile Phe Lys Asp Leu Gly Tyr Pro Phe Ala Leu 150 155 160	596
tcc aaa agc tcc atg tac aca gtg ggg gct cct cat aca tgg cct cac Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr Val Gly Ala Pro His Thr Trp Pro His 165 170 175 180	644
att gtg gca gcc tta gtt tgg cta ata gac tgc atc aag ata cat act Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile His Thr 185 190 195	692
gcc atg aaa gaa agc tca cct tta ttt gat gat ggg cag cct tgg gga Ala Met Lys Glu Ser Ser Pro Leu Phe Asp Asp Gly Gln Pro Trp Gly 200 205 210	740
gaa gaa act gaa gat gga att atg cat aat aag ttg ttt ttg gac tac Glu Glu Thr Glu Asp Gly Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu Asp Tyr 215 220 225	788
acc ata aaa tgc tat gag agt ttt atg agt ggt gcc gac agc ttt gat Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met Ser Gly Ala Asp Ser Phe Asp 230 235 240	836
gag atg aat gca gag ctg cag tca aaa ctg aag gat tta ttt aat gtg Glu Met Asn Ala Glu Leu Gln Ser Lys Leu Lys Asp Leu Phe Asn Val 245 250 255 260	884
gat gct ttt aag ctg gaa tca tta gaa gca aaa aac aga gca ttg aat Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu Glu Ala Lys Asn Arg Ala Leu Asn 265 270 275	932
gaa cag att gca aga ttg gaa caa gaa aga gaa aaa gaa ccg aat cgt Glu Gln Ile Ala Arg Leu Glu Gln Glu Arg Glu Lys Glu Pro Asn Arg 280 285 290	980
cta gag tcg ttg aga aaa ctg aag gct tcc tta caa gga gat gtt caa Leu Glu Ser Leu Arg Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln Gly Asp Val Gln 295 300 305	1028
aag tat cag gca tac atg agc aat ttg gag tct cat tca gcc att ctt Lys Tyr Gln Ala Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His Ser Ala Ile Leu 310 315 320	1076
gac cag aaa tta aat ggt ctc aat gag gaa att gct aga gta gaa cta Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala Arg Val Glu Leu 325 330 335 340	1124

ES 2 739 693 T3

gaa tgt gaa aca ata aaa cag gag aac act cga cta cag aat atc att Glu Cys Glu Thr Ile Lys Gln Glu Asn Thr Arg Leu Gln Asn Ile Ile 345 350 355	1172
gac aac cag aag tac tca gtt gca gac att gag cga ata aat cat gaa Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val Ala Asp Ile Glu Arg Ile Asn His Glu 360 365 370	1220
aga aat gaa ttg cag cag act att aat aaa tta acc aag gac ctg gaa Arg Asn Glu Leu Gln Gln Thr Ile Asn Lys Leu Thr Lys Asp Leu Glu 375 380 385	1268
gct gaa caa cag aag ttg tgg aat gag gag tta aaa tat gcc aga ggc Ala Glu Gln Gln Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys Tyr Ala Arg Gly 390 395 400	1316
aaa gaa gcg att gaa aca caa tta gca gag tat cac aaa ttg gct aga Lys Glu Ala Ile Glu Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu Ala Arg 405 410 415 420	1364
aaa tta aaa ctt att cct aaa ggt gct gag aat tcc aaa ggt tat gac Lys Leu Lys Leu Ile Pro Lys Gly Ala Glu Asn Ser Lys Gly Tyr Asp 425 430 435	1412
ttt gaa att aag ttt aat ccc gag gct ggt gcc aac tgc ctt gtc aaa Phe Glu Ile Lys Phe Asn Pro Glu Ala Gly Ala Asn Cys Leu Val Lys 440 445 450	1460
tac agg gct caa gtt tat gta cct ctt aag gaa ctc ctg aat gaa act Tyr Arg Ala Gln Val Tyr Val Pro Leu Lys Glu Leu Leu Asn Glu Thr 455 460 465	1508
gaa gaa gaa att aat aaa gcc cta aat aaa aaa atg ggt ttg gag gat Glu Glu Glu Ile Asn Lys Ala Leu Asn Lys Lys Met Gly Leu Glu Asp 470 475 480	1556
act tta gaa caa ttg aat gca atg ata aca gaa agc aag aga agt gtg Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val 485 490 495 500	1604
aga act ctg aaa gaa gaa gtt caa aag ctg gat gat ctt tac caa caa Arg Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu Asp Asp Leu Tyr Gln Gln 505 510 515	1652
aaa att aag gaa gca gag gaa gag gat gaa aaa tgt gcc agt gag ctt Lys Ile Lys Glu Ala Glu Glu Glu Asp Glu Lys Cys Ala Ser Glu Leu 520 525 530	1700
gag tcc ttg gag aaa cac aag cac ctg cta gaa agt act gtt aac cag Glu Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu Glu Ser Thr Val Asn Gln 535 540 545	1748
ggg ctc agt gaa gct atg aat gaa tta gat gct gtt cag cgg gaa tac Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu Asp Ala Val Gln Arg Glu Tyr 550 555 560	1796
caa cta gtt gtg caa acc acg act gaa gaa aga cga aaa gtg gga aat Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Glu Glu Arg Arg Lys Val Gly Asn 565 570 575 580	1844
aac ttg caa cgt ctg tta gag atg gtt gct aca cat gtt ggg tct gta Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His Val Gly Ser Val 585 590 595 600	1892

ES 2 739 693 T3

	585	590	595	
	gag aaa cat ctt gag gag cag att gct aaa gtt gat aga gaa tat gaa			1940
	Glu Lys His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val Asp Arg Glu Tyr Glu			
	600	605	610	
	gaa tgc atg tca gaa gat ctc tcg gaa aat att aaa gag att aga gat			1988
	Glu Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile Lys Glu Ile Arg Asp			
	615	620	625	
	aag tat gag aag aaa gct act cta att aag tct tct gaa gaa tga			2033
	Lys Tyr Glu Lys Lys Ala Thr Leu Ile Lys Ser Ser Glu Glu			
	630	635	640	
	agataaaatg ttgatcatgt atatatatcc atagtgaata aaattgtctc agtaaaaaaa			2093
	aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa			2150
<210>	79			
<211>	642			
<212>	PRT			
5 <213>	Homo sapiens			
<400>	79			
	Met Lys Arg Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Ala Gly Arg Leu Ser Met			
	1 5 10 15			
	Gln Glu Leu Arg Ser Gln Asp Val Asn Lys Gln Gly Leu Tyr Thr Pro			
	20 25 30			
	Gln Thr Lys Glu Lys Pro Thr Phe Gly Lys Leu Ser Ile Asn Lys Pro			
	35 40 45			
	Thr Ser Glu Arg Lys Val Ser Leu Phe Gly Lys Arg Thr Ser Gly His			
	50 55 60			
	Gly Ser Arg Asn Ser Gln Leu Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile			
	65 70 75 80			
	Lys Asp Pro Arg Pro Leu Asn Asp Lys Ala Phe Ile Gln Gln Cys Ile			
	85 90 95			
	Arg Gln Leu Cys Glu Phe Leu Thr Glu Asn Gly Tyr Ala His Asn Val			
	100 105 110			
	Ser Met Lys Ser Leu Gln Ala Pro Ser Val Lys Asp Phe Leu Lys Ile			
	115 120 125			
	Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu Pro Asp			
	130 135 140			
	Thr Lys Phe Glu Glu Glu Val Pro Arg Ile Phe Lys Asp Leu Gly Tyr			

ES 2 739 693 T3

145		150		155		160
Pro Phe Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr Val Gly Ala Pro His						
		165		170		175
Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile						
		180		185		190
Lys Ile His Thr Ala Met Lys Glu Ser Ser Pro Leu Phe Asp Asp Gly						
		195		200		205
Gln Pro Trp Gly Glu Glu Thr Glu Asp Gly Ile Met His Asn Lys Leu						
		210		215		220
Phe Leu Asp Tyr Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met Ser Gly Ala						
		225		230		240
Asp Ser Phe Asp Glu Met Asn Ala Glu Leu Gln Ser Lys Leu Lys Asp						
		245		250		255
Leu Phe Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu Glu Ala Lys Asn						
		260		265		270
Arg Ala Leu Asn Glu Gln Ile Ala Arg Leu Glu Gln Glu Arg Glu Lys						
		275		280		285
Glu Pro Asn Arg Leu Glu Ser Leu Arg Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln						
		290		295		300
Gly Asp Val Gln Lys Tyr Gln Ala Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His						
		305		310		315
Ser Ala Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala						
		325		330		335
Arg Val Glu Leu Glu Cys Glu Thr Ile Lys Gln Glu Asn Thr Arg Leu						
		340		345		350
Gln Asn Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val Ala Asp Ile Glu Arg						
		355		360		365
Ile Asn His Glu Arg Asn Glu Leu Gln Gln Thr Ile Asn Lys Leu Thr						
		370		375		380
Lys Asp Leu Glu Ala Glu Gln Gln Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys						
		385		390		400

ES 2 739 693 T3

Tyr Ala Arg Gly Lys Glu Ala Ile Glu Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His
405 410 415

Lys Leu Ala Arg Lys Leu Lys Leu Ile Pro Lys Gly Ala Glu Asn Ser
420 425 430

Lys Gly Tyr Asp Phe Glu Ile Lys Phe Asn Pro Glu Ala Gly Ala Asn
435 440 445

Cys Leu Val Lys Tyr Arg Ala Gln Val Tyr Val Pro Leu Lys Glu Leu
450 455 460

Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile Asn Lys Ala Leu Asn Lys Lys Met
465 470 475 480

Gly Leu Glu Asp Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile Thr Glu Ser
485 490 495

Lys Arg Ser Val Arg Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu Asp Asp
500 505 510

Leu Tyr Gln Gln Lys Ile Lys Glu Ala Glu Glu Glu Asp Glu Lys Cys
515 520 525

Ala Ser Glu Leu Glu Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu Glu Ser
530 535 540

Thr Val Asn Gln Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu Asp Ala Val
545 550 555 560

Gln Arg Glu Tyr Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Thr Glu Glu Arg Arg
565 570 575

Lys Val Gly Asn Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His
580 585 590

Val Gly Ser Val Glu Lys His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val Asp
595 600 605

Arg Glu Tyr Glu Glu Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile Lys
610 615 620

Glu Ile Arg Asp Lys Tyr Glu Lys Lys Ala Thr Leu Ile Lys Ser Ser
625 630 635 640

Glu Glu

<210> 80

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> un cebador PCR para el análisis del TCR

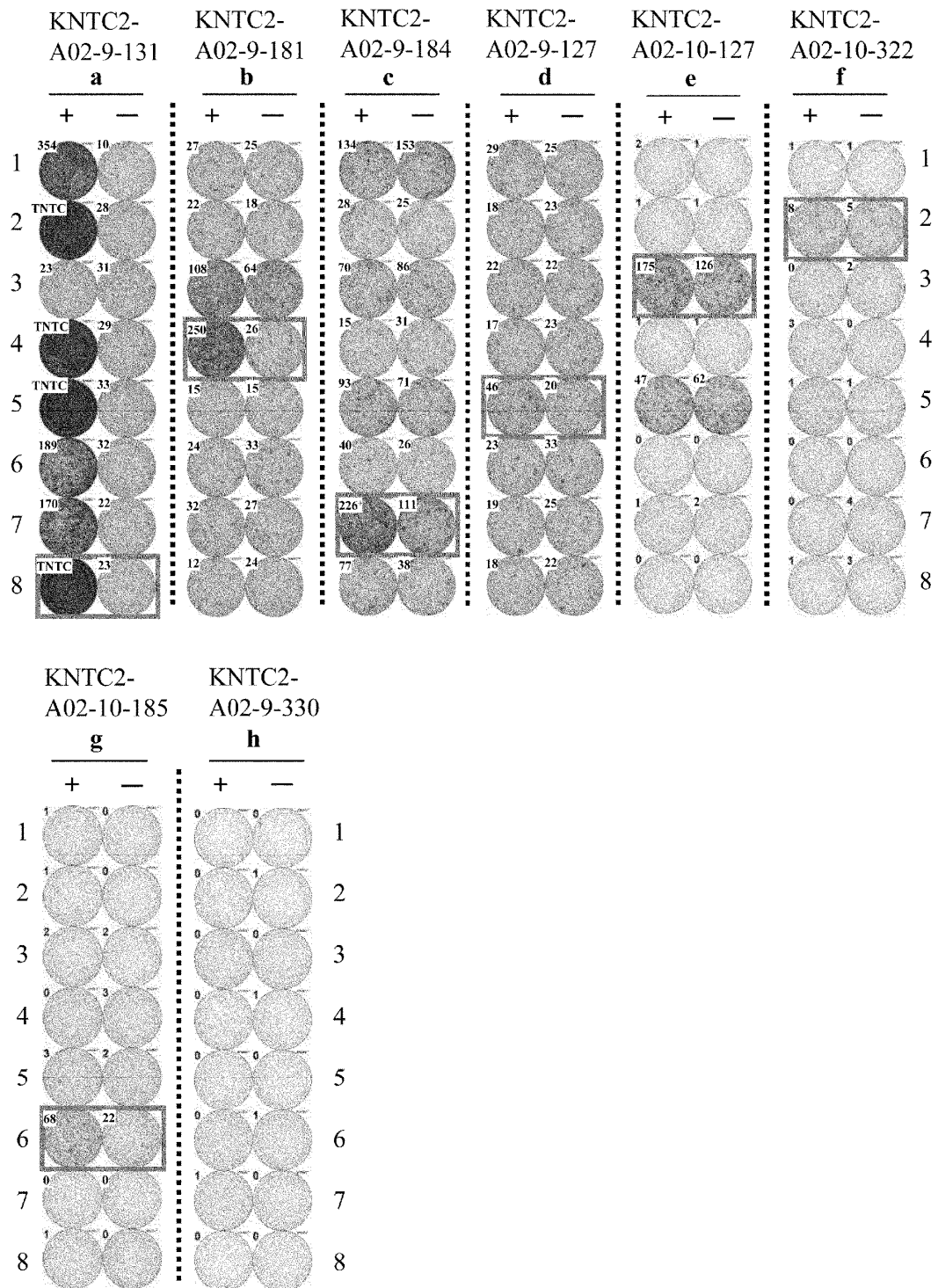
<400> 80
 gtctaccagg cattcgcttc at 22
 <210> 81
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un cebador PCR para el análisis del TCR
 <400> 81
 10 tcagctggac cacagccgca gcgt 24
 <210> 82
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> un cebador PCR para el análisis TCR
 <400> 82
 tcagaaatcc ttctcttga c 21
 <210> 83
 20 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> un cebador PCR para el análisis del TCR
 25 <400> 83
 ctagcctctg gaatcctttc tctt 24
 <210> 84
 <211> 4
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente
 <400> 84
 Asn Lys Arg Lys
 1
 35

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos que tiene la capacidad de inducir un linfocito(s) T citotóxico (CTL), en donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre (a) o (b) a continuación:
 - (a) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- 5 (b) una secuencia de aminoácidos en donde 1 o 2 aminoácidos se sustituyen y/o añaden en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
2. El péptido según la reivindicación 1, en donde el péptido tiene una o ambas de las siguientes características:
 - (a) el segundo aminoácido del término N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se sustituye con metionina; y
- 10 (b) el aminoácido C-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se sustituye con valina o leucina.
3. El péptido según la reivindicación 1, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
4. Un polinucleótido aislado que codifica el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una composición que comprende por lo menos un ingrediente activo seleccionado del grupo que consiste en:
 - 15 (a) el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
 - (b) el polinucleótido según la reivindicación 4;
 - (c) una célula presentadora de antígenos (APC) que presenta el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en su superficie;
 - (d) un exosoma que presenta el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en su superficie; y
- 20 (e) un CTL que dirige el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de cáncer, y/o la prevención de su recurrencia posoperatoria, en donde la composición comprende por lo menos un ingrediente activo seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
- 25 (b) el polinucleótido según la reivindicación 4;
- (c) una APC que presenta el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en su superficie;
- (d) un exosoma que presenta el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en su superficie; y
- (e) un CTL que puede reconocer una célula que presenta el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30 7. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 6, en donde la composición farmacéutica se formula para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2.
8. Un método *in vitro* para inducir una APC que tiene la capacidad de inducir uno o más CTL, en donde el método comprende la etapa seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) poner en contacto una APC con el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, e
- 35 (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una APC.
9. Un método *in vitro* para inducir un CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
 - 40 (a) co-cultivar una célula T CD8 positiva con una APC que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
 - (b) co-cultivar una célula T CD8 positiva con un exosoma que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

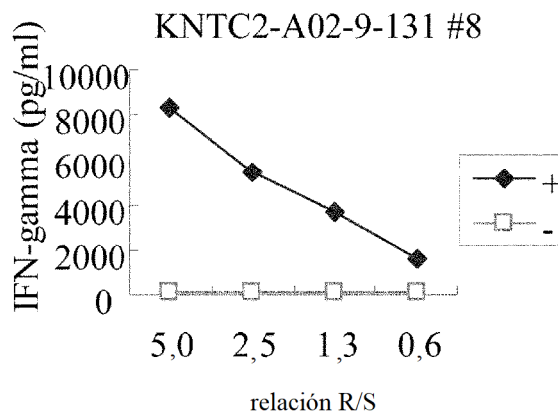
- (c) introducir en una célula T CD8 positiva un polinucleótido que codifica ambas subunidades del receptor de células T (TCR) o polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades del TCR, en donde el TCR formado por dichas subunidades puede unirse a un complejo del péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un antígeno HLA en una superficie celular.
- 5 10. Una APC aislada que presenta en su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
11. La APC según la reivindicación 10, que es inducida por el método según la reivindicación 8.
12. Un CTL aislado que dirige el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es preferiblemente inducido por el método según la reivindicación 9.
- 10 13. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un polinucleótido que codifica el péptido para uso en el tratamiento y/o la prevención de cáncer o tumores, y/o la prevención de su recurrencia posoperatoria.
14. Un anticuerpo o su fragmento inmunológicamente activo que se une específicamente al péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 15. Un método para cribar un péptido que tiene la capacidad de inducir un CTL que tiene actividad citotóxica específica contra una célula que presenta un fragmento derivado de KNTC2, en donde el método comprende las etapas de:
- (i) proporcionar una secuencia candidata que consiste en la secuencia de aminoácidos modificada sustituyendo, eliminando, insertando y/o añadiendo uno, dos o varios residuos de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos original, en donde la secuencia de aminoácidos original es SEQ ID NO: 7;
- 20 (ii) seleccionar una secuencia candidata que no tenga homología con los péptidos derivados de cualquiera de los productos génicos humanos conocidos distintos de KNTC2;
- (iii) poner en contacto un péptido que consiste en la secuencia candidata seleccionada en la etapa (ii) con una célula presentadora de antígenos;
- (iv) poner en contacto la célula presentadora de antígenos de la etapa (iii) con una célula T CD8 positiva; y
- 25 (v) identificar el péptido cuya capacidad de inducir uno o más CTL es la misma o mayor que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos original.

[Fig. 1]

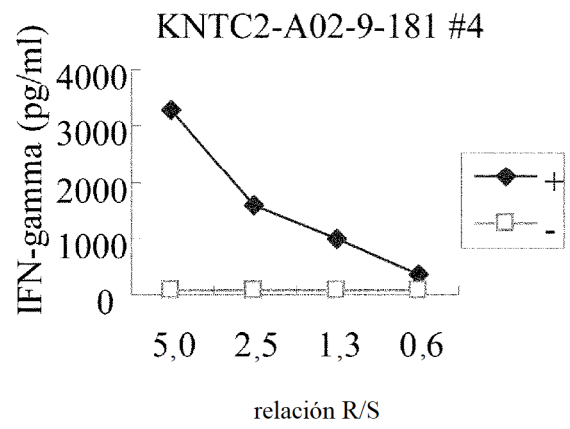


[Fig. 2]

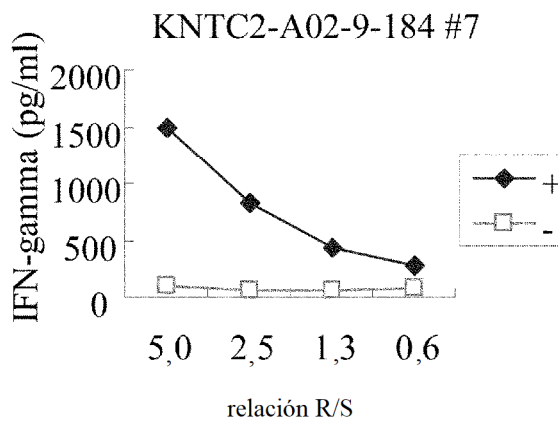
a



b

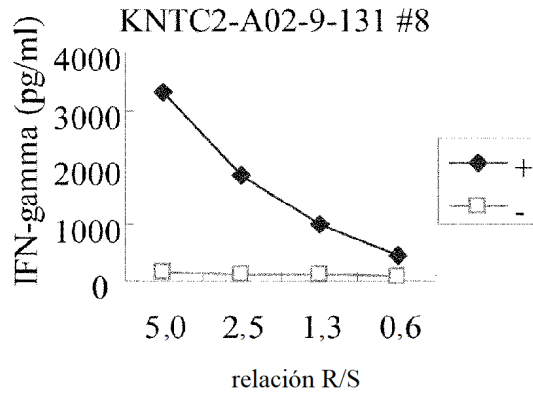


c

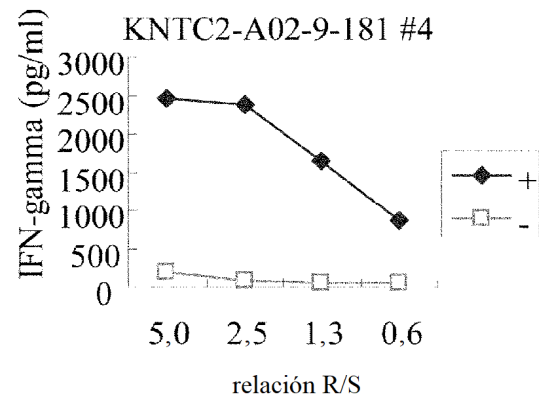


[Fig. 3]

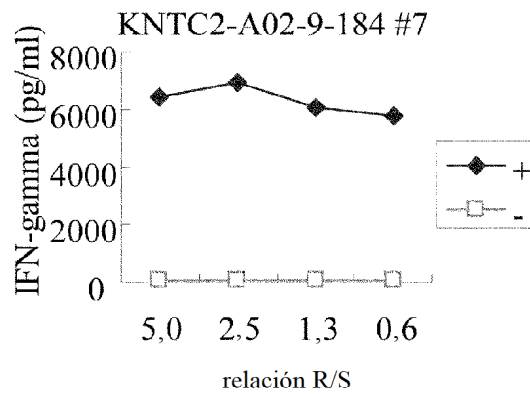
a



b



c



[Fig. 4]

