

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 862**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
C12N 9/00	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
C07K 16/40	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)
G01N 33/15	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2013 PCT/JP2013/005321**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14041784**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2013 E 13837757 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2895600**

54 Título: **Péptidos UBE2T y vacunas que los contienen**

30 Prioridad:

11.09.2012 US 201261699550 P

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

01.10.2020

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

Observaciones:

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

ES 2 784 862 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 UBE2T y vacunas que los contienen

Campo técnico

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

Prioridad

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. Nº 61/699.550, presentada el 11 de septiembre de 2012.

- 10 Técnica anterior

- 15 Se ha mostrado que los linfocitos T citotóxicos (CTLs) CD8 positivos reconocen péptidos de epítipo derivados de los antígenos asociados a tumor (TAAs) encontrados en la molécula de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y entonces destruyen las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia del antígeno del melanoma (MAGE) como primer ejemplo de TAA, se han descubierto muchos otros TAAs, principalmente mediante enfoques inmunológicos (NPL 1, 2). Algunos de estos TAAs están actualmente sometiéndose a desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas.

- 20 TAAs favorables son indispensables para la proliferación y supervivencia de células cancerosas. El uso de dichos TAAs como dianas para inmunoterapia puede minimizar el riesgo bien descrito de escape inmunitario de células cancerosas atribuible a la delección, mutación y/o regulación por disminución de TAAs como consecuencia de selección inmunitaria terapéuticamente conducida. Por consiguiente, la identificación de nuevos TAAs capaces de inducir respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas garantiza el desarrollo adicional y así está en curso la aplicación clínica de las estrategias de vacunación de péptidos para diversos tipos de cáncer (NPL 3-10). Hasta la fecha, ha habido varios informes de ensayos clínicos que usan estos péptidos derivados de TAAs. Desafortunadamente, en estos ensayos de vacuna contra el cáncer solo se ha observado una baja tasa de respuesta objetiva (NPL 11-13). Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad de nuevos TAAs como dianas inmunoterapéuticas.

- 30 UBE2T (enzima que se conjuga con ubiquitina E2T: una secuencia de aminoácidos típica mostrada en SEQ ID NO: 65; una secuencia de nucleótidos típica mostrada en SEQ ID NO: 64 (Nº de acceso de GenBank NM_014176)) es una de las enzimas que se conjugan con ubiquitina (E2). Se informó que UBE2T era uno de los genes cuya expresión se reguló por incremento en fibroblastos humanos con estimulación con suero (NPL 14). En la vía de la anemia de Fanconi, UBE2T se une a FANCL, y es necesario para la monoubiquitinación inducida por daño de ADN de FANCD2 (NPL 15-16). En estudios recientes, se encontró que UBE2T estaba frecuentemente regulada por incremento en cánceres de mama, e interaccionan con y co-localizan el complejo de la proteína de dominio RING asociado a BRCA1/ BRCA1 (BARD1) (PTL 1, NPL 17). El análisis de transferencia Northern en los estudios reveló que se detectó transcrito de UBE2T a nivel muy alto en líneas de células de cáncer de mama, pero difícilmente se detectó en los órganos vitales. Además, se ha mostrado que los silenciamientos de UBE2T endógeno por ARNiP en líneas de células cancerosas suprime significativamente el crecimiento de las líneas celulares (PTL 1-2, NPL 17). PTL 3 se refiere a antígeno de tumor que induce y/o activa los linfocitos T citotóxicos específicos de tumor restringidos por HLA-A2.

- 40 Lista de referencias

Literatura de patentes

[PTL 1] WO2005/029067

[PTL 2] WO2009/001562 [PTL 3] EP1306431

[PTL 3] EP1306431

- 45 Literatura no patente

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

[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

- 50 [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
- [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
- 5 [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
- [NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004, 10(9): 909-15
- [NPL 14] Iyer VR et al., Science 1999, 283: 83-7
- 10 [NPL 15] Machida YJ et al., Mol Cell 2006, 23: 589-96
- [NPL 16] Alpi A et al., Mol Cell Biol 2007, 27: 8421-30
- [NPL 17] Ueki T et al., Cancer Res. 2009, 69: 8752-60

Sumario de la invención

15 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de novedosos péptidos que pueden servir de dianas adecuadas de inmunoterapia. Debido a que los TAA son generalmente percibidos por el sistema inmunitario como "propios" y, por tanto, frecuentemente no tienen inmunogenicidad innata, el descubrimiento de dianas apropiadas es de extrema importancia.

Para ese fin, la presente invención se refiere, al menos en parte, a la identificación de péptidos específicos de epítipo que poseen la capacidad de inducir CTLs específicos por UBE2T entre péptidos derivados de UBE2T.

20 Los resultados desvelados en el presente documento demuestran que los péptidos identificados son péptidos de epítipo restringidos por HLA-A24 o HLA-A2 que pueden inducir respuestas inmunitarias potentes y específicas contra células que expresan UBE2T.

25 Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar péptidos derivados de UBE2T que se puedan usar para inducir CTLs *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, o para ser administrados a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular. Los péptidos preferidos son nonapéptidos y decapeptidos, más preferentemente nonapéptidos y decapeptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58. De estos, son particularmente preferidos los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58.

35 La presente invención también contempla péptidos modificados que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58 en la que 1 o 2 aminoácidos están sustituidos y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58;

en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en (i) y (ii) del siguiente modo:

- 40 (i) un péptido que tiene una o ambas de las siguientes características:
- (a) el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 está sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano; y
- 45 (b) el aminoácido del extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina; o
- (ii) un péptido que tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58 está sustituido con leucina o metionina; y

(b) el aminoácido del extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58 está sustituido con valina o leucina; y

5 en donde los aminoácidos, si se añaden, se añaden al extremo N y/o C del péptido. En una realización, cuando los péptidos originales son 9-meros (SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 29, 30, 32, 36, 38 y 41), el tamaño del péptido modificado está preferentemente en el intervalo 9 a 15 aminoácidos. Asimismo, cuando los péptidos originales son 10-meros (SEQ ID NOs: 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58), el tamaño del péptido modificado está en el intervalo 10 a 15 aminoácidos.

10 La presente invención engloba además polinucleótidos aislados que codifican uno cualquiera de los péptidos de la presente invención. Estos polinucleótidos se pueden usar para inducir o preparar células presentadoras de antígenos (APCs) capaces de inducir CTLs. Al igual que los péptidos descritos anteriormente de la presente invención, dichas APCs se pueden administrar a un sujeto para inducir respuestas inmunitarias contra cánceres.

15 Cuando se administran a un sujeto, los péptidos de la presente invención se pueden presentar preferentemente sobre la superficie de APCs para inducir CTLs que se dirigen a los péptidos respectivos. Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes o composiciones que incluyen uno o más péptidos de la presente invención, o polinucleótidos que codifican dichos péptidos. El agente o composición se puede usar para inducir un CTL. Dichos agentes o composiciones se pueden usar para el tratamiento y/o la profilaxis de un cáncer, y/o la prevención de una metástasis o reaparición posoperatoria del mismo. Los ejemplos de cánceres contemplados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular.

20 La presente invención contempla además composiciones farmacéuticas o agentes que incluyen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención. La composición farmacéutica se formula preferentemente para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de un cáncer, y/o prevención de metástasis o reaparición posoperatoria del mismo. En lugar de o además de los péptidos o polinucleótidos de la presente invención, los agentes farmacéuticos o composiciones de la presente invención pueden incluir como principios activos APCs y/o exosomas que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención.

25 Los péptidos o polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para inducir APCs que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno leucocitario humano (HLA) y un péptido de la presente invención, por ejemplo, poniendo en contacto APCs derivadas de un sujeto con el péptido de la presente invención o introduciendo un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención en APCs. Dichas APCs tienen la capacidad de inducir CTLs que reconocen específicamente células que presentan péptidos diana sobre la superficie y son útiles para la inmunoterapia contra el cáncer. Por consiguiente, la presente invención engloba los métodos para inducir APCs capaces de inducir CTLs, así como las APCs obtenidas por dichos métodos.

30 Además, la presente invención también engloba agentes o composiciones para inducir APCs capaces de inducir CTLs, incluyendo dichos agentes o composiciones cualquier péptido o polinucleótido de la presente invención.

35 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar métodos *in vitro* para inducir CTLs, incluyendo dichos métodos la etapa de co-cultivar linfocitos T CD8 positivos con APCs que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención, o la etapa de co-cultivar linfocitos T CD8 positivos con exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención. Los CTLs obtenidos por dichos métodos pueden encontrar uso en el tratamiento y/o la prevención de cánceres, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular. Por tanto, la presente invención también engloba CTLs obtenidos por los métodos anteriormente descritos.

40 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar APCs aisladas que presentan sobre la superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención. La presente invención proporciona además CTLs aislados que eligen como diana péptidos de la presente invención. Dichos CTLs también se pueden definir como CTLs que pueden reconocer (o se unen a) un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA sobre la superficie celular. Estos APCs y CTLs se pueden usar para la inmunoterapia contra el cáncer.

45 Es otro objeto más de la presente invención proporcionar una composición para su uso en inducir una respuesta inmunitaria contra un cáncer en un sujeto en necesidad de la misma, incluyendo dicha composición al menos un componente seleccionado entre un péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el mismo.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un péptido de la presente invención o una composición que comprende un péptido de la presente invención para su uso como un medicamento. La aplicabilidad de la presente invención se extiende a cualquiera de varias enfermedades referentes a o que surgen de la expresión en exceso de UBE2T, tal como cáncer, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular.

Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] Un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos capaz de inducir linfocitos T citotóxicos (CTLs), en donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos (a) o (b) a continuación:

(a) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58; o

(b) una secuencia de aminoácidos en la que 1 o 2 aminoácido(s) están sustituidos y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58;

en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en (i) y (ii) del siguiente modo:

(i) un péptido que tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 está sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano; y

(b) el aminoácido del extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina; o

(ii) un péptido que tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58 está sustituido con leucina o metionina; y

(b) el aminoácido del extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58 está sustituido con valina o leucina; y

en donde los aminoácidos, si se añaden, se añaden al extremo N y/o C del péptido

[2] El péptido de [1], en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58;

[3] Un polinucleótido aislado que codifica el péptido de [1] o [2];

[4] Una composición para inducir un CTL, en donde la composición comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) el péptido de [1] o [2];

(b) el polinucleótido de [3];

(c) una APC que presenta el péptido de [1] o [2] sobre su superficie; y

(d) un exosoma que presenta el péptido de [1] o [2] sobre su superficie;

[5] Una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/ o la prevención de una reaparición posoperatoria del mismo, en donde la composición comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) el péptido de [1] o [2];

(b) el polinucleótido de [3];

- (c) una APC que presenta el péptido de [1] o [2] sobre su superficie;
- (d) un exosoma que presenta el péptido de [1] o [2] sobre su superficie; y
- (e) un CTL que puede reconocer una célula que presenta el péptido de [1] o [2];

5 [6] La composición farmacéutica de [5], en donde la composición farmacéutica se formula para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A2;

[7] Un método *in vitro* de inducción de una APC con inducibilidad de CTLs, en donde el método comprende la etapa seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) poner en contacto una APC con el péptido de [1] o [2], y
- (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de [1] o [2] en una APC;

10 [8] Un método *in vitro* de inducción de un CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de [1] o [2]; y
- (b) co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de [1] o [2];

15 [9] Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de [1] o [2];

[10] Un CTL aislado que dirige el péptido de [1] o [2];

20 [11] Una composición para su uso en inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto, en donde la composición comprende el péptido de [1] o [2], o un polinucleótido que codifica el péptido;

25 [12] Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de [1] o [2]; preferentemente el vector está adaptado para la expresión de dicho péptido (denominado vector de expresión), por ejemplo la secuencia de nucleótidos codificante se inserta en el vector en la dirección 3' de una secuencia promotora y se une operativamente a dicho secuencia promotora. El término "se une operativamente" pretende significar que la secuencia de nucleótidos se enlaza con la secuencia promotora (secuencia reguladora) de forma que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos *in vitro* o en una célula hospedadora en la que se introduce el vector;

Breve descripción de los dibujos

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

35 [fig. 1a-l] La Figura 1a-1 está compuesta por una serie de fotografías, (a) a (l), que muestran los resultados del ensayo de inmunotransferencia por puntos asociada a enzima (ELISPOT) de interferón (IFN)-gamma en CTLs que se indujeron con péptidos derivados de UBE2T. Los CTLs en el pocillo número N° 8 estimulados con UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1) (a), N° 1 estimulados con UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO: 2) (b), N° 6 estimulados con UBE2T-A24-9-133 (SEQ ID NO: 4) (c), N° 6 estimulados con UBE2T-A24-9-138 (SEQ ID NO: 6) (d), N° 4 estimulados con UBE2T-A24-9-43 (SEQ ID NO: 11) (e), N° 2 estimulados con UBE2T-A24-9-106 (SEQ ID NO: 12) (f), N° 6 estimulados con UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO: 13) (g), N° 3 estimulados con UBE2T-A24-9-105 (SEQ ID NO: 15) (h), N° 2 estimulados con UBE2T-A24-10-130 (SEQ ID NO: 17) (i), N° 1 estimulados con UBE2T-A24-10-131 (SEQ ID NO: 19) (j), N° 3 estimulados con UBE2T-A24-10-133 (SEQ ID NO: 20) (k), y N° 6 estimulados con UBE2T-A24-10-99 (SEQ ID NO: 21) (l) mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadrado sobre el pocillo de estas imágenes indica que las células del pocillo correspondiente se expandieron para establecer líneas de CTLs. A diferencia, como caso típico de datos negativos, no se mostró producción de IFN-gamma específica de los CTLs estimulados con UBE2T-A24-9-124 (SEQ ID NO: 3) (r). En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido.

40 [fig. 1m-r] La Figura 1m-r está compuesta por una serie de fotografías, (m) a (r), que muestran los resultados del ensayo de inmunotransferencia por puntos asociada a enzima (ELISPOT) de interferón (IFN)-gamma en CTLs que se indujeron con péptidos derivados de UBE2T. Los CTLs en el pocillo número N° 7 estimulados con UBE2T-A24-10-154 (SEQ ID NO: 22) (m), N° 8 estimulados con UBE2T-A24-10-105 (SEQ ID NO: 23) (n), N° 1 estimulados con UBE2T-A24-10-115 (SEQ ID NO: 24) (o), N° 4 estimulados con UBE2T-A24-10-177

(SEQ ID NO: 25) (p) y N° 7 estimulados con UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO: 27) (q) mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadrado sobre el pocillo de estas imágenes indica que las células del pocillo correspondiente se expandieron para establecer líneas de CTLs. A diferencia, como un caso típico de datos negativos, no se mostró producción de IFN-gamma específica de los CTLs estimulados con UBE2T-A24-9-124 (SEQ ID NO: 3) (r). En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido.

[fig. 2a-l] La Figura 2a-1 está compuesta por una serie de fotografías, (a) a (l), que muestran los resultados del ensayo de ELISPOT en CTLs que se indujeron con péptidos derivados de UBE2T. Los CTLs en el pocillo número N° 4 estimulados con UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO: 29) (a), N° 5 estimulados con UBE2T-A02-9-30 (SEQ ID NO: 30) (b), N° 7 estimulados con UBE2T-A02-9-106 (SEQ ID NO: 32) (c), N° 5 estimulados con UBE2T-A02-9-49 (SEQ ID NO: 36) (d), N° 3 estimulados con UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO: 38) (e), N° 4 estimulados con UBE2T-A02-9-132 (SEQ ID NO: 41) (f), N° 6 estimulados con UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48) (g), N° 7 estimulados con UBE2T-A02-10-6 (SEQ ID NO: 49) (h), N° 8 estimulados con UBE2T-A02-10-106 (SEQ ID NO: 51) (i), N° 2 estimulados con UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO: 52) (j), N° 1 estimulados con UBE2T-A02-10-30 (SEQ ID NO: 53) (k), y N° 8 estimulados con UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO: 55) (l) mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadrado sobre el pocillo de estas imágenes indica que las células del pocillo correspondiente se expandieron para establecer líneas de CTLs. A diferencia, como un caso típico de datos negativos, no se mostró producción de IFN-gamma específica de los CTLs estimulados con UBE2T-A02-9-161 (SEQ ID NO: 28) (o). En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido.

[fig. 2m-o] La Figura 2m-o está compuesta por una serie de fotografías, (m) a (o), que muestran los resultados del ensayo de ELISPOT en CTLs que se indujeron con péptidos derivados de UBE2T. Los CTLs en el pocillo número N° 5 estimulados con UBE2T-A02-10-29 (SEQ ID NO: 56) (m) y N° 3 estimulados con UBE2T-A02-10-38 (SEQ ID NO: 58) (n) mostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con el control, respectivamente. El cuadrado sobre el pocillo de estas imágenes indica que las células del pocillo correspondiente se expandieron para establecer líneas de CTLs. A diferencia, como un caso típico de datos negativos, no se mostró producción de IFN-gamma específica de los CTLs estimulados con UBE2T-A02-9-161 (SEQ ID NO: 28) (o). En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido.

[fig. 3] La Figura 3 está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (a) a (d), que muestran la producción de IFN-gamma de las líneas de CTLs estimulados con UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1) (a), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO: 2) (b), UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO: 13) (c) y UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO: 27) (d). La cantidad de IFN-gamma que los CTLs produjeron se midió por ensayo de inmunoadsorción (ELISA) de IFN-gamma. Los resultados demuestran que las líneas de CTLs establecidos por estimulación con cada péptido muestran la potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido. R/S relación indica la relación entre el número de células respondedoras (línea de CTLs) y células estimuladoras.

[fig. 4] La Figura 4 está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (a) a (c), que muestran la producción de IFN-gamma de los clones de CTLs establecidos por dilución limitante de las líneas de CTLs estimulados con UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1) (a), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO: 2) (b) y UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO: 13) (c). Los resultados demuestran que los clones de CTLs establecidos por estimulación con cada péptido muestran potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido. R/S relación indica la relación entre el número de células respondedoras (clon de CTL) y células estimuladoras.

[fig. 5] La Figura 5 está compuesta por una serie de gráficos de líneas, (a) a (e), que muestran la producción de IFN-gamma de las líneas de CTLs estimulados con UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO: 29) (a), UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO: 38) (b), UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48) (c), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO: 52) (d) y UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO: 55) (e). La cantidad de IFN-gamma que los CTLs produjeron se midió por ELISA de IFN-gamma. Los resultados demuestran que las líneas de CTLs establecidas por estimulación con cada péptido muestran potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado, y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido. R/S relación indica la relación entre el número de células respondedoras (línea de CTL) y células estimuladoras.

[fig. 6] La Figura 6 está compuesta por series de gráficos de líneas, (a) a (e), que muestran la producción de IFN-gamma de los clones de CTLs establecidos por dilución limitante de las líneas de CTLs estimulados con

UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO: 29) (a), UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO: 38) (b), UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48) (c), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO: 52) (d) y UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO: 55) (e). Los resultados demuestran que los clones de CTLs establecidos por estimulación con cada péptido muestran potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, "+" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana pulsadas con el péptido apropiado y "-" indica la producción de IFN-gamma frente a células diana no pulsadas con ningún péptido. R/S relación indica la relación entre el número de células respondedoras (clon de CTL) y células estimuladoras.

[fig. 7] La Figura 7 es un gráfico de líneas, que muestra actividad de CTLs específica frente a las células diana que expresan UBE2T y HLA-A*2402. Se prepararon células COS7 transfectadas con HLA-A*2402 o la longitud completa del gen UBE2T como controles. El clon de CTL establecido con UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1) mostró actividad de CTLs específica frente a células COS7 transfectadas con tanto UBE2T como HLA-A*2402 (rombo negro). Por otra parte, no se detectó actividad de CTLs específica significativa frente a células diana que expresan o HLA-A*2402 (triángulo) o UBE2T (círculo).

[fig. 8] La Figura 8 es un gráfico de líneas, que muestra actividad de CTLs específica contra las células diana que expresan UBE2T y HLA-A*0201. Se prepararon células COS7 transfectadas con HLA-A*0201 o la longitud completa del gen UBE2T como controles. La línea de CTLs establecida con UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48) mostró actividad de CTLs específica contra células COS7 transfectadas con tanto UBE2T como HLA-A*0201 (rombo negro). Por otra parte, no se detectó actividad de CTLs específica significativa contra células diana que expresan o HLA-A*0201 (triángulo) o UBE2T (círculo).

Descripción de realizaciones

Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento se puede usar en la práctica o prueba de las realizaciones de la presente invención, ahora se describen métodos, dispositivos y materiales preferidos. Sin embargo, antes de describir los presentes materiales y métodos, se debe entender que estas descripciones son simplemente ilustrativas y no pretenden estar limitadas. También se debe entender que la presente invención no se limita a los tamaños, formas, dimensiones, materiales, metodologías, protocolos, etc. particulares descritos en el presente documento, ya que éstos pueden variar según experimentación rutinaria y optimización. Además, la terminología usada en la descripción es con el fin de describir las versiones o realizaciones particulares solo, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención que estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que la presente invención pertenece. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes.

I. Definiciones:

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

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

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más

restos de aminoácidos pueden ser resto(s) modificado(s), o resto(s) que no existen de forma natural, tales como mimético(s) químico(s) artificial (es) de aminoácido(s) que existe(n) de forma natural correspondiente(s), además de a polímeros de aminoácidos que existen de forma natural.

5 El término "oligopéptido" como se usa en el presente documento se refiere a un péptido que está compuesto por 20 restos de aminoácidos o menos, normalmente 15 restos de aminoácidos o menos. Como se usa en el presente documento, el término "nonapéptido" se refiere a un péptido que está compuesto por 9 restos de aminoácidos y el término "decapéptido" se refiere a un péptido que está compuesto por 10 restos de aminoácidos.

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

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

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

25 Los términos "agente" y "composición" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un producto que incluye los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, además de cualquier producto que resulte, directamente o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas. Tales términos, cuando se usan en relación con el adjetivo "farmacéutico" (como en "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica") pretenden englobar un producto que incluye el (los) principio(s) activo(s), y el (los) excipiente(s) que constituyan el vehículo, además de cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de dos cualesquiera 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, los términos "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica" se refieren a cualquier producto preparado por mezcla de una molécula o compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

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

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

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

55 A menos que se defina de otro modo, el término "cáncer" se refiere a cánceres o tumores que expresan en exceso el gen UBE2T, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular.

A menos que se defina de otro modo, los términos "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" se usan indistintamente en el presente documento y, a menos que se indique específicamente de otro modo, se refieren a un

sub-grupo de linfocitos T que son capaces de reconocer células no propias (por ejemplo, células tumorales/cancerosas, células infectadas por virus) e inducir la muerte de dichas células.

5 A menos que se defina de otro modo, el término "HLA-A24", como se usa en el presente documento representativamente, se refiere a los subtipos, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, HLA-A*2401, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2404, HLA-A*2407, HLA-A*2408, HLA-A*2420, HLA-A*2425 y HLA-A*2488.

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

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

15 Como se usa en el presente documento, en el contexto de un sujeto o paciente, la expresión "el antígeno HLA del sujeto (o paciente) es HLA-A24 o HLA-A2" se refiere a que el sujeto o paciente posee homocigóticamente o heterocigóticamente el gen de antígeno HLA-A24 o HLA-A2, y el antígeno HLA A24 o HLA-A2 se expresa en células del sujeto o paciente como un antígeno HLA.

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

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

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

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

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

55 II. Péptidos:

Los péptidos de la presente invención descritos con detalle a continuación se pueden denominar "péptido(s) UBE2T" o "polipéptido(s) UBE2T".

Para demostrar que los péptidos derivados de UBE2T funcionan como un antígeno reconocido por CTLs, se analizaron péptidos derivados de UBE2T (SEQ ID NO: 65) para determinar si eran epítopes de antígeno restringidos por HLA-A24 o 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).

5 Los candidatos de péptidos de unión a HLA-A24 derivados de UBE2T se identificaron basándose en sus afinidades de unión por HLA-A24. Se identificaron los siguientes candidatos a péptidos: SEQ ID NOs: 1, 2 y 4 a 27. Además, después de la estimulación *in vitro* de linfocitos T por células dendríticas (DCs) pulsadas (cargadas) con estos péptidos, los CTLs se establecieron satisfactoriamente usando cada uno de los siguientes péptidos:

UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO: 2),
 10 UBE2T-A24-9-133 (SEQ ID NO: 4), UBE2T-A24-9-138 (SEQ ID NO: 6),
 UBE2T-A24-9-43 (SEQ ID NO: 11), UBE2T-A24-9-106 (SEQ ID NO: 12),
 UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO: 13), UBE2T-A24-9-105 (SEQ ID NO: 15),
 UBE2T-A24-10-130 (SEQ ID NO: 17), UBE2T-A24-10-131 (SEQ ID NO: 19),
 UBE2T-A24-10-133 (SEQ ID NO: 20), UBE2T-A24-10-99 (SEQ ID NO: 21),
 15 UBE2T-A24-10-154 (SEQ ID NO: 22), UBE2T-A24-10-105 (SEQ ID NO: 23),
 UBE2T-A24-10-115 (SEQ ID NO: 24), UBE2T-A24-10-177 (SEQ ID NO: 25), y
 UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO: 27).

Los candidatos de péptidos de unión a HLA-A2 derivados de UBE2T se identificaron basándose en sus afinidades de unión por HLA-A2. Se identificaron los siguientes péptidos: SEQ ID NOs: 29 a 63. Además, después de la estimulación *in vitro* de linfocitos T por células dendríticas (DCs) pulsadas (cargadas) con estos péptidos, los CTLs se establecieron satisfactoriamente usando cada uno de los siguientes péptidos:

UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO: 29), UBE2T-A02-9-30 (SEQ ID NO: 30),
 UBE2T-A02-9-106 (SEQ ID NO: 32), UBE2T-A02-9-49 (SEQ ID NO: 36),
 UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO: 38), UBE2T-A02-9-132 (SEQ ID NO: 41),
 25 UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48), UBE2T-A02-10-6 (SEQ ID NO: 49),
 UBE2T-A02-10-106 (SEQ ID NO: 51), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO: 52),
 UBE2T-A02-10-30 (SEQ ID NO: 53), UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO: 55),
 UBE2T-A02-10-29 (SEQ ID NO: 56) y UBE2T-A02-10-38 (SEQ ID NO: 58).

30 Estos CTLs establecidos muestran potente actividad de CTLs específica contra células diana pulsadas con péptidos respectivos. Estos resultados en el presente documento demuestran que UBE2T es un antígeno reconocido por CTLs y que los péptidos anteriores son péptidos de epítope de UBE2T restringidos por HLA-A24 o HLA-A2.

Por consiguiente, en realizaciones preferidas, los péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 pueden ser para su uso en la inducción de CTLs en un sujeto que se ha identificado que tiene HLA-A24 antes de la inducción. Asimismo, los péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58 pueden ser para su uso en la inducción de CTLs en un sujeto que se ha identificado que tiene HLA-A2 antes de la inducción.

Puesto que el gen UBE2T se expresa en exceso en células cancerosas y tejidos, que incluyen, por ejemplo, los de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, 40 cáncer pancreático, cáncer de próstata, SCLC, tumor de tejido blando y tumor testicular, y no se expresa en la mayoría de los órganos normales, representa una buena diana para inmunoterapia. Así, la presente invención proporciona nonapéptidos (péptidos compuestos de nueve restos de aminoácidos) y decapeptidos (péptidos compuestos de diez restos de aminoácidos) correspondientes a epítopes reconocidos por CTLs de UBE2T. Alternativamente, la presente divulgación proporciona péptidos aislados que pueden inducir CTLs, en donde el péptido está compuesto por un fragmento inmunológicamente activo de UBE2T. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona péptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre 45 SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58. En realizaciones preferidas, los péptidos de la presente invención son nonapéptidos o decapeptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21,

22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58. Los ejemplos preferidos de <1> uso en péptidos de la presente invención incluyen péptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58.

5 Los péptidos de la presente invención, particularmente los nonapéptidos y decapeptidos de la presente invención, se pueden flanquear con restos de aminoácidos adicionales, en tanto que el péptido resultante retenga su capacidad de inducción de CTLs. Los restos de aminoácidos adicionales particulares pueden estar compuestos de cualquier tipo de aminoácidos, en tanto que no alteren la capacidad de inducir CTLs del péptido original. Así, la presente invención engloba péptidos capaces de inducir CTLs, en particular péptidos derivados de UBE2T (por ejemplo, péptidos que incluyen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58). Dichos péptidos son inferiores a aproximadamente 15 aminoácidos. Más específicamente, el tamaño de dicho péptido está preferentemente en el intervalo 10 a 15 aminoácidos.

15 Generalmente, se conoce que la modificación de uno, dos o varios aminoácidos en un péptido no influyen en la función del péptido, y en algunos casos incluso potencian la función deseada del péptido original. En realidad, los péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos de una secuencia de aminoácidos en la que se han modificado 1, 2 o varios restos de aminoácidos (es decir, sustituido, añadido, deletado y/o insertado) en comparación con una secuencia de referencia original) se conocen por retener la actividad biológica del péptido original (Mark et al., Proc Natl Acad. Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad. Sci USA 1982, 79: 6409-13). Así, los péptidos de la presente divulgación tienen tanto capacidad de inducción de CTLs como una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58, en la que uno, dos o varios aminoácidos se añaden, deletan, insertan y/o sustituyen. En otras palabras, los péptidos de la presente divulgación tienen tanto capacidad de inducción de CTLs como una secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varío(s) aminoácido(s) están sustituidos, deletados, insertados y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58, siempre que los péptidos modificados retengan la capacidad de inducir CTLs del péptido original.

30 Los expertos en la técnica reconocerán que modificaciones individuales (es decir, deletaciones, inserciones, adiciones y/o sustituciones) a una secuencia de aminoácidos que alteran un único aminoácido o un pequeño porcentaje de la secuencia de aminoácidos global tienden a producir la conservación de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original. Como tales, se denominan convencionalmente "sustituciones conservativas" o "modificaciones conservativas", en donde la alteración de una proteína produce una proteína con funciones similares a la proteína original. Tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Ejemplos de características de cadenas laterales de aminoácidos que son deseables de 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 grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene aromático (H, F, Y, W). Además, los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son aceptados en la técnica como sustituciones conservativas para otros:

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

También se considera que dichos péptidos conservativamente modificados son péptidos de la presente divulgación. Sin embargo, los péptidos de la presente invención no están restringidos a éstos y pueden incluir modificaciones no conservativas, en tanto que el péptido modificado resultante retenga la capacidad requerida de inducir CTLs del péptido no modificado original. Además, los péptidos modificados no deben excluir péptidos que inducen CTLs derivados de variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de UBE2T.

Se pueden insertar, sustituir y/o añadir restos de aminoácidos a los péptidos de la presente invención o, alternativamente, se pueden delecionar restos de aminoácidos de los mismos para lograr una mayor afinidad de unión. Para retener la capacidad requerida de inducción de CTLs, un experto en la técnica modifica preferentemente (es decir, deleciona, inserta, añade y/o sustituye) solo un pequeño número (por ejemplo, 1, 2 o varios) o un pequeño porcentaje de aminoácidos. En el presente documento, el término "varios" significa 5 o menos aminoácidos, por ejemplo, 4 o 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos a modificar puede ser, por ejemplo, 30 % o menos, preferentemente 20 % o menos, más preferentemente 15 % o menos, e incluso más preferentemente 10 % o menos, por ejemplo 1 a 5 %.

Cuando se usa en el contexto de la inmunoterapia contra el cáncer, los péptidos de la presente invención se pueden presentar sobre la superficie de una célula o exosoma como un complejo con un antígeno HLA. Por tanto, es preferible seleccionar péptidos que no solo inducen CTLs, sino que también poseen alta afinidad de unión por el antígeno HLA.

Por ejemplo, péptidos que poseen alta afinidad de unión a HLA-A24 tienden a tener el segundo aminoácido del extremo N sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina, o triptófano. Asimismo, péptidos en los que el aminoácido del extremo C está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina tienden a tener alta afinidad de unión a HLA-A24. Por consiguiente, se puede desear sustituir el segundo aminoácido del extremo N con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y/o el aminoácido en el extremo C con leucina, isoleucina, triptófano o metionina con el fin de aumentar la afinidad de unión a HLA-A24. Así, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 27, en los que el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y/o en los que el extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con leucina, isoleucina, triptófano o metionina, están englobadas por la presente invención. Por tanto, la presente invención engloba los péptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos y/o añadidos en la SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 27,, teniendo dichos péptidos una o ambas de las siguientes características de (a) el segundo aminoácido del extremo N es fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano; y (b) el aminoácido del extremo C es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina. En realizaciones preferidas, los péptidos de la presente invención incluyen una secuencia de aminoácidos en la que el segundo aminoácido del extremo N está sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano, y/o el aminoácido del extremo C está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 27.

Asimismo, los péptidos que poseen alta Afinidad de unión a HLA-A2 tienden a tener el segundo aminoácido del extremo N sustituido con leucina o metionina y/o el aminoácido en el extremo C sustituido con valina o leucina. Por consiguiente, se puede desear sustituir el segundo aminoácido del extremo N con leucina o metionina, y/o el aminoácido en el extremo C con valina o leucina con el fin de aumentar la afinidad de unión a HLA-A2. Así, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58, en el que el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con leucina o metionina, y/o en donde el extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO está sustituido con valina o leucina, están englobados por la presente invención. Por tanto, la presente invención engloba los péptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos en la que uno o dos aminoácidos están sustituidos y/o añadidos en SEQ ID NOs: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58, teniendo dichos péptidos una o ambas de las siguientes características de (a) el segundo aminoácido del extremo N es leucina o metionina; y (b) el aminoácido del extremo C es valina o leucina. En realizaciones preferidas, los péptidos de la presente invención incluyen una secuencia de aminoácidos en la que el segundo aminoácido del extremo N está sustituido con leucina o metionina, y/o el aminoácido del extremo C está sustituido con valina o leucina en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58.

Se pueden introducir sustituciones no solo en los aminoácidos terminales, sino también en las posiciones de posibles sitios de reconocimiento de péptidos de receptores de linfocitos T (TCR). Varios estudios han demostrado que un péptido con sustituciones de aminoácidos puede tener igual función o menor que la del original, por ejemplo CAP1, p53⁽²⁶⁴⁻²⁷²⁾, Her-2/neu⁽³⁶⁹⁻³⁷⁷⁾ o gp 100⁽²⁰⁹⁻²¹⁷⁾ (Zaremba et al., Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, Hoffmann TK et al., J Immunol. (2002);168(3):1338-47, Dionne SO et al., Cancer Immunol Immunother. (2003) 52: 199-206 y Dionne SO et al., Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

La presente invención también contempla la adición de 1 o 2 aminoácidos que también se pueden añadir al extremo N y/o C de los péptidos de la presente invención. Dichos péptidos modificados que tienen la capacidad de inducir CTLs también están incluidos en la presente invención.

Por ejemplo, la presente invención proporciona un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud, que tiene capacidad de inducir CTLs y comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) una secuencia de aminoácidos en que 1 o 2 aminoácido(s) se modifican en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 y 15,

(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 del extremo N de dicha SEQ ID NOs es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, metionina y triptófano, y

5 (b) el aminoácido del extremo C de dicha SEQ ID NOs es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano y metionina, y

(iii) la secuencia de aminoácidos en que 1 o 2 aminoácido(s) se modifican en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: ,29, 30, 32, 36, 38, y 41

10 (iv) la secuencia de aminoácidos de (iii), en donde la secuencia de aminoácidos tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo 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 del extremo C de dicha SEQ ID NO es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina y leucina.

15 Además, la presente invención también proporciona un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12 u 11 aminoácidos de longitud, que tiene capacidad de inducir CTLs y comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i') una secuencia de aminoácidos en que 1 o 2 aminoácido(s) se modifican en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 27,

20 (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 del extremo N de dicha SEQ ID NOs es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, metionina y triptófano, y

25 (b) el aminoácido del extremo C de dicha SEQ ID NOs es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano y metionina,

(iii') una secuencia de aminoácidos en que 1 o 2 aminoácido(s) se modifican en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58,

(iv') la secuencia de aminoácidos de (iii'), en donde la secuencia de aminoácidos tiene una o ambas de las siguientes características:

30 (a) el segundo aminoácido del extremo N de dicha SEQ ID NOs es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina y metionina; y

(b) el aminoácido del extremo C de dicha SEQ ID NOs es o se modifica para ser un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina y leucina.

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

40 Sin embargo, cuando la secuencia de péptidos es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, se pueden inducir efectos secundarios tales como trastornos autoinmunitarios y/o síntomas alérgicos contra sustancias específicas. Por tanto, deseable es preferible realizar primero búsquedas de homología usando bases de datos disponibles para evitar situaciones en las que la secuencia del péptido coincida con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando quede claro a partir de las búsquedas de homología que no existe ni un péptido con 1 o 2 diferencias de aminoácidos en comparación con el péptido objetivo, el péptido objetivo se puede modificar con el fin de aumentar su afinidad de unión con antígenos HLA, y/o aumentar su capacidad de inducir CTLs sin peligro alguno de dichos efectos secundarios.

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

50

La confirmación de la capacidad de inducción de CTLs se lleva a cabo induciendo APCs que llevan antígenos MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DCs)), o más específicamente, DCs derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana, y después de la estimulación de APCs con un péptido de prueba, mezclando las APCs con linfocitos T CD8 positivos para inducir CTLs y entonces midiendo el IFN-gamma contra las células dianas producidas y liberadas por CTLs. Como sistema de reacción se pueden usar animales transgénicos que hayan sido producidos para expresar un antígeno HLA humano (por ejemplo, los descritos en Ben Mohamed 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, se pueden radiomarcarse células diana con ⁵¹Cr y similares, y se puede calcular la actividad citotóxica de CTLs a partir de la radiactividad liberada de las células diana. Alternativamente, se puede evaluar la capacidad de inducción de CTLs midiendo el IFN-gamma producido y liberado por CTLs en presencia de células que llevan 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 divulgación también se pueden unir a otros péptidos, mientras que el péptido unido resultante retenga la inducibilidad de CTLs requerida del péptido original, y más preferentemente también retenga la capacidad de unión a HLA del mismo. Ejemplos de "otros" péptidos adecuados incluyen: los péptidos de la presente invención o los péptidos inductores de CTLs derivados de otros TAAs. El péptido de la presente divulgación se puede unir a "otro" péptido directa o indirectamente mediante un conector. Los conectores entre los péptidos son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo AAY (Daftarian PM, et al., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (Sutmuller RP, et al., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) o K (Ota S, et al., Can Res. 62, 1471-1476, Kawamura KS, et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715).

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

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

Los péptidos de la presente divulgación también se pueden unir a otras sustancias, mientras que el péptido unido resultante retenga la capacidad de inducción de CTLs requerida del péptido original. Ejemplos de sustancias adecuadas incluyen, por ejemplo: péptidos, lípidos, azúcar y cadenas de azúcar, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glucosilación, oxidación de cadenas laterales o fosforilación, etc., siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Estos tipos de modificaciones se pueden realizar para conferir funciones adicionales (por ejemplo, función de dirección y función de administración) o para estabilizar el péptido.

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

Además, como se observa anteriormente, entre los péptidos modificados que están sustituidos, deletados, insertados y/o añadidos 1, 2 o varios restos de aminoácidos, se pueden cribar o seleccionar los que tienen la misma actividad o más alta en comparación con péptidos originales. La presente divulgación, por tanto, también proporciona el método de cribado o selección de péptidos modificados que tienen la misma actividad o más alta en comparación con los originales. Un método ilustrativo incluye las etapas de:

- a: sustituir, deletar, insertar y/o añadir al menos un resto de aminoácido de un péptido de la presente divulgación,
- b: determinar la actividad del péptido modificado en la etapa a, y
- c: seleccionar el péptido que tiene la misma actividad o más alta en comparación con el péptido original.

Preferentemente, la actividad del péptido a ensayar es la capacidad de inducir CTLs.

En ejemplos preferidos, la presente divulgación proporciona un método de cribado de un péptido que tiene una capacidad de inducir un CTL que tiene actividad citotóxica específica contra una célula que presenta un fragmento derivado de UBE2T, en donde el método comprende las etapas de:

- 5 (i) proporcionar una secuencia candidata que consiste en una secuencia de aminoácidos modificada sustituyendo, seleccionando, insertando y/o añadiendo uno, dos o varios restos de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos original, en donde la secuencia de aminoácidos original se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58;
- (ii) seleccionar una secuencia candidata que no tiene homología significativa sustancial (o identidad de secuencia) con los péptidos derivados de cualquier producto de gen humano conocido distinto de UBE2T;
- (iii) poner en contacto un péptido que consiste en la secuencia candidata seleccionada en la etapa (ii) con una célula presentadora de antígenos;
- 10 (iv) poner en contacto la célula presentadora de antígenos de la etapa (iii) con un linfocito T CD8 positivo; y
- (v) identificar el péptido cuya capacidad de inducir CTLs es la misma o superior a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos original.

III. Preparación de péptidos UBE2T

15 Los péptidos de la presente invención se pueden preparar usando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar sintéticamente, usando tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar individualmente o como polipéptidos más largos que incluyen dos o más péptidos. Entonces, se pueden aislar los péptidos, es decir, purificarse o aislar para que estén sustancialmente libres de otras proteínas de célula hospedadora que existen de forma natural y fragmentos de las mismas, o cualquier otra sustancia química.

20 Los péptidos de la presente invención pueden contener modificaciones, tales como glucosilación, oxidación de 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 D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácidos que se pueden usar, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero de los péptidos.

25 Los péptidos de la presente invención se pueden obtener mediante síntesis química basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Por ejemplo, métodos de síntesis de péptidos convencionales que se pueden adoptar para la síntesis incluyen:

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;
- (iii) Peptide Synthesis (en japonés), Maruzen Co., 1975;
- 30 (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, New York, 35 1980, 100-118.

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

IV. Polinucleótidos

45 La presente invención también proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los péptidos anteriormente mencionados de la presente invención. Éstos incluyen polinucleótidos derivados del gen UBE2T que se produce naturalmente (por ejemplo, Nº de acceso de GenBank NM_014176 (SEQ ID NO: 64)), además de aquellos que tienen una secuencia de nucleótidos conservativamente modificada de los mismos. En el presente documento, la expresión "secuencia de nucleótidos conservativamente modificada" se refiere a secuencias que codifican 50 secuencias de aminoácido idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los

codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Así, en cada posición en donde una alanina sea especificada por un codón, el codón puede ser alterado a cualquier de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones conservativamente modificadas. Cada secuencia de ácidos nucleicos en el presente documento que codifica un péptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un experto en la materia reconocerá que cada codón se puede modificar en un ácido nucleico (excepto AUG, que generalmente es el único codón para metionina, y TGG, que generalmente es el único codón para triptófano) para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un péptido está implícitamente descrita en cada secuencia desvelada.

El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto de ADN, ARN y derivados de los mismos. Como es muy conocido en la técnica, un ADN está adecuadamente compuesto de bases tales como A, T, C y G, y T se sustituye por U en un ARN. Un experto en la técnica reconocerá que bases que no existen de forma natural también pueden estar incluidas en los polinucleótidos.

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

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

V. Exosomas

La presente invención emplea además vesículas intracelulares, llamadas, exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de la presente invención y antígenos HLA sobre su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, usando los métodos detallados en la publicación de patente japonesa N° H11-510507 y el documento de patente WO99/03499, y se pueden preparar usando las APCs obtenidas de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención. Los exosomas se pueden inocular como vacunas, de un modo similar a los péptidos de la presente invención.

El tipo de antígenos HLA incluidos en los complejos debe coincidir con el del sujeto que requiere el tratamiento y/o la prevención. Por ejemplo, en la población japonesa, HLA-A24 y HLA-A2, particularmente HLA-A*2402 y HLA-A*0201 y HLA-A*0206, son predominantes y, por tanto, serían apropiados para el tratamiento de pacientes japoneses. El uso del tipo HLA-A24 o HLA-A2 que se expresa altamente entre los japoneses y caucásicos es favorable para obtener resultados eficaces, y subtipos tales como HLA-A*2402, HLA-A*0201 y HLA-A*0206 también encuentran uso. Normalmente, en la clínica, se investiga de antemano el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento, que permite la selección apropiada de péptidos que tienen altos niveles de afinidad de unión al antígeno particular, o que tienen la capacidad de inducción de CTLs por presentación del antígeno. Además, con el fin de obtener péptidos que tienen tanto alta afinidad de unión como la capacidad de inducción de CTLs, se pueden realizar sustitución, inserción, delección y/o adición de 1, 2 o varios aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido parcial UBE2T que existen de forma natural.

Cuando se usa el tipo HLA-A24 de antígeno HLA para el exosoma, tienen utilidad particular los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 27.

Alternativamente, cuando se usa el tipo HLA-A2 de antígeno HLA para el exosoma, tienen utilidad particular los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58.

En algunas realizaciones, los exosomas presentan un complejo del péptido de la presente invención y antígeno HLA-A24 o HLA-A2 sobre su superficie. En realizaciones típicas, el exosoma presenta un complejo de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 (o péptido modificado de la misma) y HLA-A24 sobre su superficie. En otras realizaciones, el exosoma presenta un

complejo de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58 (o péptido modificado de la misma) y HLA-A2 sobre su superficie.

VI. Células presentadoras de antígenos (APCs)

5 La presente invención también proporciona células presentadoras de antígenos (APCs) aisladas que presentan complejos formados entre antígenos HLA y los péptidos de la presente invención sobre su superficie. Las APCs pueden derivar de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar como vacunas por sí mismas o en combinación con otros fármacos que incluyen los péptidos, exosomas o CTLs de la presente invención.

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

15 Por ejemplo, las APCs de la presente invención se pueden obtener induciendo DCs de monocitos de sangre periférica y entonces poniéndolas en contacto (estimulándolas) 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 APCs que presentan los péptidos de la presente invención se inducen en el cuerpo del sujeto. Por lo tanto, las APCs de la presente invención pueden ser unas que se han recogido de un sujeto después de administrar los péptidos de la presente invención al sujeto. Alternativamente, las APCs de la presente invención se pueden obtener poniendo en contacto APCs, que han sido
20 recogidas de un sujeto, con el péptido de la presente invención.

Las APCs de la presente invención se pueden administrar a un sujeto para inducir respuesta inmunitaria contra cáncer en el sujeto por sí mismos o en combinación con otros fármacos que incluyen los péptidos, exosomas o CTLs de la presente invención.

25 En el contexto de la presente invención, se pueden utilizar los péptidos de la presente invención para la fabricación de una composición farmacéutica capaz de inducir una célula presentadora de antígenos. La presente divulgación también proporciona un método o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica para inducir una célula presentadora de antígenos en donde el método incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 La presente divulgación también proporciona el uso de los péptidos de la presente invención para inducir células presentadoras de antígenos.

Según un aspecto de la presente invención, las APCs de la presente invención tienen la capacidad de inducción de CTLs. En el contexto de las APCs, la expresión capacidad de inducción de CTLs se refiere a la capacidad de una APC para inducir un CTL cuando se pone en contacto con un linfocito T CD8 positivo. Además, la capacidad de inducción de CTLs incluye la capacidad de una APC para inducir la activación de CTLs, proliferación de CTLs, promover la lisis de una célula diana por un CTL, y aumentar la producción de IFN-gamma por un CTL. En particular, las APCs de la presente invención tienen una capacidad para inducir CTLs específicos para UBE2T. Dichas APCs que tienen la capacidad de inducción de CTLs se pueden preparar por un método que incluye la etapa de transferir un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención a APCs *in vitro*. El gen introducido puede estar en forma de ADN o ARN. Ejemplos de métodos para la introducción incluyen, sin limitaciones particulares, diversos métodos convencionalmente realizados en este campo, tales como lipofección, electroporación, y se puede usar el método de fosfato de calcio. Más específicamente, se puede realizar 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 N° JP2000-509281. Transfiriendo el gen en APCs, el gen experimenta transcripción, traducción, y similares, en la célula, y entonces la proteína obtenida es procesada por la clase I o clase II de MHC, y avanza a través de una vía de presentación para presentar péptidos parciales.
45

En algunas realizaciones, las APCs de la presente invención presentan complejos de antígeno HLA-A24 o HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre su superficie. En realización típicas, la APC de la presente invención presenta un complejo de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 (o péptido modificado de la misma) y HLA-A24 sobre su superficie. En otras realizaciones, la APC de la presente invención presenta un complejo de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58 (o péptido modificado de la misma) y HLA-A2 sobre su superficie.
50

VII. Linfocitos T citotóxicos (CTLs)

Un CTL inducido contra uno cualquiera de los péptidos de la presente invención refuerza la respuesta inmunitaria que dirige las células de cáncer *in vivo* y así se pueden usar como vacunas, de un modo similar a los péptidos en sí. Así, la presente invención proporciona CTLs aislados que son específicamente inducidos o activados por uno cualquiera de los péptidos de la presente invención.
55

Dichos CTLs se pueden obtener (1) poniendo en contacto (estimulando) las APCs derivadas del sujeto, y linfocitos T CD8 positivos, o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con el (los) péptido(s) de la presente invención, (2) poniendo en contacto los linfocitos T CD8 positivos o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con las APCs o exosomas que presentan un complejo de un antígeno HLA y el péptido sobre su superficie. Dichas APCs o exosomas se pueden preparar por los métodos descritos anteriormente.

Los CTLs de la presente invención se pueden obtener de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención, y se pueden administrar en sí mismos o en combinación con otros fármacos que incluyen los péptidos, APCs o exosomas de la presente invención. Los CTLs obtenidos actúan específicamente contra células diana que presentan los péptidos de la presente invención, por ejemplo, los mismos péptidos usados para la inducción. Las células diana pueden ser células que expresan endógenamente UBE2T, tales como células de cáncer, o células que son transfectadas con el gen UBE2T; y células que presentan un péptido de la presente invención sobre la superficie celular debido a estimulación por el péptido también pueden servir de dianas del ataque por CTLs activados.

En algunas realizaciones, los CTLs de la presente invención son CTLs que reconocen células que presentan complejos de un antígeno HLA-A24 o HLA-A2 y el péptido de la presente invención. En el contexto de CTLs, la expresión "reconocen una célula" se refiere a la unión de un complejo de un antígeno HLA-A24 o HLA-A2 y el péptido de la presente invención sobre la superficie celular mediante su TCR y que muestra actividad citotóxica específica contra la célula. En el presente documento, "actividad citotóxica específica" se refiere a que muestra actividad citotóxica contra una célula que presenta un complejo de un antígeno HLA-A24 o HLA-A2 y el péptido de la presente invención, pero no otras células. Por consiguiente, los CTLs que muestran actividad citotóxica específica contra una célula que presenta el péptido de la presente invención están incluidos en la presente invención.

En realizaciones típicas, los CTLs de la presente invención pueden reconocer una célula que presenta un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 (o péptido modificado de la misma) por un HLA-A24. En realizaciones preferidas, dicho CTL de la presente invención puede reconocer una célula que expresa UBE2T y un HLA-A24 (por ejemplo, célula cancerosa HLA-A24 positivo) y muestra actividad citotóxica contra dicha célula.

En otras realizaciones, el CTL de la presente invención puede reconocer una célula que presenta un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58 (o péptido modificado de la misma) por un HLA-A2. En realizaciones preferidas, dicho CTL de la presente invención puede reconocer una célula que expresa UBE2T y un HLA-A2 (por ejemplo, célula cancerosa HLA-A2 positivo) y muestra actividad citotóxica contra dicha célula.

VIII. Receptor de linfocitos T (TCR)

La presente divulgación también proporciona una composición que incluye un polinucleótido que codifica tanto subunidades de TCR como polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR, en donde el TCR formado por dichas subunidades se puede unir a un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención sobre una superficie celular, y métodos de uso del mismo. Las subunidades de TCR tienen la capacidad de formar TCRs que confieren especificidad a linfocitos T contra células tumorales que expresan UBE2T. Usando métodos conocidos en la materia, se pueden identificar polinucleótidos que codifican cada una de las cadenas alfa- y beta- de las subunidades de TCR del CTL inducido con uno o más péptidos de la presente invención (documento de patente 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 de PCR para el análisis pueden ser, por ejemplo, cebadores 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgtcat-3') como cebadores del lado 5' (SEQ ID NO: 66) y cebadores 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgagcgt-3') específicos por la región C de la cadena alfa de TCR (SEQ ID NO: 67), cebadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatccttctcttgac-3') específicos por la región C1 de la cadena beta de TCR (SEQ ID NO: 68) o cebadores 3-TRbeta-C2 (5'-ctagcctctggaatccttctctt-3') específicos por la región C2 de la cadena beta de TCR (SEQ ID NO: 69) como cebadores del lado 3', pero no se limitan a éstos. Los TCRs derivados se pueden unir a células diana que presentan el péptido de la presente invención con alta avidez, y opcionalmente median en la eficiente destrucción de células diana que presentan el péptido de la presente invención *in vivo* e *in vitro*.

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

El TCR específico contra el péptido de la presente invención es un receptor capaz de reconocer específicamente un complejo de un péptido de la presente invención y una molécula HLA, dando una actividad específica de linfocitos T contra una célula diana que presenta un complejo del péptido de la presente invención y un antígeno HLA cuando el TCR se presenta sobre la superficie del linfocito T. Se puede confirmar un reconocimiento específico del complejo anterior por cualquier método conocido, incluyendo ejemplos preferidos el análisis de tinción de multímeros de HLA

usando moléculas de HLA y péptidos de la presente invención, y ensayo ELISPOT. Realizando el ensayo ELISPOT, se puede confirmar que un linfocito T que expresa el TCR sobre la superficie celular reconoce una célula por el TCR, y que las señales se transmiten intracelularmente. La confirmación de que el TCR anteriormente mencionado puede dar una actividad citotóxica de linfocitos T cuando el TCR existe sobre la superficie del linfocito T también se puede llevar a cabo por un método conocido. Un método preferido incluye, por ejemplo, la determinación de la actividad citotóxica contra una célula diana, tal como el ensayo de liberación de cromo.

Por tanto, la presente divulgación proporciona CTLs que se preparan por transducción con los polinucleótidos que codifican tanto las subunidades de TCR como los polinucleótidos que codifican cada una de la subunidades de TCR en donde el TCR formado por dichas subunidades de TCR se puede unir al péptido UBE2T, por ejemplo, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27, en el contexto de HLA-A24, y también un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58, en el contexto de HLA-A2.

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

IX. Agentes farmacéuticos o composiciones

La presente invención también proporciona agentes farmacéuticos o composiciones que incluyen al menos un principio activo seleccionado entre:

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

Puesto que la expresión de UBE2T es específicamente elevada en cánceres, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular, los péptidos o polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/o para la prevención de una reaparición posoperatoria del mismo. Así, la presente invención proporciona una composición farmacéutica o agente formulado para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/o para la prevención de una reaparición posoperatoria del mismo, incluyendo dicha composición o agente al menos uno de los péptidos o polinucleótidos de la presente invención como principio activo. Alternativamente, los péptidos de la presente invención se pueden expresar sobre la superficie de cualquiera de los exosomas o células anteriores, tales como APCs para el uso como composiciones farmacéuticas o agentes. Además, los CTLs anteriormente mencionados que dirigen uno cualquiera de los péptidos de la presente invención también se pueden usar como principio activo de las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención.

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

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

En el agente farmacéutico o composición, dicho principio activo está presente en una cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz.

La composición farmacéutica o agente de la presente invención también encuentran uso como una vacuna. En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" (también denominada una "composición inmunogénica") se refiere a un agente o composición que tiene la función de mejorar, potenciar y/o inducir inmunidad antitumoral tras la inoculación en un animal. En otras palabras, la presente invención proporciona los agentes o composiciones

farmacéuticas para inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto. La cantidad del péptido en dicho agente o composición puede ser una cantidad que es eficaz en potenciar o estimular significativamente la respuesta inmunológica en un sujeto que lleva un cáncer que expresa UBE2T.

5 Las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir cánceres y/o prevenir una reparación posoperatoria o metastásica de los mismos en sujetos o pacientes que incluyen humanos y cualquier otro mamífero que incluye, pero no se limita a, ratones, ratas, cobayas, conejos, gatos, perros, ovejas, cabras, cerdos, ganado vacuno, caballos, monos, babuinos y chimpancés, animales particularmente comercialmente importantes o animales domesticados. En algunas realizaciones, los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es
10 HLA-A24 o HLA-A2.

La presente divulgación también proporciona el uso de un principio activo en la fabricación de una composición farmacéutica o agente para tratar y/o prevenir cáncer o tumor, y/o prevenir una reparación posoperatoria del mismo, dicho principio activo seleccionado entre:

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

20 La presente invención proporciona además un principio activo para su uso en el tratamiento y/o la prevención de cánceres o tumores, y/o la prevención de una reparación posoperatoria de los mismos, dicho principio activo seleccionado entre:

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

La presente divulgación proporciona además un método o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica o agente para tratar y/o prevenir cáncer o tumor, y/o prevenir una reparación posoperatoria del mismo, en donde el método o proceso incluye la etapa de formular un principio activo seleccionado entre:

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

35 La presente divulgación también proporciona un método o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica o agente para tratar y/o prevenir cáncer o tumor, y/o prevenir una reparación posoperatoria del mismo, en donde el método o proceso incluye las etapas de mezclar un principio activo con un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable, en donde el principio activo se selecciona entre:

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

La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento y/o prevención de cáncer o tumor, y/o prevención de una reaparición posoperatoria del mismo, en donde el método comprende la etapa de administrar a un sujeto al menos un principio activo seleccionado entre:

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

10 Según la presente invención, se ha encontrado que los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 27 son péptidos de epítipo restringidos por HLA-A24 que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica contra el cáncer que expresa HLA-A24 y UBE2T en un sujeto. Por tanto, se ha encontrado que los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58 son péptidos de epítipo restringidos por HLA-A2 que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica contra el cáncer que expresa HLA-A2 y UBE2T en un sujeto. Por tanto, las composiciones farmacéuticas o agentes que incluyen cualquiera de estos péptidos con la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 27 son particularmente aptos para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A24. Por otra parte, las composiciones farmacéuticas o agentes que incluyen cualquiera de estos péptidos con la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58 son particularmente aptos para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Lo mismo se aplica a composiciones farmacéuticas o agentes que contienen polinucleótidos que codifican cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de la presente invención).

25 Los cánceres que se van a tratar y/o prevenir por las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención no se limitan a e incluyen todos los tipos de cánceres en los que participa UBE2T, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular.

30 Las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención pueden contener además de los principios activos anteriormente mencionados, otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTLs contra células cancerosas, otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, otras células que presentan los otros péptidos, y similares. Ejemplos de dichos "otros" péptidos que tienen la capacidad de inducir CTLs contra células cancerosas incluyen, pero no se limitan a, péptidos derivados de cáncer (por ejemplo, TAAs identificados).

35 Si se necesita, las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como un principio activo adicional, mientras que la sustancia no inhiba el efecto antitumoral del principio activo de la presente invención, por ejemplo, cualquiera de los péptidos, polinucleótidos, exosomas, APCs, CTLs, de la presente invención. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir sustancias antiinflamatorias, analgésicos, quimioterapéuticos y similares. Además de incluir otras sustancias terapéuticas en el propio medicamento, los medicamentos de la presente invención también se pueden administrar secuencialmente o simultáneamente con una o varias otras composiciones farmacológicas. Las cantidades de medicamento y composición farmacológica dependen, por ejemplo, de qué tipo de composición (composiciones) farmacológica(s) o se use, la enfermedad que esté tratándose, y el programa y vías de administración.

45 Se debe entender que, además de los componentes particularmente mencionados en el presente documento, las composiciones farmacéuticas o agente de la presente invención pueden incluir otras sustancias convencionales en la técnica que tienen en cuenta el tipo de formulación en cuestión.

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

55 Además del recipiente descrito anteriormente, un kit que incluye una composición farmacéutica o agente de la presente invención puede incluir opcionalmente un segundo recipiente que alberga un diluyente farmacéuticamente

aceptable. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

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

(1) Composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos como principios activos

10 El péptido de la presente invención se puede administrar directamente como una composición farmacéutica o agente, o si fuera necesario, se pueden formular mediante métodos de formulación convencionales. En el último caso, además de los péptidos de la presente invención, se pueden incluir según convenga vehículos, excipientes, y similares que son generalmente usados para fármacos, sin limitaciones particulares. Ejemplos de dichos vehículos son agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón fosfato, líquido de cultivo y similares. Además, las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención pueden contener, según sea necesario, estabilizadores, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares. Las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención se pueden usar para fines contra el cáncer.

15 Los péptidos de la presente invención se pueden preparar en combinación, que incluye dos o más péptidos de la presente invención, para inducir CTLs *in vivo*. Los péptidos pueden estar en una mezcla o se pueden conjugar entre sí usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los péptidos se pueden unir químicamente o expresar como un polipéptido de fusión simple. Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes. Al administrar los péptidos de la presente invención, los péptidos son presentados en alta densidad por los antígenos HLA sobre las APCs, y luego se inducen los CTLs que reaccionan específicamente hacia el complejo formado entre el péptido presentado y el antígeno HLA. Alternativamente, las APCs (por ejemplo, DCs) se puede extraer de un sujeto y luego se estimulan por los péptidos de la presente invención para obtener las APCs que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención sobre su superficie celular. Estas APCs se pueden volver a administrar al sujeto para inducir CTLs en el sujeto, y como resultado, se puede aumentar la agresividad hacia el endotelio asociado a tumor.

20 Las composiciones farmacéuticas o agentes para el tratamiento y/o la prevención de cáncer que incluyen cualquiera de los péptidos de la presente invención como principios activos también pueden incluir un adyuvante de manera que se establezca eficazmente inmunidad celular. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención se pueden administrar con otros principios activos, o se pueden administrar por formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a cualquier compuesto, sustancia o composición que potencie la respuesta inmunitaria contra una proteína cuando se administra junto (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Los adyuvantes contemplados en el presente documento incluyen los descritos en la bibliografía (Johnson AG, Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Los ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina del cólera, toxina de salmonella, IFA (adyuvante incompleto de Freund), CFA (adyuvante completo de Freund), ISCOMatrix, GM-CSF, CpG, emulsión O/W y similares.

25 Además, se pueden usar convenientemente formulaciones de liposomas, formulaciones granulares en las que el péptido está unido a perlas de diámetro de algunos micrómetros, y formulaciones en las que un lípido está unido al péptido.

30 En otra realización, los péptidos de la presente invención también se pueden administrar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales preferidas incluyen, pero no se limitan a, sales con un metal alcalino, sales con un metal, sales con una base orgánica, sales con una amina, sales con un ácido orgánico (ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, etc.) y sales con un ácido inorgánico (ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, etc.). Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y propiedades del compuesto y que se obtienen mediante reacción con ácidos o bases inorgánicos u orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

35 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención puede además incluir un componente que sensibiliza a los CTLs. Se han identificado lípidos como sustancias capaces de sensibilizar a CTLs *in vivo* contra antígenos virales. Por ejemplo, se pueden unir restos de ácido palmítico a los grupos épsilon- y alfa-amino de un resto de lisina, y luego unir a un péptido de la presente invención. Entonces, el péptido lipidado se puede administrar ya sea directamente en una micela o partícula, incorporar en un liposoma o emulsionar en un adyuvante. Como otros ejemplos de lípidos, se pueden usar lipoproteínas de *E. coli*, tal como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS) para sensibilizar CTLs cuando se unen covalentemente a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).

Ejemplos de métodos adecuados de administración incluyen, pero no se limitan necesariamente a, vía oral, e inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraósea, peritoneal e intravenosa, o similares, y administración sistémica o administración local en los alrededores de los sitios dirigidos. La administración se puede realizar mediante administración simple o reforzar por múltiples administraciones. Se puede administrar una cantidad farmacéuticamente o terapéuticamente eficaz del péptido de la presente invención a un sujeto en necesidad de tratamiento del cáncer que expresa UBE2T. Alternativamente, se puede administrar una cantidad del péptido de la presente invención suficiente para potenciar o estimular la respuesta inmunológica mediada con CTLs, y/o para inducir CTLs contra el cáncer o tumor que expresa UBE2T, a un sujeto portador de un cáncer que expresa UBE2T. La dosis de péptidos de la presente invención se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad que va a tratarse, edad del paciente, peso, método de administración y similares, y generalmente es 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 30 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 10 mg, por ejemplo, 0,5 mg a 5 mg, y se puede administrar una vez algunos días a algunos meses, por ejemplo, una vez a la semana. Un experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente una dosis adecuada.

(2) Composiciones farmacéuticas que contienen polinucleótidos como principios activos

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

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

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

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

La administración se puede realizar por vía oral, o inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraósea y/o peritoneal, o similares, y mediante administración sistémica o administración local en los alrededores de los sitios dirigidos. La administración se puede realizar por administración simple o reforzar mediante múltiples administraciones. Se puede administrar una cantidad farmacéutica o terapéuticamente eficaz del polinucleótido a un sujeto en necesidad de tratamiento de cáncer que expresa UBE2T. Alternativamente, una cantidad del polinucleótido de la presente invención es suficiente para potenciar o estimular la respuesta inmunológica mediada con CTLs, y/o se puede administrar para inducir CTLs contra cáncer o tumor que expresa UBE2T a un sujeto portador de un cáncer que expresa UBE2T. La dosis del polinucleótido en el vehículo adecuado o las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de la presente invención se pueden ajustar apropiadamente según la enfermedad que va a tratarse, edad del paciente, peso, método de administración y similares, y generalmente es 0,001 mg a 1000 mg, por ejemplo, 0,01 mg a 100 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 30 mg, por ejemplo, 0,1 mg a 0,5 mg a mg, por ejemplo, 0,5 mg a 5 mg, y se puede administrar una vez cada unos cuantos días a una vez cada unos

cuantos meses, por ejemplo, una vez a la semana. Un experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente la dosis adecuada.

X. Métodos de uso de péptidos, polinucleótidos, exosomas, APCs y CTLs:

5 Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para preparar o inducir APCs y CTLs. Las APCs de la presente invención también se pueden usar para preparar o inducir CTLs. Se pueden usar péptidos, polinucleótidos, exosomas y APCs en combinación con cualquier otro compuesto, mientras que los compuestos adicionales no inhiban su capacidad de inducción de CTLs. Así, se puede usar cualquiera de las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención para preparar o inducir CTLs. Además de esto, los que incluyen los péptidos o polinucleótidos también se pueden usar para preparar o inducir APCs como se explica más adelante.

10 (1) Métodos de inducción de células presentadoras de antígenos (APCs)

La presente invención proporciona métodos *in vitro* de inducción de APCs con capacidad de inducción de CTLs usando péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

Los métodos *in vitro* de la presente invención incluyen la etapa de poner en contacto APCs con los péptidos de la presente invención *in vitro*.

15 Las APCs no se limitan a un tipo particular de células e incluyen DCs, células de Langerhans, macrófagos, linfocitos B y linfocitos T activados, que son conocidas por presentar antígenos proteínicos sobre su superficie celular de manera que sean reconocidos por linfocitos. Preferentemente, se pueden usar DCs que tienen la capacidad de inducción de CTLs más fuerte entre las APCs. Se puede usar un péptido cualquiera de la presente invención por sí mismo o en combinación con uno o más de otros péptidos de la presente invención y/o uno o más de péptidos inductores de CTLs derivados de TAAs distintos de UBE2T.

20 Por otra parte, cuando los péptidos de la presente invención se administran a un sujeto, las APCs se ponen en contacto con los péptidos *in vivo*, y por consiguiente, las APCs con la capacidad de inducir CTLs se inducen en el cuerpo del sujeto. Similarmente, cuando el polinucleótido de la presente invención se administra a un sujeto en una forma expresable, el péptido de la presente invención se expresa y se pone en contacto con APCs *in vivo* y, por consiguiente, se inducen APCs con capacidad de inducir CTLs en el cuerpo del sujeto. La expresión "forma expresable" se describió anteriormente en la sección "IX. Composiciones farmacéuticas o agentes (2) Composiciones farmacéuticas o agentes que contienen polinucleótidos como principios activos".

25 La presente invención proporciona métodos *in vitro* para inducir una APC que tiene la capacidad de inducir CTLs, en donde los métodos incluyen la etapa seleccionada de entre:

- 30 (a) poner en contacto una APC con el péptido de la presente invención; y
(b) introducir el polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención en una APC.

En una realización preferida, la presente invención proporciona el método *in vitro* de inducir una APC que tiene la capacidad de inducir CTLs, incluyendo dicho método una de las siguientes etapas:

- 35 (a) poner en contacto una APC que expresa HLA-A24 con un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 27 o péptido modificado de la misma; y
(b) introducir un polinucleótido que codifica un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 27 o péptido modificado de la misma en una APC que expresa HLA-A24.

40 Las APCs inducidas por el método anterior presentan dichos péptidos por HLA-A24 sobre su superficie, y pueden inducir CTLs que tienen actividad citotóxica específica contra células que expresan HLA-A24 y UBE2T.

En otra realización, la presente invención proporciona el método *in vitro* de inducir una APC que tiene la capacidad de inducir CTLs, incluyendo dicho método una de las siguientes etapas:

- 45 (a) poner en contacto una APC que expresa HLA-A2 con un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58 o péptido modificado de la misma; y
(b) introducir un polinucleótido que codifica un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58 o péptido modificado de la misma en una APC que expresa HLA-A2.

50 Las APCs inducidas por el método anterior presentan dichos péptidos mediante HLA-A2 sobre su superficie, y pueden inducir CTLs que tienen actividad citotóxica específica frente a células que expresan HLA-A2 y UBE2T.

Los métodos de la presente invención se llevan a cabo *in vitro*. Las APCs usadas para la inducción de CTLs que tienen la capacidad de inducción de CTLs pueden ser preferentemente APCs que expresan el antígeno HLA-A24 o HLA-A2. Dichas APCs se pueden preparar por los métodos muy conocidos en las técnicas de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A2. Las APCs inducidas por el método de la presente invención pueden ser APCs que presentan un complejo del péptido de la presente invención y el antígeno HLA (HLA-A24 o HLA-A2) en su superficie. Cuando las APCs inducidas por el método de la presente invención se administran a un sujeto con el fin de inducir respuestas inmunitarias contra el cáncer en el sujeto, el sujeto es preferentemente el mismo del que derivaron las APCs. Sin embargo, el sujeto puede ser uno diferente del donante de APCs, mientras que el sujeto tenga el mismo HLA con el donante de APCs.

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

La presente divulgación proporciona el uso del péptido de la presente invención o el polinucleótido que codifica el péptido en la fabricación de un agente o composición formulada para inducir APCs.

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

(2) Métodos de inducción de CTLs

La presente invención también proporciona métodos *in vitro* para inducir CTLs usando los péptidos, polinucleótidos o exosomas o APCs de la presente invención. Los métodos para inducir CTLs incluyen al menos una etapa seleccionada de entre:

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

b: poner en contacto un linfocito T CD8 positivo con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención.

Cuando los péptidos, polinucleótidos, o APCs, de la presente invención se administran a un sujeto, se inducen CTLs en el cuerpo del sujeto, y se potencia la intensidad de las respuestas inmunitarias que dirigen células cancerosas que expresan UBE2T.

Se pueden utilizar opcionalmente exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención en lugar de las APCs anteriormente mencionados. Concretamente, la presente invención puede incluir la etapa de co-cultivar exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención y linfocitos T CD8 positivos. Dichos exosomas se pueden preparar por los métodos descritos anteriormente en la sección "V. Exosomas". APCs y exosomas adecuados para el método de la presente invención presentan un complejo del péptido de la presente invención y HLA-A24 o HLA-A2 sobre su superficie.

Por ejemplo, una APC o exosoma que presentan un complejo de un HLA-A24 y un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 27 (o péptido modificado de la misma) sobre su superficie se puede utilizar preferentemente para inducir un CTL que tiene actividad citotóxica específica contra una célula que expresa HLA-A24 y UBE2T. Asimismo, una APC o exosoma que presentan un complejo de un HLA-A2 y un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58 (o péptido modificado de la misma) sobre su superficie se puede utilizar preferentemente para inducir un CTL que tiene actividad citotóxica específica contra una célula que expresa HLA-A2 y UBE2T.

Además, el CTL se puede inducir introduciendo un polinucleótido que codifica tanto las subunidades de TCR como los polinucleótidos que codifican cada una de las subunidades de TCR en linfocito T CD8 positivo, en donde el TCR formado por dichas subunidades se puede unir a un complejo del péptido de la presente invención y un antígeno HLA sobre una superficie celular. Dicha transducción se puede realizar como se ha descrito anteriormente en la sección "VIII. Receptor de linfocitos T (TCR)".

Los métodos de la presente invención se llevan a cabo *in vitro*. Se pueden preparar linfocitos T CD8 positivos usados para la inducción de CTLs por métodos muy conocidos en la materia a partir de CMSP obtenidas de un sujeto. En realizaciones preferidas, el donante para linfocitos T CD8 positivos puede ser un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A2. Los CTLs inducidos por los métodos de la presente invención pueden ser CTLs que pueden reconocer células que presentan un complejo del péptido de la presente invención y antígeno HLA sobre su superficie. Dichos CTLs pueden mostrar actividad citotóxica específica frente a células que presentan el péptido de la presente invención sobre su superficie y, por tanto, pueden mostrar actividad citotóxica específica frente a células que expresan UBE2T (por ejemplo, células cancerosas). Cuando los CTLs inducidos por el método de la presente invención se administran a un sujeto con el fin de inducir respuestas inmunitarias contra el cáncer en el sujeto, el

sujeto es preferentemente el mismo del que derivan los linfocitos T CD8 positivos. Sin embargo, el sujeto puede ser uno diferente del donante de linfocitos T CD8 positivos, mientras que el sujeto tenga el mismo tipo de HLA con el donante de linfocitos T CD8 positivos.

5 La presente divulgación proporciona un método o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica o agente para inducir CTLs, en donde el método o proceso incluye la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la presente invención proporciona un agente o composición para inducir un CTL, en donde el agente o composición comprende uno o más péptidos, uno o más polinucleótidos, o una o más APCs, y/o uno o exosomas de la presente invención.

10 La presente divulgación proporciona el uso del péptido, polinucleótido, APC o exosoma de la presente divulgación en la fabricación de un agente o composición formulada para inducir un CTL.

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

XI. Métodos de inducción de la respuesta inmunitaria

15 Además, la presente divulgación proporciona métodos de inducción de respuestas inmunitarias contra enfermedades relacionadas con UBE2T. Las enfermedades adecuadas incluyen cáncer, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular.

20 Los métodos de la presente divulgación pueden incluir la etapa de administrar un agente o composición que contiene cualquiera de los péptidos de la presente invención o polinucleótidos que los codifican. Los métodos desvelados también contemplan la administración de exosomas o APCs que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención. Para detalles, véase el punto de "IX. Composiciones farmacéuticas o agentes", particularmente la parte que describe el uso de las composiciones farmacéuticas de la presente invención como vacunas. Además, los exosomas y APCs que se pueden emplear por los presentes métodos para inducir la respuesta inmunitaria se describen con detalle en los puntos de "V. Exosomas", "VI. Células presentadoras de antígenos (APCs)", y (1) y (2) de "X. Métodos que usan los péptidos, exosomas, APCs y CTLs", arriba.

25 La presente divulgación también proporciona un método o proceso para la fabricación de una composición farmacéutica o agente para inducir la respuesta inmunitaria contra el cáncer, en donde el método puede incluir la etapa de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 Alternativamente, el método de la presente divulgación puede incluir la etapa de administrar una vacuna o una composición farmacéutica o agente de la presente invención que contiene:

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

40 En el contexto de la presente invención, un cáncer que expresa en exceso UBE2T se puede tratar con estos principios activos. Los ejemplos de dicho cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular. Por consiguiente, antes de la administración de las vacunas o composiciones farmacéuticas o agente que incluye cualquiera de los principios activos anteriormente mencionados, es preferible confirmar si el nivel de expresión de UBE2T en células cancerosas o tejidos recogidos del sujeto que se va a tratar es elevado en comparación con las células normales o tejidos recogidos del mismo sujeto. Así, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer que expresa (en exceso) UBE2T en un paciente en necesidad del mismo, incluyendo dicho método las etapas de:

- i) determinar el nivel de expresión de UBE2T en una muestra biológica obtenida de un sujeto con el cáncer que va a tratarse;
- 50 ii) comparar el nivel de expresión de UBE2T con control normal; y

iii) administrar al menos un componente seleccionado entre (a) a (e) descritas anteriormente a un sujeto con cáncer que expresan en exceso UBE2T en comparación con el control normal.

La presente invención proporciona una vacuna o composición farmacéutica que incluye al menos un componente seleccionado entre (a) a (e) descritos anteriormente, a administrar a un sujeto que tiene cáncer que expresa en exceso UBE2T. En otras palabras, la presente divulgación proporciona además un método de identificación de un sujeto que se va a tratar con el péptido de la presente invención, incluyendo dicho método la etapa de determinar un nivel de expresión de UBE2T en una muestra biológica derivada de sujeto, en donde un aumento del nivel de expresión en comparación con un nivel de control normal del gen indica que el sujeto puede tener cáncer que se puede tratar con el péptido de la presente invención.

Además, preferentemente, el tipo HLA de un sujeto se puede identificar antes administrar los péptidos de la presente invención. Por ejemplo, los péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 se administran preferentemente a un sujeto identificado por tener HLA-A24. Alternativamente, los péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58 se administran preferentemente a un sujeto identificado por tener HLA-A2.

Se puede usar cualquier célula o tejido derivado de sujeto para la determinación del nivel de expresión de UBE2T, mientras que pueda incluir el producto de transcripción o traducción de UBE2T. Ejemplos de muestras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, tejidos y fluidos corporales, tales como sangre, esputo y orina. Preferentemente, la muestra de células o tisular derivada del sujeto contiene una población de células que incluye una célula epitelial, más preferentemente una célula epitelial cancerosa o una célula epitelial derivada de tejido canceroso. Además, si fuera necesario, la célula se puede purificar a partir de los tejidos y fluidos corporales obtenidos, y entonces se usa como la muestra derivada de sujeto.

Según la presente divulgación, se puede determinar el nivel de expresión de UBE2T en una muestra biológica obtenida de un sujeto. El nivel de expresión de UBE2T se puede determinar al nivel de productos de transcripción (ácido nucleico), usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARNm de UBE2T se puede cuantificar usando sondas por métodos de hibridación (por ejemplo, hibridación Northern). La detección se puede llevar a cabo sobre un chip o una matriz. Es preferible el uso de una matriz para detectar el nivel de expresión de UBE2T. Aquellos expertos en la materia pueden preparar dichas sondas utilizando la información de secuencias de UBE2T. Por ejemplo, se puede usar el ADNc de UBE2T como sondas. Si fuera necesario, las sondas se pueden marcar con una marca adecuada, tales como colorantes, sustancias fluorescentes e isótopos, y se puede detectar el nivel de expresión de UBE2T como la intensidad de las marcas hibridadas.

Además, se puede cuantificar el producto de transcripción de UBE2T usando cebadores por métodos de detección basados en amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Dichos cebadores se pueden preparar basándose en la información de secuencia disponible de UBE2T.

Específicamente, una sonda o cebador usado para el presente método se hibrida bajo condiciones rigurosas, moderadamente rigurosas o de baja rigurosidad para el ARNm de UBE2T. Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones (de hibridación) rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda o cebador se hibridará con su secuencia diana, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes bajo diferentes circunstancias. Se observa hibridación específica de secuencias más largas a temperaturas más altas que las secuencias más cortas. Generalmente, la temperatura de una condición rigurosa se selecciona para ser aproximadamente 5 grados centígrados más baja que el punto de fusión térmico (T_m) para una secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias a su secuencia diana se hibridan con la secuencia objetivo en equilibrio. Como las secuencias diana generalmente están presentes en exceso, a T_m , el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio. Normalmente, condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sales es inferior a ión de sodio aproximadamente 1,0 M, normalmente ión de sodio aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 grados centígrados para sondas o cebadores cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 grados centígrados para sondas o cebadores más largos. También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de sustancias desestabilizantes, tales como formamida.

Una sonda o cebador de la presente divulgación normalmente es un oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido normalmente incluye una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 o 25, la secuencia de nucleótidos de hebra codificante consecutiva de un ácido nucleico que incluye una secuencia de UBE2T, o una secuencia de nucleótidos de hebra no codificante de un ácido nucleico que incluye una secuencia de UBE2T, o de un mutante que existe de forma natural de estas secuencias. En particular, por ejemplo, en una realización preferida, se puede usar un oligonucleótido que tiene 5-50 de longitud como cebador para amplificar los genes, que va a detectarse. Más preferentemente, el ARNm o ADNc de un gen UBE2T se puede detectar con sonda de oligonucleótidos o cebador de un tamaño específico, generalmente 15-30 bases de longitud. El tamaño puede oscilar de al menos 10 nucleótidos, al menos 12 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos y las sondas y cebadores pueden oscilar en tamaño de 5-10 nucleótidos,

- 10-15 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-25 nucleótidos y 25-30 nucleótidos. Preferentemente, la longitud de la sonda de oligonucleótidos o cebador se puede seleccionar de 15-25 nucleótidos. Procedimientos de ensayo, dispositivos o reactivos para la detección del gen usando dicha sonda de oligonucleótidos o cebador son muy conocidos (por ejemplo, micromatriz de oligonucleótidos o PCR). En estos ensayos, sondas o cebadores también pueden incluir secuencias de marca o conectoras. Además, se pueden modificar sondas o cebadores con marca detectable o ligando de afinidad que va a capturarse. Alternativamente, en los procedimientos de detección basados en hibridación, también se puede usar un polinucleótido que tiene algunos centenares de bases (por ejemplo, aproximadamente 100-200) a algunos millares de bases (por ejemplo, aproximadamente 1000-2000) de longitud para una sonda (por ejemplo, ensayo de transferencia Northern o análisis de micromatrices de ADNc).
- 5
- 10 Alternativamente, se puede detectar el producto de traducción de UBE2T para la identificación de un sujeto que va a tratarse por el método de la presente divulgación. Por ejemplo, se puede determinar la cantidad de proteína UBE2T (SEQ ID NO: 65). Ejemplos de métodos de determinación de la cantidad de proteína UBE2T como el producto de traducción incluyen métodos de inmunoensayo que usan un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína UBE2T. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Además, se puede usar cualquier fragmento o modificación (por ejemplo, anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo para la detección, mientras que el fragmento o anticuerpo modificado retenga la capacidad de unión a la proteína UBE2T. Métodos de preparación de estos tipos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica, y se puede emplear cualquier método para preparar dichos anticuerpos y equivalentes de los mismos.
- 15
- 20 Como otro método de detección del nivel de expresión de UBE2T basado en su producto de traducción, se puede medir la intensidad de tinción mediante análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo contra la proteína UBE2T. Concretamente, en esta medición, tinción fuerte indica la presencia/nivel elevado de la proteína UBE2T, y al mismo tiempo, alto nivel de expresión de UBE2T.
- 25 Se puede determinar que el nivel de expresión del gen UBE2T en una muestra derivada de un sujeto es elevado si el nivel de expresión aumenta desde el nivel de control (por ejemplo, el nivel de expresión en células normales) de UBE2T, por ejemplo, 10 %, 25 %, o 50 %; o aumenta a más de 1,1 veces, más de 1,5 veces, más de 2,0 veces, más de 5,0 veces, más de 10,0 veces, o más.
- 30 El nivel de control se puede determinar al mismo tiempo que las células de cáncer usando una muestra(s) previamente recolectada(s) y almacenada(s) en un sujeto/sujetos sanos. Además, se pueden usar células normales obtenidas de regiones no cancerosas de un órgano que tiene el cáncer que va a tratarse como el control normal. Alternativamente, se puede determinar el nivel de control por un método estadístico basado en los resultados obtenidos analizando nivel(es) de expresión previamente determinado(s) de UBE2T en muestras de sujetos cuyos estados de enfermedad son conocidos. Además, el nivel de control se puede obtener de una base de datos de patrones de expresión de células previamente probadas. Además, según un aspecto de la presente invención, se puede comparar el nivel de expresión de UBE2T en una muestra biológica con niveles de control múltiples, que se determinan a partir de muestras de referencia múltiples. Se prefiere usar un nivel de control determinado de una muestra de referencia derivada de un tipo de tejido similar al de la muestra biológica derivada del sujeto. Además, se prefiere usar el valor estándar de los niveles de expresión del gen UBE2T en una población con un estado de enfermedad conocido. El valor estándar se puede obtener por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un intervalo de media +/- 2 D.E. o media +/- 3 D.E. como valor estándar.
- 35
- 40 La diferencia entre un nivel de expresión de muestra y un nivel de control se puede normalizar al nivel de expresión de ácidos nucleicos de control, por ejemplo, genes de mantenimiento, cuyos niveles de expresión son conocidos por no diferenciarse dependiendo del estado canceroso o no canceroso de la célula. Genes de control a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, beta-actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y proteína PI ribosómica.
- 45 Cuando el nivel de expresión de UBE2T es elevado en comparación con el nivel de control normal, el sujeto se puede identificar como un sujeto con cáncer que se va a ser tratar por administración de la composición farmacéutica o agente de la presente invención.
- La presente divulgación también proporciona un método de selección de un sujeto para el tratamiento de cáncer usando las composiciones farmacéuticas agentes o anteriormente mencionados de la presente invención, incluyendo dicho método las etapas de:
- 50 a) determinar el nivel de expresión de UBE2T en muestra(s) biológica(s) obtenidas de un sujeto con cáncer;
- b) comparar el nivel de expresión de UBE2T determinado en la etapa a) con un nivel de control normal; y
- c) seleccionar el sujeto para el tratamiento del cáncer por las composiciones farmacéuticas o agentes de la presente invención, si el nivel de expresión de UBE2T es elevado en comparación con el nivel de control normal.
- 55 Dicho método puede comprender además la etapa de identificar, después o antes de las etapas a)-c) definidas anteriormente, un sujeto que tiene un HLA seleccionado del grupo que consiste en HLA-A24 y HLA-A2. La terapia del cáncer según la presente divulgación es preferible para un sujeto que padece cáncer que expresa en exceso

UBE2T y tiene HLA-A24 o HLA-A2. Se conocen bien en la técnica los métodos para la tipificación de HLA. Por ejemplo, se conoce bien los métodos basados en PCR para la tipificación de alelos de HLA. Los anticuerpos específicos para cada molécula de HLA también son herramientas apropiadas para identificar tipos de HLA de un sujeto.

- 5 La presente divulgación proporciona además un kit de diagnóstico que incluye uno o más péptidos de la presente invención.

El cáncer se puede diagnosticar detectando anticuerpos contra el péptido de la presente invención en una muestra obtenida de sujeto (por ejemplo, sangre) usando el péptido de la presente invención.

- 10 Se sospecha que el sujeto padece cáncer, si una muestra obtenida de sujeto (por ejemplo, muestra de sangre) contiene anticuerpos contra el péptido de la presente invención y se determina que la cantidad de los anticuerpos es superior al valor de corte en comparación con el nivel de control.

- 15 Un kit de diagnóstico de la presente divulgación puede incluir el péptido de la presente invención y una molécula HLA que se une al mismo. Ya se ha establecido el método de detección de CTLs específicos de antígeno usando péptidos antigénicos y moléculas HLA (por ejemplo, Altman JD et al., Science, 1996, 274(5284): 94-6). Así, se pueden aplicar el complejo del péptido de la presente invención y la molécula HLA al método de detección para detectar CTLs específicos de antígeno de tumor, permitiendo así la detección temprana, reaparición y/o metástasis de cáncer. Además, se puede emplear para la selección de sujetos aplicables con la composición farmacéutica o agente que incluye el péptido de la presente invención como principio activo, o la evaluación del efecto de la composición farmacéutica o agente.

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

- 25 La presente divulgación proporciona además métodos y agentes de diagnóstico para evaluar la respuesta inmunológica del sujeto usando el péptido de la presente invención. En un ejemplo, los péptidos de la presente invención se usan como reactivos para evaluar o predecir una respuesta inmunitaria de un sujeto. La respuesta inmunitaria que va a ser evaluada se induce poniendo en contacto un inmunogén (es decir, el péptido de la presente invención) con células inmunocompetentes *in vitro* o *in vivo*. En ejemplos preferidos, las células inmunocompetentes para evaluar una respuesta inmunológica se pueden seleccionar de entre sangre periférica, linfocito de sangre periférica (LSP) y célula mononuclear de sangre periférica (CMSP). 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. En un ejemplo preferido, las células inmunocompetentes que se van a poner en contacto con el reactivo de péptido pueden ser células presentadoras de antígenos que incluyen células dendríticas.

- 35 Por ejemplo, los péptidos de la presente invención se pueden usar en ensayos de tinción con tetrámero para evaluar células mononucleares de sangre periférica para la presencia de CTLs específicos de antígeno tras la exposición a un antígeno de célula tumoral o un inmunogén. Se puede usar el complejo tetrámero de HLA para visualizar directamente los CTLs específicos de antígeno (véanse, por ejemplo, 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 CTLs específicos de antígeno en una muestra de células mononucleares de sangre periférica. Se puede generar un reactivo de tetrámero, tal como se describe más adelante, usando un péptido de la invención.

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

- 45 Los péptidos de la invención también se pueden usar para producir anticuerpos, usando técnicas muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; y Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), que pueden ser útiles como reactivos para diagnosticar o monitorizar el cáncer. Tales anticuerpos pueden incluir aquellos que reconocen un péptido en el contexto de una molécula de HLA, es decir, anticuerpos que se unen a un complejo de péptido-MHC.

- 50 Los péptidos y composiciones de la presente invención tienen varios usos adicionales, algunos de los cuales se describen en el presente documento. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un método de diagnóstico o detección de un trastorno caracterizado por la expresión de un polipéptido UBE2T.

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

10 Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un método de diagnóstico o evaluación de una respuesta inmunológica de un sujeto administrado al menos uno de los péptidos UBE2T de la presente invención, incluyendo el método las etapas de:

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

15 (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 CTLs.

En la presente divulgación, el inmunogén es al menos uno de los péptidos UBE2T que tiene las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58, y péptidos que tienen dichas secuencias de aminoácidos, y péptidos en los que dichas secuencias de aminoácidos se han modificado con sustitución (sustituciones) de 1, 2 o más aminoácidos. Mientras tanto, condiciones adecuadas de inducción de CTLs específicos de inmunogén son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden cultivar células inmunocompetentes *in vitro* en presencia de inmunogén (inmunogenes) para inducir CTLs específicos de inmunogén. Con el fin de inducir CTLs específicos de inmunogén, se puede añadir cualquier factor estimulante al cultivo celular. Por ejemplo, IL-2 es factores estimulantes preferibles para la inducción de CTLs.

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

Según la presente divulgación, la inducción potenciada de CTL específico de inmunogén en comparación con un control indica que el sujeto que va a evaluarse o diagnosticarse respondió inmunológicamente al inmunogén (a los inmunogenes) que ha/han sido administrado/s. Controles adecuados para evaluar la respuesta inmunológica pueden incluir, por ejemplo, un nivel de inducción de CTLs cuando las células inmunocompetentes se ponen en contacto con no péptido, o péptido(s) de control que tienen secuencias de aminoácidos distintas de cualquier péptido UBE2T (por ejemplo, secuencia de aminoácidos aleatoria).

XII. Anticuerpos

40 La presente divulgación proporciona además anticuerpos que se unen a péptidos de la presente invención. Anticuerpos preferidos se unen específicamente a péptidos de la presente invención y no se unirán (o se unirán débilmente) a aquellos otros péptidos distintos de los péptidos de la presente invención.

Los anticuerpos contra los péptidos de la presente invención pueden encontrar uso en ensayos de diagnóstico y pronóstico del cáncer. Similarmente, dichos anticuerpos pueden encontrar uso en el tratamiento, diagnóstico y/o pronóstico de cánceres, hasta el punto que UBE2T también se expresa o expresa en exceso en el cáncer. Además, los anticuerpos intracelularmente expresados (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios) pueden encontrar uso terapéutico en el tratamiento de cánceres en los que participa la expresión de UBE2T, incluyendo los ejemplos, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular.

La presente divulgación también proporciona diversos ensayos inmunológicos para la detección y/o cuantificación de la proteína UBE2T (SEQ ID NO: 65) o fragmentos de la misma, que incluye péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58. En el contexto de la presente divulgación, los anticuerpos que se unen al polipéptido UBE2T reconocen preferentemente el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58. Se puede confirmar una especificidad de unión

de un anticuerpo con la prueba de inhibición. Es decir, cuando se inhibe la unión entre un anticuerpo a analizar y la longitud completa del polipéptido UBE2T en presencia de cualquier fragmento que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58, se muestra que este anticuerpo se une específicamente al fragmento. En el contexto de la presente divulgación, dichos ensayos inmunológicos se realizan dentro de diversos formatos de ensayo inmunológico bien conocido en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, diversos tipos de radioinmunoensayos, técnica inmunocromatográfica, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA), y similares.

Ensayos inmunológicos relacionados, pero no de anticuerpo, pueden incluir ensayos de inmunogenicidad de linfocitos T (inhibidores o estimulantes), así como ensayos de unión al MHC. Además, la presente divulgación contempla métodos inmunológicos de obtención de imágenes capaces de detectar cánceres que expresan UBE2T, incluyendo los ejemplos, pero no se limitan a, métodos radioescintigráficos de obtención de imágenes usando anticuerpos marcados de la presente divulgación. Dichos ensayos encuentran uso clínico en la detección, monitorización y pronóstico de UBE2T que expresan cánceres, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular.

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

El anticuerpo de la presente divulgación puede reconocer péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58. Métodos de síntesis de un oligopéptido son muy conocidos en la técnica. Después de la síntesis, los péptidos se pueden purificar opcionalmente antes de usarse como un inmunógeno. En el contexto de la presente invención, el oligopéptido (por ejemplo, 9- o 10-mero) se puede conjugar o unir a vehículos para potenciar la inmunogenicidad. La hemocianina de lapa californiana (KLH) es muy conocida como el vehículo. El método para conjugar KLH y el péptido también es muy conocido en la técnica.

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

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

Se conocen en la técnica métodos de inmunización de animales con antígenos. La inyección intraperitoneal o inyección subcutánea de antígenos es un método convencional para la inmunización de mamíferos. Más específicamente, los antígenos se pueden diluir y suspender en una cantidad apropiada de solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, etc. Si se desea, la suspensión de antígeno se puede mezclar con una cantidad apropiada de un adyuvante estándar, tal como adyuvante completo de Freud, convertir en emulsión y posteriormente administrar a animales mamíferos. Preferentemente, es seguido por varias administraciones de antígeno mezclado con una cantidad apropiada de adyuvante incompleto de Freud durante 4 a 21 días. También se puede usar un vehículo apropiado para la inmunización. Después de la inmunización como antes, el suero se puede examinar por un método convencional para un aumento en la cantidad de anticuerpos deseados.

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

Para preparar anticuerpos monoclonales, se recolectan células inmunitarias de un mamífero inmunizado con el antígeno y se comprueba para el aumento del nivel de anticuerpos deseado en el suero, como se ha descrito anteriormente, y se someten a fusión celular. Las células inmunitarias usadas para la fusión celular se pueden

obtener preferentemente del bazo. Otras células parenterales preferidas que van a fusionarse con el inmunocito anterior incluyen, por ejemplo, células de mieloma de mamíferos, y más preferentemente células de mieloma que tienen una propiedad adquirida para la selección de células fusionadas por fármacos. El inmunocito anterior y las células de mieloma se pueden fusionar según métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein et al. (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).

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

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

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

También se pueden preparar recombinantemente los anticuerpos monoclonales obtenidos usando técnicas de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck y Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1990)). Por ejemplo, se puede clonar un ADN que codifica un anticuerpo a partir de una célula inmunitaria, tal como un hibridoma o un linfocito inmunizado que produce el anticuerpo, insertar en un vector apropiado e introducir en células hospedadoras para preparar un anticuerpo recombinante. La presente divulgación también proporciona anticuerpos recombinantes preparados como se ha descrito anteriormente.

Además, un anticuerpo de la presente divulgación puede ser un fragmento de un anticuerpo o anticuerpo modificado, mientras que se una al péptido de la presente invención. Por ejemplo, el fragmento del anticuerpo puede ser Fab, F(ab')₂, Fv o Fv monocaténario (scFv), en el que los fragmentos Fv de las cadenas H y L se ligan por un conector apropiado (Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-83 (1988)). Más específicamente, se puede generar un fragmento de anticuerpo tratando un anticuerpo con una enzima, tal como papaína o pepsina. Alternativamente, se puede construir un gen que codifica el fragmento de anticuerpo, insertar en un vector de expresión y expresar en una célula hospedadora apropiada (véanse, 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 variedad de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). La presente divulgación proporciona dichos anticuerpos modificados. El anticuerpo modificado se puede obtener modificando químicamente un anticuerpo. Estos métodos de modificación son convencionales en el campo.

Alternativamente, un anticuerpo de la presente divulgación se puede obtener como un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de un anticuerpo no humano y la región constante derivada del anticuerpo humano, o como un anticuerpo humanizado, que incluye la región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de un anticuerpo no humano, la región estructural (FR) y la región constante derivada de anticuerpo humano. Dichos anticuerpos se pueden preparar según la tecnología conocida. Se puede realizar humanización sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Verhoeyen et al., *Science* 239: 1534-1 1536 (1988)). Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

También se pueden usar anticuerpos completamente humanos que incluyen regiones variables humanas, además de la región estructural humana y regiones constantes. Dichos anticuerpos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas. Por ejemplo, los métodos *in vitro* implican el uso de genotecas recombinantes de fragmentos de anticuerpo humano presentados en bacteriófago (por ejemplo, Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991)). Similarmente, se pueden preparar anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 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 antes se pueden purificar hasta homogeneidad. Por ejemplo, se puede realizar la separación y purificación del anticuerpo según los métodos de separación y purificación usados para proteínas generales. Por ejemplo, el anticuerpo se puede separar y aislar por el uso apropiadamente seleccionado y combinado de cromatografías en columna, tales como cromatografía de afinidad, filtro, ultrafiltración, precipitación por sales, diálisis, electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida e isoelectroenfoque (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero no están limitadas a lo anterior. Se pueden usar una columna de proteína A y una columna de proteína G como la columna de afinidad. Columnas de proteína A a modo de ejemplo que van a usarse incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharose F.F. (Pharmacia).

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

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

XIII. Vectores y células hospedadoras

La presente divulgación también proporciona un vector y célula hospedadora en la que se introduce un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención. Se puede usar un vector de la presente divulgación para mantener un polinucleótido, especialmente un ADN, de la presente invención en la célula hospedadora, para expresar un péptido de la presente invención, o para administrar un polinucleótido de la presente invención para terapia génica.

Cuando *E. coli* es una célula hospedadora y el vector se amplifica y produce una gran cantidad en *E. coli* (por ejemplo, JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1Blue), el vector debe tener un "ori" para ser amplificado en *E. coli* y un gen marcador para seleccionar *E. coli* transformada (por ejemplo, un gen de resistencia a fármaco seleccionado por un fármaco tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol o similares). Por ejemplo, se pueden usar los vectores de la serie M13, vectores de la serie pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, etc. Además, también se pueden usar pGEM-T, pDIRECT y pT7 para subclonar y extraer el ADNc, así además de los vectores descritos anteriormente. Cuando se usa un vector para producir el péptido de la presente invención, puede encontrar uso un vector de expresión. Por ejemplo, un vector de expresión que va a expresarse en *E. coli* debe tener las características anteriores para ser amplificado en *E. coli*. Cuando *E. coli* se usa como una célula hospedadora, tal como JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1 Blue, el vector debe tener un promotor, por ejemplo, promotor lacZ (Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), promotor araB (Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)), promotor T7 o similares, que pueden expresar eficientemente el gen deseado en *E. coli*. En ese respecto, se pueden usar pGEX-5X-1 (Pharmacia), el "sistema QIAexpress" (Qiagen), pEGFP y pET (en este caso, el hospedador es preferentemente BL21 que expresa la ARN polimerasa T7), por ejemplo, en lugar de los vectores anteriores. Adicionalmente, el vector también puede contener una secuencia señal para la secreción de péptido. Una secuencia señal a modo de ejemplo que dirige el péptido que va a secretarse al periplasma de *E. coli* es la secuencia señal pelB (Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987)). Medios para introducir los vectores en las células hospedadoras diana incluyen, por ejemplo, el método de cloruro de calcio, y el método de electroporación.

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

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

de vectores conocidos con estas características incluyen, por ejemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

5 Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes.

Ejemplos

Parte experimental 1

Materiales y métodos

10 Líneas celulares

Se compró TISI, línea celular linfoblastoide B HLA-A*2402-positiva de IHWG Cell y Gene Bank (Seattle, WA). Se compraron T2, línea celular linfoblastoide B HLA-A*0201-positiva y COS7, línea celular de riñón de mono verde africano de ATCC.

Selección de candidatos a péptidos derivados de UBE2T

15 Se predijo que los péptidos 9-meros y 10-meros derivados de UBE2T se unían a la molécula HLA-A*2402 o HLA-A*0201 usando el servidor de predicción de uniones "NetMHC3.2" (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus et al., Tissue Antigens. 2003 Nov, 62(5):378-84; Nielsen et al., Protein Sci. 2003 May, 12(5):1007-17, Bioinformatics. 2004 Jun 12:20(9): 1388-97) y "BIMAS" (http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker et al., J Immunol 1994, 152(1): 163-75, Kuzushima et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81). Estos péptidos se sintetizaron por Biosynthesis (Lewisville, Texas) según un método de síntesis en fase sólida estándar y se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa. La pureza (>90 %) y la identidad de los péptidos se determinaron por HPLC analítica y análisis de espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en sulfóxido de dimetilo a 20 mg/ml y se guardaron a -80 °C.

20

Inducción de CTLs *in vitro*

25 Se usaron células dendríticas (DCs) derivadas de monocito como las células presentadoras de antígenos para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTLs) a péptidos presentados sobre el antígeno leucocitario humano (HLA). Las DCs se generaron *in vitro* como se describe en cualquier parte (Nakahara S et al., Cancer Res 2003, 63(14): 4112-8). Específicamente, se separaron células mononucleares de sangre periférica aisladas de un voluntario normal (HLA-A*2402 o HLA-A*0201 positivo) por disolución de Ficol-Paque (Pharmacia) por adherencia a una placa de cultivo de tejido de plástico (Becton Dickinson) de manera que se enriquecieran como la fracción de monocitos. La población enriquecida en monocitos se cultivó en presencia de 1000 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (R&D Systems) y 1000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D Systems) en medio AIM-V (Invitrogen) que contenía 2 % de suero autólogo inactivado por calor (AS). Después de 7 días de cultivo, las DCs inducidas por citocina se pulsaron con 20 micro-g/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en presencia de 35 3 micro-g/ml de beta-2-microglobulina durante 3 h a 37 °C en medio AIM-V. Pareció que las células generadas expresaban moléculas asociadas a DCs, tales como CD80, CD83, CD86 y clase II de HLA, sobre sus superficies celulares (datos no mostrados). Estas DCs pulsadas con péptido se inactivaron entonces por irradiación con rayos X (20 Gy) y mezcla a una relación 1:20 con linfocitos T CD8⁺ autólogos, obtenidos por selección positiva con el kit CD8 Positive Isolation (Dyna). Estos cultivos se dispusieron en placas de 48 pocillos (Corning); cada pocillo contuvo 40 1,5 X 10⁴ DCs pulsadas con péptido, 3 X 10⁵ linfocitos T CD8⁺ y 10 ng/ml de IL-7 (R&D Systems) en 0,5 ml de medio AIM-V/2 % de AS. Tres días después, estos cultivos se complementaron con IL-2 (CHIRON) a una concentración final de 20 UI/ml. En el día 7 y 14, los linfocitos T se estimularon adicionalmente con las DCs pulsadas con péptido autólogo. Las DCs se prepararon cada vez por la misma forma descrita anteriormente. Los CTLs se probaron contra 45 células TISI pulsadas con péptido o TS pulsadas con péptido después de la 3^a ronda de estimulación de péptido en el día 21 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506).

Procedimiento de expansión de CTLs

50 Se expandieron CTLs en cultivo usando el método similar al descrito por Riddell et al. (Walteran EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2): 216-23). Se suspendieron un total de 5 x 10⁴ CTLs en 25 ml de medio AIM-V/5 % de AS con 2 tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas, inactivadas por mitomicina C, en presencia de 40 ng/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen). Un día después de iniciar los cultivos, se añadieron 120 UI/ml de IL-2 a los cultivos. Los cultivos se alimentaron con medio AIM-V/5 % de AS fresco que contenía 30 UI/ml de IL-2 en los días 5, 8 y 11 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., 55 Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506).

Establecimiento de clones de CTLs

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

10 Actividad de CTLs específicos

Para examinar la actividad de CTLs específicos, se realizaron ensayo de inmunotransferencia por puntos asociada a enzima (ELISPOT) de interferón (IFN)-gamma y enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) de IFN-gamma. Específicamente, se prepararon células TISI pulsadas con péptido o células T2 pulsadas con péptido (1×10^4 /pocillo) como células estimuladoras. Se usaron células cultivadas en 48 pocillos como células respondedoras. Se realizaron ensayo de ELISPOT de IFN-gamma y ensayo de ELISA de IFN-gamma según el procedimiento del fabricante.

15 Establecimiento de las células que expresan forzosamente cualquiera o ambos del gen diana y HLA-A24 o HLA-A2

Se amplificó por PCR el ADNc que codifica un marco de lectura abierto de UBE2T, HLA-A*2402 o HLA-A*0201. Se clonó el producto amplificado por PCR en un vector de expresión. Los vectores se transfectaron en células COS7, que son línea celular UBE2T-nulo, HLA-A*2402-nulo y HLA-A*0201-nulo, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según los procedimientos recomendados por el fabricante. Después de 2 días desde la transfección, se recogieron las células transfectadas con Versene (Invitrogen) y se usaron como las células diana (5×10^4 células/ pocillo) para el ensayo de actividad de CTLs.

Resultados

Expresión de UBE2T potenciada en cánceres

25 El amplio perfil de los datos de expresión génica obtenidos de diversos cánceres usando micromatriz de ADNc reveló que la expresión de UBE2T (Nº de acceso de GenBank NM_014176 (SEQ ID NO: 64)) fue elevada. La expresión de UBE2T se elevó de forma en 24 de los 24 cánceres de vejiga, 44 de los 50 cánceres de mama, 14 de los 15 cánceres de cuello uterino, 12 de los 12 carcinomas colangiocelulares, 9 de los 16 CMLs, 9 de los 9 cánceres colorrectales, 31 de los 47 cánceres de esófago, 5 de los 8 cánceres gástricos, 2 de los 2 cánceres gástricos de tipo difuso, 23 de los 27 NSCLCs, 3 de los 3 linfomas, 9 de los 16 osteosarcomas, 3 de los 7 cánceres de ovario, 3 de los 30 3 cánceres pancreáticos, 21 de los 23 cánceres de próstata, 12 de los 12 SCLCs, 11 de los 26 tumores de tejido blando y 7 de los 9 tumores testiculares, en comparación con los tejidos normales correspondientes (Tabla 1).

[Tabla 1]

Relación de casos observados regulación por incremento de UBE2T en tejidos cancerosos en comparación con tejidos correspondientes normales.

Cáncer/Tumor	Relación
Cáncer de vejiga	24/24
Cáncer de mama	44/50
Cáncer de cuello uterino	14/15
Carcinoma colangiocelular	12/12
CML	9/16
Cáncer colorrectal	9/9
Cáncer de esófago	31/47
Cáncer gástrico	5/8
Cáncer gástrico de tipo difuso	2/2
NSCLC	23/27
Linfoma	3/3
Osteosarcoma	9/16
Cáncer de ovario	3/7
Cáncer pancreático	3/3
Cáncer de próstata	21/23
SCLC	12/12
Tumor de tejido blanco	11/26
Tumor testicular	7/9

Predicción de péptidos de unión de HLA-A24 derivados de UBE2T

- 5 La Tabla 2a y 2b muestran los péptidos 9-meros y 10-meros que se unen a HLA-A24 de UBE2T en el orden de alta afinidad de unión. Se seleccionaron un total de 27 péptidos con posible capacidad de unión a HLA-A24 y se examinaron para determinar los péptidos de epitope.

[Tabla 2a]

Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A24 derivados de UBE2T			
SEQ ID NO	Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Kd (nM)
1	60	RYPFEPPI	25
2	45	PYEKGVFKL	752
3	124	LMADISSEF	1463
4	133	KYNKPAFLK	2283
5	55	VIIIPERYPF	3082
6	138	AFLKNARQW	3317
7	6	RLKRELHML	3711

ES 2 784 862 T3

8	71	LTPIYHPNI	4077
9	131	EFKYNKPAF	4692
10	62	PFEPQIRF	7647
11	43	NTPYEKGVF	9498
12	106	TVLTSIQLL	9831
SEQ ID NO	Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Puntuación de unión
13	3	RASRLKREL	10,56
14	84	RICLDVLKL	8,8
15	105	ATVLTSIQL	6
16	74	IYHPNIDSA	6

[Tabla 2b]

Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A24 derivados de UBE2T			
SEQ ID NO	Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Kd (nM)
17	130	SEFKYNKPAF	776
18	123	PLMADISSEF	5392
19	131	EFKYNKPAFL	7050
SEQ ID NO	Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Puntuación de unión
20	133	KYNKPAFLKN	19,8
21	99	RPSLNIAATVL	11,2
22	154	KQKADEEEML	8
23	105	ATVLTSIQLL	7,2
24	115	MSEPNPDDPL	7,2
25	177	STQKRKASQL	6
26	30	QMDDLRAQIL	5,76
27	44	TPYEKGVFKL	5,28

Posición inicial indica el número de resto de aminoácido desde el extremo N de UBE2T.

La puntuación de unión y la constante de disociación [Kd (nM)] derivan de "BIMAS" y "NetMHC3.2", respectivamente.

Predicción de péptidos que se unen a HLA-A02 derivados de UBE2T

- 5 La Tabla 3a y 3b muestran los péptidos 9-meros y 10-meros que se unen a HLA-A02 de UBE2T en el orden de alta afinidad de unión. Se seleccionaron un total de 36 péptidos con posible capacidad de unión a HLA-A02 y se examinaron para determinar los péptidos de epítope.

[Tabla 3a]

Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A02 derivados de UBE2T			
SEQ ID NO	Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Kd (nM)
28	161	EMLDNLPEA	76
29	107	VLTSIQLLM	385
30	30	QMDDLRAQI	473
31	103	NIATVLTSI	668
32	106	TVLTSIQLL	1048
33	124	LMADISSEF	1595
34	6	RLKRELHML	1653
35	101	SLNIATVLT	3347
36	49	GVFKLEVII	5114
37	70	FLTPIYHPN	5950
38	13	MLATEPPPG	6039
39	84	RICLDVLKL	6284
40	66	PQIRFLTPI	6587
41	132	FKYNKPAFL	6642
42	96	GAWRPSLNI	8188
43	81	SAGRICLDV	8938
44	14	LATEPPPGI	9511
45	105	ATVLSIQL	9872
SEQ ID NO	Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Puntuación de unión
46	139	FLKNARQWT	6,599

[Tabla 3b]

Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A02 derivados de UBE2T			
SEQ ID NO	Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Kd (nM)
47	13	MLATEPPPGI	43
48	70	FLTPIYHPNI	49
49	6	RLKRELHMLA	1415
50	165	NLPEAGDSRV	1902
51	106	TVLTSIQLLM	2648
52	102	LNIATVLTSI	3011
53	30	QMDDLRAQIL	4035
54	12	HMLATEPPPG	4153

55	101	SLNIATVLTS	4622
56	29	DQMDDLRAQI	5029
57	105	ATVLTSIQLL	5128
58	38	ILGGANTPYE	6464
59	107	VLTSIQLLMS	7911
60	161	EMLDNLPEAG	9002
61	113	LLMSEPNPDD	9132
62	104	IATVLTSIQL	9157
SEQ ID NO	Posición inicial	secuencia de aminoácidos	Puntuación de unión
63	44	TPYEKGVFKL	24,406

Posición inicial indica el número de resto de aminoácido desde el extremo N de UBE2T.

La puntuación de unión y la constante de disociación [Kd (nM)] derivan de "BIMAS" y "NetMHC3.2", respectivamente.

Inducción de CTLs con los péptidos predichos de UBE2T restringidos con HLA-A *2402

Se generaron CTLs para los péptidos derivados de UBE2T según los protocolos como se describen en "Materiales y métodos". Se detectó la actividad de CTLs específicos de péptido por el ensayo de ELISPOT de IFN-gamma (Figura 1). Mostró que el pocillo número N° 8 estimulado con UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1) (a), N° 1 estimulado con UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO: 2) (b), N° 6 estimulado con UBE2T-A24-9-133 (SEQ ID NO: 4) (c), N° 6 estimulado con UBE2T-A24-9-138 (SEQ ID NO: 6) (d), N° 4 estimulado con UBE2T-A24-9-43 (SEQ ID NO: 11) (e), N° 2 estimulado con UBE2T-A24-9-106 (SEQ ID NO: 12) (f), N° 6 estimulado con UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO: 13) (g), N° 3 estimulado con UBE2T-A24-9-105 (SEQ ID NO: 15) (h), N° 2 estimulado con UBE2T-A24-10-130 (SEQ ID NO: 17) (i), N° 1 estimulado con UBE2T-A24-10-131 (SEQ ID NO: 19) (j), N° 3 estimulado con UBE2T-A24-10-133 (SEQ ID NO: 20) (k), N° 6 estimulado con UBE2T-A24-10-99 (SEQ ID NO: 21) (l), N° 7 estimulado con UBE2T-A24-10-154 (SEQ ID NO: 22) (m), N° 8 estimulado con UBE2T-A24-10-105 (SEQ ID NO: 23) (n), N° 1 estimulado con UBE2T-A24-10-115 (SEQ ID NO: 24) (o), N° 4 estimulado con UBE2T-A24-10-177 (SEQ ID NO: 25) (p) y N° 7 estimulado con UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO: 27) (q) demostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control. Por otra parte, no se detectó actividad de CTLs específicos por estimulación con otros péptidos mostrados en la Tabla 2a y 2b, a pesar de que los péptidos tuvieron posible actividad de unión con HLA-A*2402. Como un caso típico de datos negativos, no se mostró producción de IFN-gamma específica de los CTLs estimulados con UBE2T-A24-9-124 (SEQ ID NO: 3) (r). Como resultado, indicó que 17 péptidos derivados de UBE2T se seleccionaron como los péptidos que podrían inducir potentes CTLs.

Inducción de CTLs con los péptidos predichos de UBE2T restringidos con HLA-A *0201

Se generaron CTLs para los péptidos derivados de UBE2T según los protocolos como se describen en "Materiales y métodos". Se detectó la actividad de CTLs específicos de péptido por el ensayo de ELISPOT de IFN-gamma (Figura 2). Mostró que el pocillo número N° 4 estimulado con UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO: 29) (a), N° 5 estimulado con UBE2T-A02-9-30 (SEQ ID NO: 30) (b), N° 7 estimulado con UBE2T-A02-9-106 (SEQ ID NO: 32) (c), N° 5 estimulado con UBE2T-A02-9-49 (SEQ ID NO: 36) (d), N° 3 estimulado con UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO: 38) (e), N° 4 estimulado con UBE2T-A02-9-132 (SEQ ID NO: 41) (f), N° 6 estimulado con UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48) (g), N° 7 estimulado con UBE2T-A02-10-6 (SEQ ID NO: 49) (h), N° 8 estimulado con UBE2T-A02-10-106 (SEQ ID NO: 51) (i), N° 2 estimulado con UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO: 52) (j), N° 1 estimulado con UBE2T-A02-10-30 (SEQ ID NO: 53) (k), N° 8 estimulado con UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO: 55) (l), N° 5 estimulado con UBE2T-A02-10-29 (SEQ ID NO: 56) (m) y N° 3 estimulado con UBE2T-A02-10-38 (SEQ ID NO: 58) (n) demostraron potente producción de IFN-gamma en comparación con los pocillos de control. Por otra parte, no se detectó actividad de CTLs específicos por estimulación con otros péptidos mostrados en la Tabla 3a y 3b, a pesar de que los péptidos tuvieron posible actividad de unión con HLA-A*0201. Como un caso típico de datos negativos, no se mostró producción de IFN-gamma específica de los CTLs estimulado con UBE2T-A02-9-161 (SEQ ID NO: 28) (o). Como resultado, indicó que 14 péptidos derivados de UBE2T se seleccionaron como los péptidos que podrían inducir potentes CTLs.

Establecimiento de la línea y clon de CTLs contra péptido derivado de UBE2T

Se expandieron las células en el pocillo número N° 8 estimuladas con UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1) (a), N° 1 estimuladas con UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO: 2) (b), N° 6 estimuladas con UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO: 13) (c) y

- Nº 7 estimuladas con UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO: 27), que mostraron actividad de CTLs específicos de péptido en el ensayo ELISPOT de IFN-gamma, y se establecieron las líneas de CTLs. Se midieron las actividades de CTLs de estas líneas de CTLs por ELISA de IFN-gamma (Figura 3). Demostraron que las líneas de CTLs mostraron una potente producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido correspondiente en comparación con las células diana sin pulso de péptido. Además, se establecieron los clones de CTLs por dilución limitante de las líneas de CTLs como se describe en "Materiales y métodos", y se midieron las producciones de IFN-gamma de los clones de CTLs contra células TISI pulsadas con péptido correspondiente por ELISA de IFN-gamma. Se observaron potentes producciones de IFN-gamma de los clones de CTLs estimulados con UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1) (a), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO: 2) (b) y UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO: 13) (c) (Figura 4).
- Se expandieron las células en el pocillo número Nº 4 estimuladas con UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO: 29) (a), Nº 3 estimuladas con UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO: 38) (b), Nº 6 estimuladas con UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48) (c), Nº 2 estimuladas con UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO: 52) (d) y Nº 8 estimuladas con UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO: 55) (e), que mostraron actividad de CTLs específicos de péptido en el ensayo ELISPOT de IFN-gamma, y se establecieron las líneas de CTLs. Se midieron las actividades de CTLs de estas líneas de CTLs por ELISA de IFN-gamma (Figura 5). Demostraron que las líneas de CTLs mostraron potente producción de IFN-gamma contra células diana pulsadas con el péptido correspondiente en comparación con células diana sin pulso de péptido. Además, se establecieron los clones de CTLs por dilución limitante de las líneas de CTLs como se describe en "Materiales y Métodos", y se midieron las producciones de IFN-gamma de los clones de CTLs contra células T2 pulsadas con péptido correspondiente por ELISA de IFN-gamma. Se observaron potentes producciones de IFN-gamma de los clones de CTLs estimulados con UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO: 29) (a), UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO: 38) (b), UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48) (c), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO: 52) (d) y UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO: 55) (e) (Figura 6).

Actividad de CTLs específicos frente a células diana que expresan UBE2T y HLA-A*2402 o HLA-A*0201

- Se examinó el clon de CTL establecido contra UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1) para la capacidad de reconocer células diana que expresan UBE2T y molécula de HLA-A*2402. Se prepararon células COS7 transfectadas con tanto la longitud completa del gen UBE2T como HLA-A*2402 (un modelo específico para las células diana que expresan el gen UBE2T y HLA-A*2402) como células estimuladoras, y se usaron células COS7 transfectadas con o longitud completa de UBE2T o HLA-A*2402 como controles. En la Figura 7, el clon de CTL estimulado con UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1) mostró potente actividad de CTLs contra células COS7 que expresan tanto UBE2T como HLA-A*2402. Por otra parte, no se detectó actividad de CTLs específicos significativa contra los controles. Así, estos datos demuestran claramente que el péptido UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1) se procesa endógenamente y se expresa sobre las células diana con molécula de HLA-A*2402 y es reconocido por los CTLs. Estos resultados indican que este péptido derivado de UBE2T puede estar disponible para aplicar las vacunas contra el cáncer a pacientes con tumores que expresan UBE2T.
- Se examinó la línea de CTLs establecida contra el péptido UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48) para la capacidad de reconocer células diana que expresan UBE2T y la molécula de HLA-A*0201. Se prepararon células COS7 transfectadas con tanto la longitud completa del gen UBE2T y HLA-A*0201 (un modelo específico para las células diana que expresan el gen UBE2T y HLA-A*0201) como células estimuladoras, y se usaron células COS7 transfectadas con o longitud completa de UBE2T o HLA-A*0201 como controles. En la Figura 8, la línea de CTLs estimulados con UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48) mostró potente actividad de CTLs contra células COS7 que expresan tanto UBE2T como HLA-A*0201. Por otra parte, no se detectó actividad de CTLs específicos significativa contra los controles. Así, estos datos demuestran claramente que el péptido UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48) se procesa endógenamente y se expresa sobre las células diana con molécula de HLA-A*0201 y es reconocido por los CTLs. Estos resultados indican que este péptido derivado de UBE2T puede estar disponible para aplicar las vacunas contra el cáncer a pacientes con tumores que expresan UBE2T.

Análisis de homología de péptidos de antígeno

- Los CTLs estimulados con UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO: 2), UBE2T-A24-9-133 (SEQ ID NO: 4), UBE2T-A24-9-138 (SEQ ID NO: 6), UBE2T-A24-9-43 (SEQ ID NO: 11), UBE2T-A24-9-106 (SEQ ID NO: 12), UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO: 13), UBE2T-A24-9-105 (SEQ ID NO: 15), UBE2T-A24-10-130 (SEQ ID NO: 17), UBE2T-A24-10-131 (SEQ ID NO: 19), UBE2T-A24-10-133 (SEQ ID NO: 20), UBE2T-A24-10-99 (SEQ ID NO: 21), UBE2T-A24-10-154 (SEQ ID NO: 22), UBE2T-A24-10-105 (SEQ ID NO: 23), UBE2T-A24-10-115 (SEQ ID NO: 24), UBE2T-A24-10-177 (SEQ ID NO: 25), UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO: 27), UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO: 29), UBE2T-A02-9-30 (SEQ ID NO: 30), UBE2T-A02-9-106 (SEQ ID NO: 32), UBE2T-A02-9-49 (SEQ ID NO: 36), UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO: 38), UBE2T-A02-9-132 (SEQ ID NO: 41), UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48), UBE2T-A02-10-6 (SEQ ID NO: 49), UBE2T-A02-10-106 (SEQ ID NO: 51), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO: 52), UBE2T-A02-10-30 (SEQ ID NO: 53), UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO: 55), UBE2T-A02-10-29 (SEQ ID NO: 56) y UBE2T-A02-10-38 (SEQ ID NO: 58) mostraron actividad de CTLs significativa y específica. Este resultado puede ser debido al hecho de que las secuencias de UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO: 2), UBE2T-A24-9-133 (SEQ ID NO: 4), UBE2T-A24-9-138 (SEQ ID NO: 6), UBE2T-A24-9-43 (SEQ ID NO: 11), UBE2T-A24-9-106 (SEQ ID NO: 12), UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO: 13), UBE2T-A24-9-105 (SEQ ID NO: 15), UBE2T-A24-10-130 (SEQ ID NO: 17), UBE2T-A24-10-131 (SEQ ID NO: 19), UBE2T-A24-10-133

(SEQ ID NO: 20), UBE2T-A24-10-99 (SEQ ID NO: 21), UBE2T-A24-10-154 (SEQ ID NO: 22), UBE2T-A24-10-105 (SEQ ID NO: 23), UBE2T-A24-10-115 (SEQ ID NO: 24), UBE2T-A24-10-177 (SEQ ID NO: 25), UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO: 27), UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO: 29), UBE2T-A02-9-30 (SEQ ID NO: 30), UBE2T-A02-9-106 (SEQ ID NO: 32), UBE2T-A02-9-49 (SEQ ID NO: 36), UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO: 38), UBE2T-A02-9-132 (SEQ ID NO: 41), UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48), UBE2T-A02-10-6 (SEQ ID NO: 49), UBE2T-A02-10-106 (SEQ ID NO: 51), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO: 52), UBE2T-A02-10-30 (SEQ ID NO: 53), UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO: 55), UBE2T-A02-10-29 (SEQ ID NO: 56) y UBE2T-A02-10-38 (SEQ ID NO: 58) son homólogas al péptido derivado de otras moléculas que son conocidas por sensibilizar el sistema inmunitario humano. Para excluir esta posibilidad, se realizaron análisis de homología para estas secuencias de péptidos usando como búsquedas el algoritmo 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 la secuencia de UBE2T-A24-9-60 (SEQ ID NO: 1), UBE2T-A24-9-45 (SEQ ID NO: 2), UBE2T-A24-9-133 (SEQ ID NO: 4), UBE2T-A24-9-138 (SEQ ID NO: 6), UBE2T-A24-9-43 (SEQ ID NO: 11), UBE2T-A24-9-106 (SEQ ID NO: 12), UBE2T-A24-9-3 (SEQ ID NO: 13), UBE2T-A24-9-105 (SEQ ID NO: 15), UBE2T-A24-10-130 (SEQ ID NO: 17), UBE2T-A24-10-131 (SEQ ID NO: 19), UBE2T-A24-10-133 (SEQ ID NO: 20), UBE2T-A24-10-99 (SEQ ID NO: 21), UBE2T-A24-10-154 (SEQ ID NO: 22), UBE2T-A24-10-105 (SEQ ID NO: 23), UBE2T-A24-10-115 (SEQ ID NO: 24), UBE2T-A24-10-177 (SEQ ID NO: 25), UBE2T-A24-10-44 (SEQ ID NO: 27), UBE2T-A02-9-107 (SEQ ID NO: 29), UBE2T-A02-9-30 (SEQ ID NO: 30), UBE2T-A02-9-106 (SEQ ID NO: 32), UBE2T-A02-9-49 (SEQ ID NO: 36), UBE2T-A02-9-13 (SEQ ID NO: 38), UBE2T-A02-9-132 (SEQ ID NO: 41), UBE2T-A02-10-70 (SEQ ID NO: 48), UBE2T-A02-10-6 (SEQ ID NO: 49), UBE2T-A02-10-106 (SEQ ID NO: 51), UBE2T-A02-10-102 (SEQ ID NO: 52), UBE2T-A02-10-30 (SEQ ID NO: 53), UBE2T-A02-10-101 (SEQ ID NO: 55), UBE2T-A02-10-29 (SEQ ID NO: 56) y UBE2T-A02-10-38 (SEQ ID NO: 58) son únicas y así exista poca posibilidad, a nuestro leal conocimiento, de que estas moléculas produzcan respuesta inmunológica involuntaria a alguna molécula sin relacionar. En conclusión, los presentes inventores identificaron novedosos péptidos de epítopes de HLA-A*2402 o HLA-A*0201 derivados de UBE2T. Además, se demostró que los de péptidos epítopes de UBE2T se pueden aplicar para inmunoterapia contra el cáncer.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona nuevos péptidos de epítopes derivados de UBE2T que pueden inducir respuestas inmunitarias antitumorales potentes y específicas y tener aplicabilidad para una amplia variedad de tipos de cáncer. Dichos péptidos pueden encontrar uso como vacunas de péptido contra enfermedades asociadas a UBE2T, por ejemplo, cáncer, más particularmente, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, 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, tumor de tejido blando y tumor testicular.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDOS UBE2T Y VACUNAS QUE LOS CONTIENEN

<130> ONC-A1213P

<150>US 61/699.550

<151> 11-09-2012

<160> 69

<170>PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

ES 2 784 862 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 1

Arg Tyr Pro Phe Glu Pro Pro Gln Ile
1 5

10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 2

20

Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe Lys Leu
1 5

<210> 3

<211> 9

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

30

<400> 3

Leu Met Ala Asp Ile Ser Ser Glu Phe
1 5

35

<210> 4

ES 2 784 862 T3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 4

10

Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu Lys
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

20

<400> 5

Val Ile Ile Pro Glu Arg Tyr Pro Phe
1 5

<210> 6

25

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 6

Ala Phe Leu Lys Asn Ala Arg Gln Trp
1 5

35

ES 2 784 862 T3

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 7

10

Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

20

<400> 8

Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn Ile
1 5

25

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 9

35

Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> un péptido derivado de UBE2T

10 <400> 10

Pro Phe Glu Pro Pro Gln Ile Arg Phe
1 5

<210> 11
15 <211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 11

Asn Thr Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe
1 5

25 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 12

35

ES 2 784 862 T3

Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu
1 5

<210> 13

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 13

Arg Ala Ser Arg Leu Lys Arg Glu Leu
1 5

<210> 14

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 14

Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Leu
1 5

25

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 15

35

ES 2 784 862 T3

Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu
1 5

5
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> un péptido derivado de UBE2T

10
<400> 16

Ile Tyr His Pro Asn Ile Asp Ser Ala
1 5

15
<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> un péptido derivado de UBE2T

20
<400> 17

Ser Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe
1 5 10

25
<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 18

35

ES 2 784 862 T3

Pro Leu Met Ala Asp Ile Ser Ser Glu Phe
1 5 10

<210> 19

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 19

Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu
1 5 10

<210> 20

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 20

Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu Lys Asn
1 5 10

25

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 21

35

ES 2 784 862 T3

Arg Pro Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu
1 5 10

<210> 22

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 22

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

<210> 23

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 23

Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu
1 5 10

25

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 24

35

ES 2 784 862 T3

Met Ser Glu Pro Asn Pro Asp Asp Pro Leu
1 5 10

<210> 25

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 25

Ser Thr Gln Lys Arg Lys Ala Ser Gln Leu
1 5 10

<210> 26

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 26

Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile Leu
1 5 10

25

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 27

35

ES 2 784 862 T3

Thr Pro Tyr Glu Lys Gly Val Phe Lys Leu
1 5 10

<210> 28

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 28

Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala
1 5

<210> 29

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 29

Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu Met
1 5

25

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 30

35

ES 2 784 862 T3

Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile
1 5

<210> 31

<211> 9

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 31

Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile
1 5

<210> 32

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 32

Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu
1 5

25

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 33

35

ES 2 784 862 T3

Leu Met Ala Asp Ile Ser Ser Glu Phe
1 5

<210> 34

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 34

Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu
1 5

<210> 35

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 35

Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr
1 5

25

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 36

35

ES 2 784 862 T3

Gly Val Phe Lys Leu Glu Val Ile Ile
1 5

<210> 37

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 37

Phe Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn
1 5

<210> 38

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 38

Met Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly
1 5

25

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 39

35

ES 2 784 862 T3

Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Leu
1 5

<210> 40

<211> 9

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 40

Pro Gln Ile Arg Phe Leu Thr Pro Ile
1 5

<210> 41

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 41

Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu
1 5

25

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 42

35

ES 2 784 862 T3

Gly Ala Trp Arg Pro Ser Leu Asn Ile
1 5

<210> 43

<211> 9

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 43

Ser Ala Gly Arg Ile Cys Leu Asp Val
1 5

<210> 44

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 44

Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly Ile
1 5

25

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 45

35

ES 2 784 862 T3

Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu
1 5

<210> 46

<211> 9

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 46

Phe Leu Lys Asn Ala Arg Gln Trp Thr
1 5

<210> 47

15

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 47

Met Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly Ile
1 5 10

25

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 48

35

ES 2 784 862 T3

Phe Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn Ile
1 5 10

<210> 49

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 49

Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu Ala
1 5 10

<210> 50

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 50

Asn Leu Pro Glu Ala Gly Asp Ser Arg Val
1 5 10

25

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 51

35

ES 2 784 862 T3

Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu Met
1 5 10

<210> 52

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 52

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

<210> 53

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 53

Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile Leu
1 5 10

25

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 54

35

ES 2 784 862 T3

His Met Leu Ala Thr Glu Pro Pro Pro Gly
1 5 10

5
<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 55

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

15
<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 56

Asp Gln Met Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile
1 5 10

25
<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 57

35

ES 2 784 862 T3

Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu
1 5 10

<210> 58

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 58

Ile Leu Gly Gly Ala Asn Thr Pro Tyr Glu
1 5 10

<210> 59

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 59

Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu Leu Met Ser
1 5 10

25

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 60

35

ES 2 784 862 T3

Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala Gly
1 5 10

<210> 61

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

10

<400> 61

Leu Leu Met Ser Glu Pro Asn Pro Asp Asp
1 5 10

<210> 62

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 62

Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln Leu
1 5 10

25

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> un péptido derivado de UBE2T

<400> 63

35

ES 2 784 862 T3

```

Met Ala Asp Ile Ser Ser Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu
125                      130                      135                      140

aag aat gcc aga cag tgg aca gag aag cat gca aga cag aaa caa aag      604
Lys Asn Ala Arg Gln Trp Thr Glu Lys His Ala Arg Gln Lys Gln Lys
                      145                      150                      155

gct gat gag gaa gag atg ctt gat aat cta cca gag gct ggt gac tcc      652
Ala Asp Glu Glu Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala Gly Asp Ser
                      160                      165                      170

aga gta cac aac tca aca cag aaa agg aag gcc agt cag cta gta ggc      700
Arg Val His Asn Ser Thr Gln Lys Arg Lys Ala Ser Gln Leu Val Gly
                      175                      180                      185

ata gaa aag aaa ttt cat cct gat gtt tag gggacttgtc ctggttcac      750
Ile Glu Lys Lys Phe His Pro Asp Val
                      190                      195

ttagttaatg tgttctttgc caaggtgac taagttgcct accttgaatt tttttttaa      810

tatatttgat gacataatth ttgtgtagtt tatttatctt gtacatatgt attttgaat      870

cttttaaac tgaaaaataa atagtcattt aatggtgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      930
aaaaa                                                                935

```

<210> 65

<211> 197

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

```

Met Gln Arg Ala Ser Arg Leu Lys Arg Glu Leu His Met Leu Ala Thr
1                      5                      10                      15

Glu Pro Pro Pro Gly Ile Thr Cys Trp Gln Asp Lys Asp Gln Met Asp
20                      25                      30

Asp Leu Arg Ala Gln Ile Leu Gly Gly Ala Asn Thr Pro Tyr Glu Lys
35                      40                      45

Gly Val Phe Lys Leu Glu Val Ile Ile Pro Glu Arg Tyr Pro Phe Glu
50                      55                      60

Pro Pro Gln Ile Arg Phe Leu Thr Pro Ile Tyr His Pro Asn Ile Asp
65                      70                      75                      80

Ser Ala Gly Arg Ile Cys Leu Asp Val Leu Lys Leu Pro Pro Lys Gly
85                      90                      95

Ala Trp Arg Pro Ser Leu Asn Ile Ala Thr Val Leu Thr Ser Ile Gln
100                      105                      110

```

10

ES 2 784 862 T3

Leu Leu Met Ser Glu Pro Asn Pro Asp Asp Pro Leu Met Ala Asp Ile
 115 120 125

Ser Ser Glu Phe Lys Tyr Asn Lys Pro Ala Phe Leu Lys Asn Ala Arg
 130 135 140

Gln Trp Thr Glu Lys His Ala Arg Gln Lys Gln Lys Ala Asp Glu Glu
 145 150 155 160

Glu Met Leu Asp Asn Leu Pro Glu Ala Gly Asp Ser Arg Val His Asn
 165 170 175

Ser Thr Gln Lys Arg Lys Ala Ser Gln Leu Val Gly Ile Glu Lys Lys
 180 185 190

Phe His Pro Asp Val
 195

<210> 66

<211> 22

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> un cebador de PCR para el análisis de TCR

10

<400> 66

gtctaccaggcattcgcttc a 22

<210> 67

15 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> un cebador de PCR para el análisis de TCR

<400> 67

tcagctggaccacagccgcagcgt 24

25 <210> 68

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> un cebador de PCR para el análisis de TCR

<400> 68

tcagaaatcctttctcttga c 21

10 <210> 69

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> un cebador de PCR para el análisis de TCR

<400> 69

ctagcctctggaatcctttctctt 24

20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos capaz de inducir linfocitos T citotóxicos (CTLs), en donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos (a) o (b) a continuación:

5 (a) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58; o

(b) una secuencia de aminoácidos en que 1 o 2 aminoácido(s) están sustituidos y/o añadidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58;

en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en (i) y (ii) del siguiente modo:

10 (i) un péptido que tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 está sustituido con fenilalanina, tirosina, metionina o triptófano; y

15 (b) el aminoácido del extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 está sustituido con fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina; o

(ii) un péptido que tiene una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58 está sustituido con leucina o metionina; y

20 (b) el aminoácido del extremo C de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 49, 51, 52, 53, 55, 56 o 58 está sustituido con valina o leucina; y

en donde los aminoácidos, si se añaden, se añaden al extremo N y/o C del péptido.

25 2. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 56 y 58.

3. Un polinucleótido aislado que codifica el péptido de la reivindicación 1 o 2.

4. Una composición para inducir un CTL, en donde la composición comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) el péptido de la reivindicación 1 o 2;

30 (b) el polinucleótido de la reivindicación 3;

(c) una célula presentadora de antígenos (APC) que presenta el péptido de la reivindicación 1 o 2 sobre su superficie; y

(d) un exosoma que presenta el péptido de la reivindicación 1 o 2 sobre su superficie.

35 5. Una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer, y/o la prevención de una reparación posoperatoria del mismo, en donde la composición comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) el péptido de la reivindicación 1 o 2;

(b) el polinucleótido de la reivindicación 3;

(c) una APC que presenta el péptido de la reivindicación 1 o 2 sobre su superficie;

40 (d) un exosoma que presenta el péptido de la reivindicación 1 o 2 sobre su superficie; y

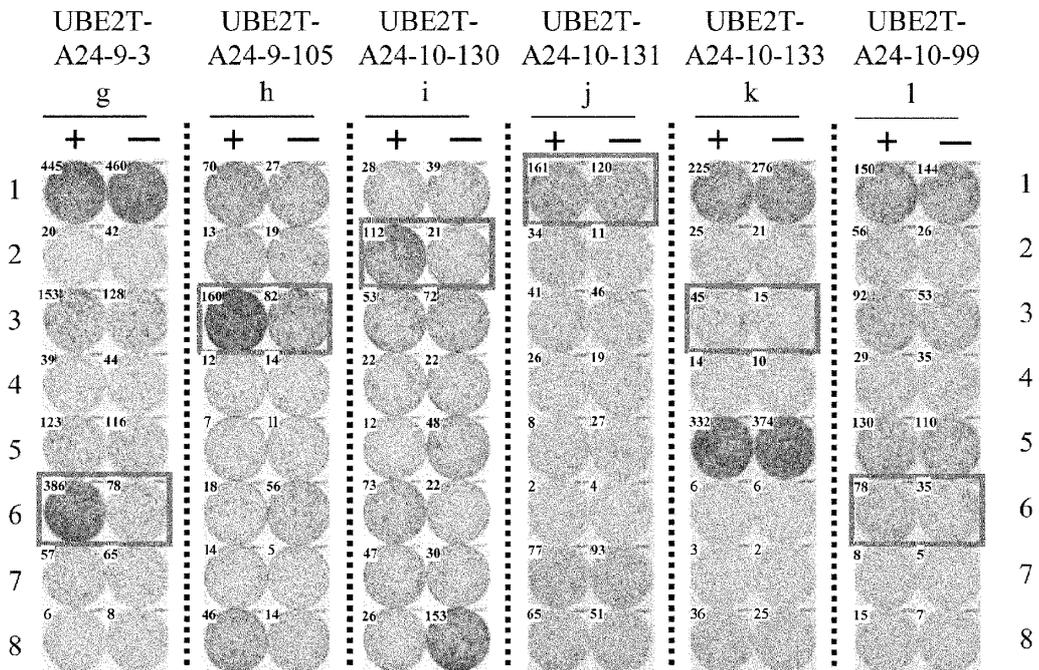
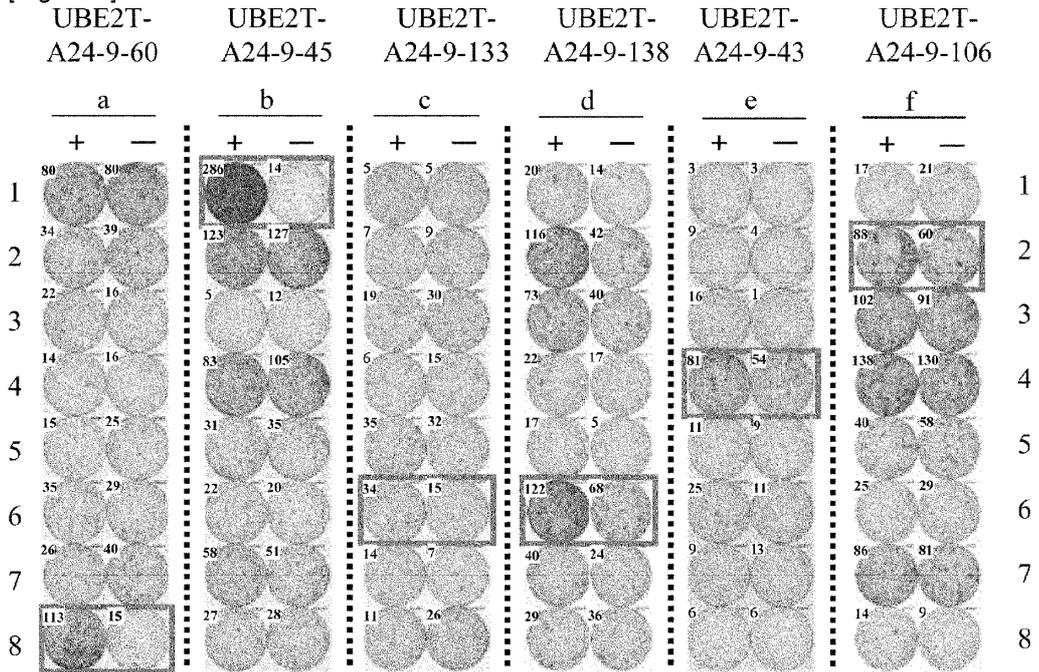
(e) un CTL que puede reconocer una célula que presenta el péptido de la reivindicación 1 o 2.

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde la composición farmacéutica se formula para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A2.

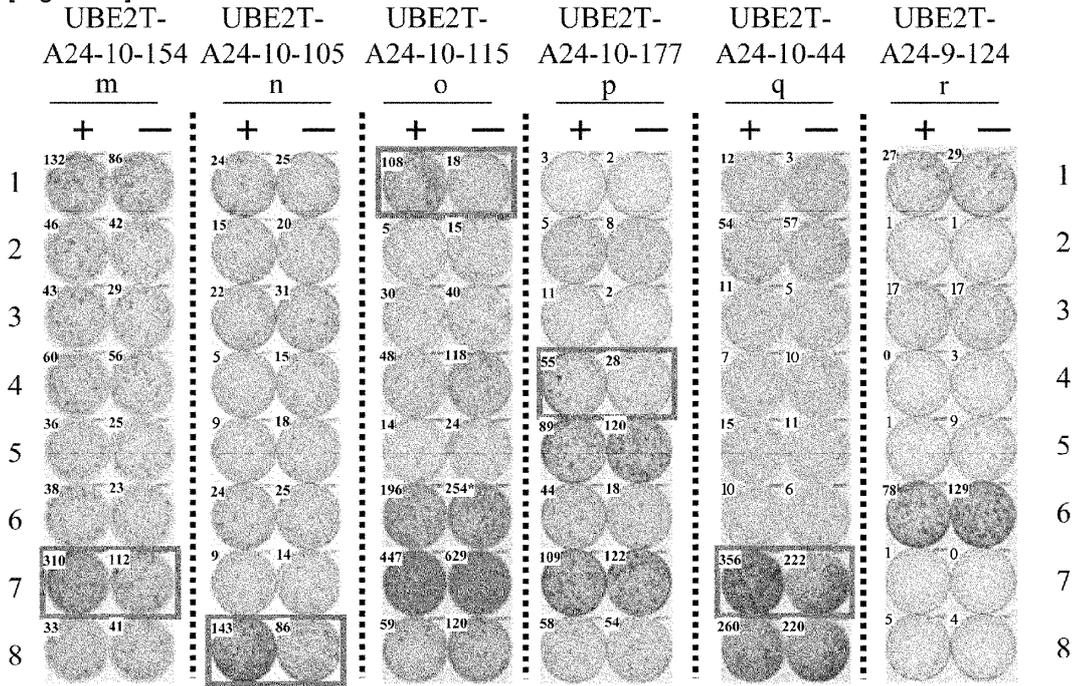
45 7. Un método *in vitro* de inducción de una APC capaz de inducir CTLs, en donde el método comprende la etapa seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) poner en contacto una APC con el péptido de la reivindicación 1 o 2, y
 - (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido de la reivindicación 1 o 2 en una APC.
8. Un método *in vitro* de inducción de un CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 (a) co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la reivindicación 1 o 2; y
- (b) co-cultivar un linfocito T CD8 positivo con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la reivindicación 1 o 2.
9. Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la
- 10 reivindicación 1 o 2.
10. Un CTL aislado que dirige el péptido de la reivindicación 1 o 2.
11. Una composición para su uso en inducir una respuesta inmunitaria contra el cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, en donde la composición comprende el péptido de la reivindicación 1 o 2, o un polinucleótido que codifica el péptido.
- 15 12. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la reivindicación 1 o 2.

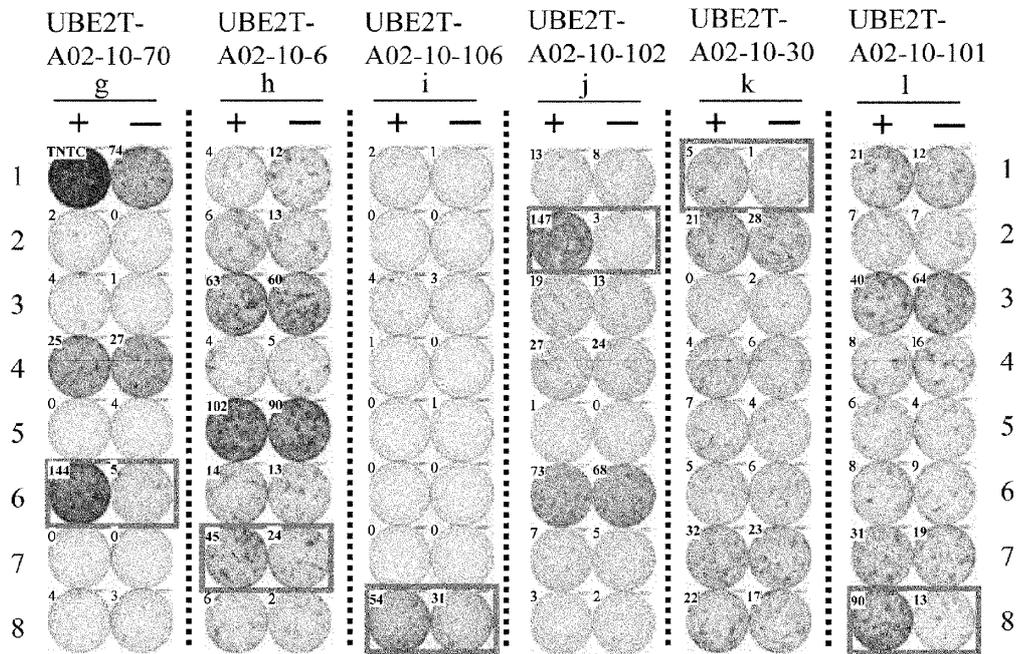
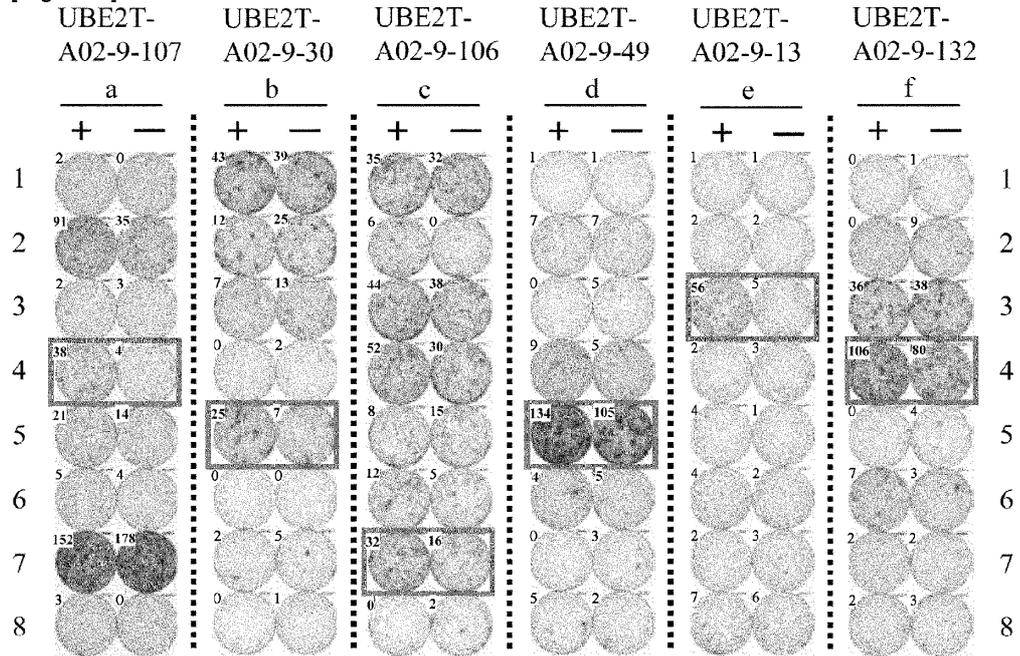
[Fig. 1a-l]



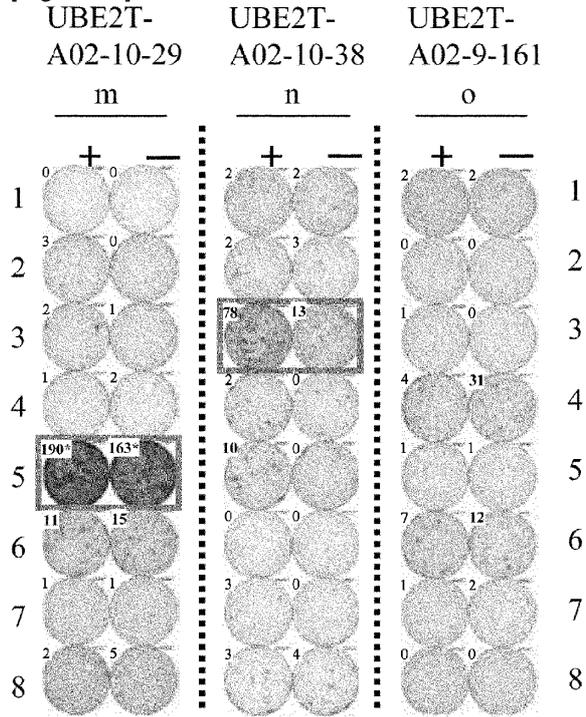
[Fig. 1m-r]



[Fig. 2a-]

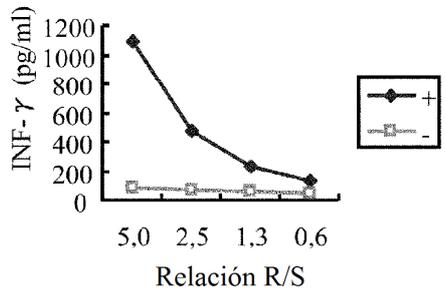


[Fig. 2m-o]

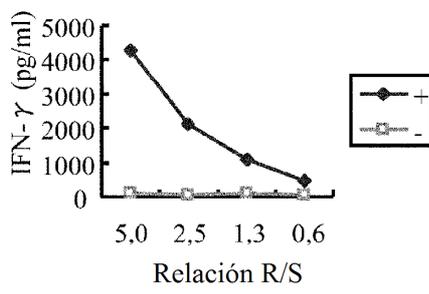


[Fig. 3]

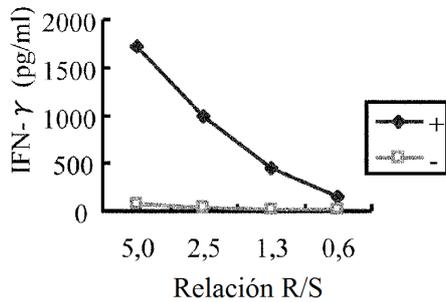
a UBE2T-A24-9-60 N° 8



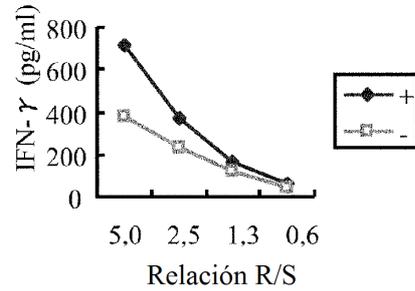
b UBE2T-A24-9-45 N° 1



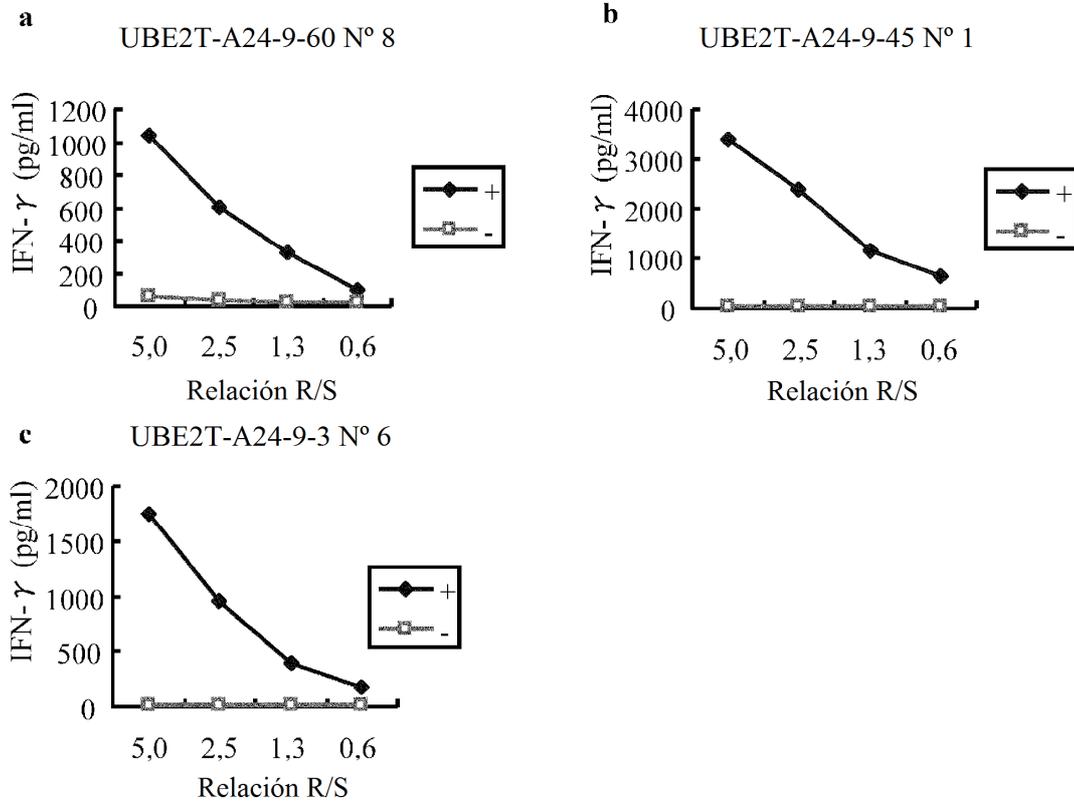
c UBE2T-A24-9-3 N° 6



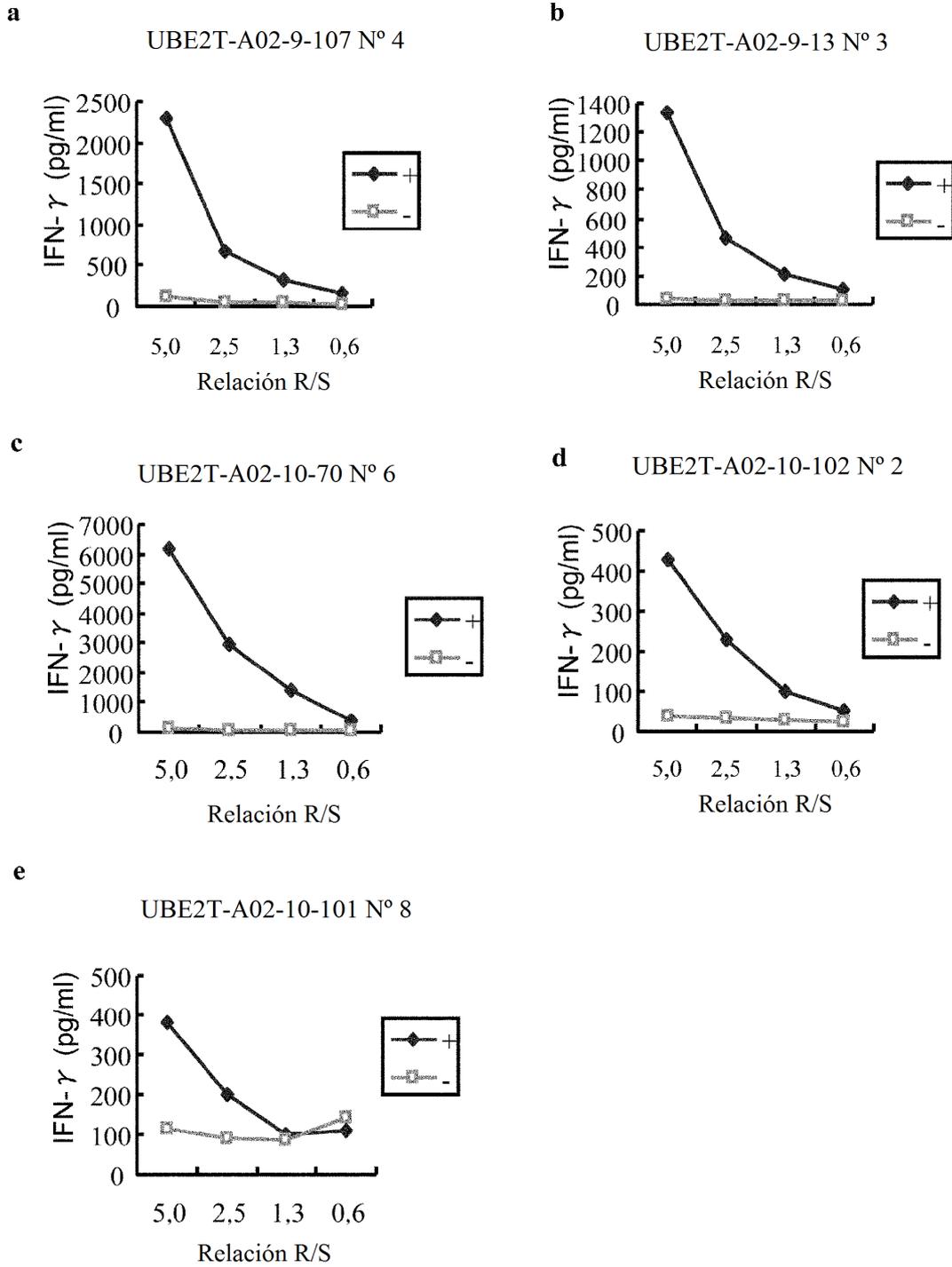
d UBE2T-A24-10-44 N° 7



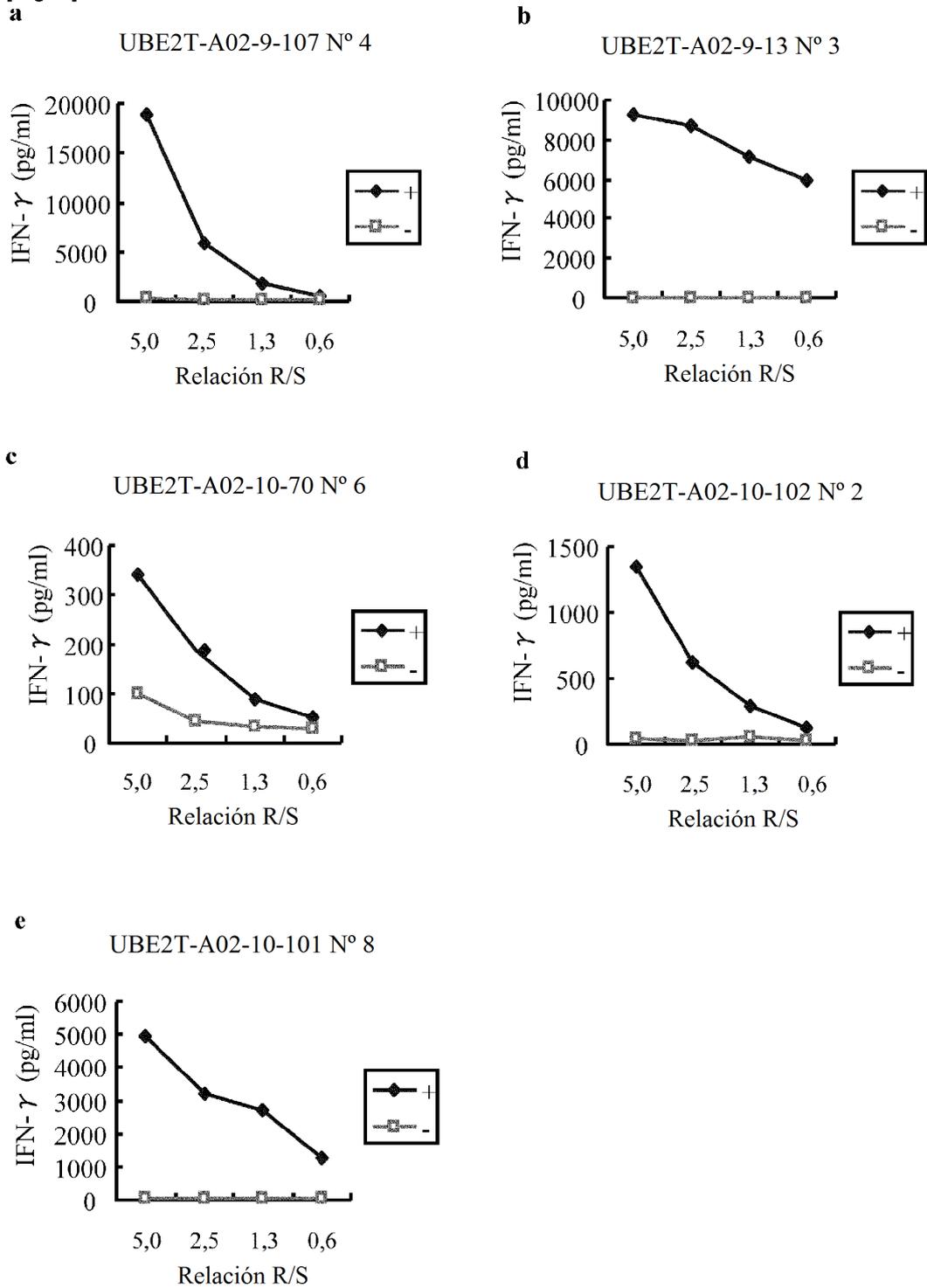
[Fig. 4]



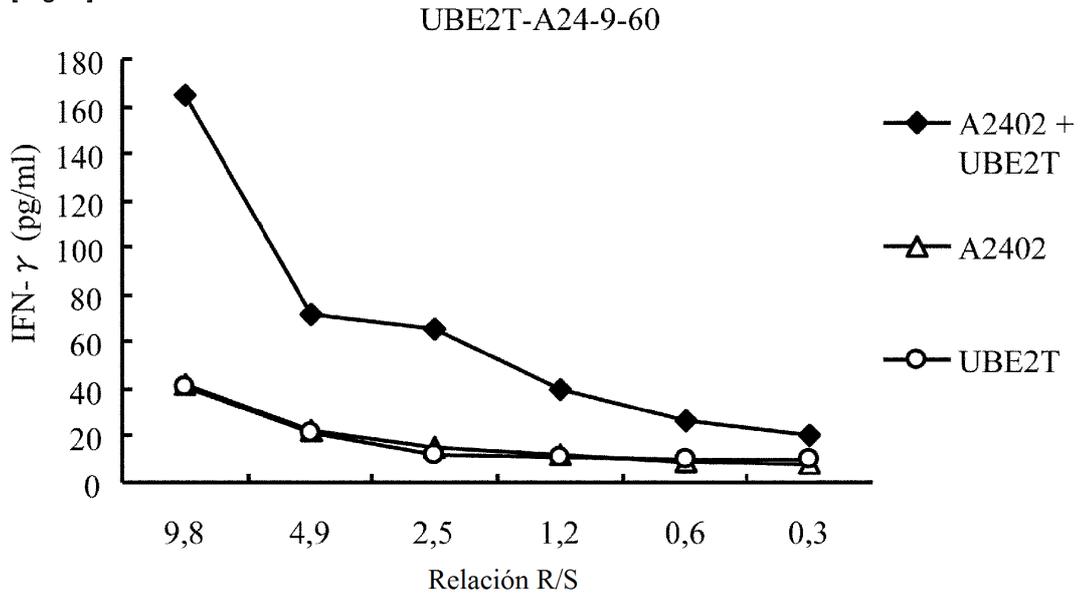
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

