

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 955**

51 Int. Cl.:

A61K 35/15	(2015.01) C12N 5/10	(2006.01)
A61K 35/17	(2015.01) C12N 15/09	(2006.01)
A61K 35/76	(2015.01)	
A61K 45/00	(2006.01)	
A61K 48/00	(2006.01)	
A61K 39/39	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
A61P 35/02	(2006.01)	
C07K 14/47	(2006.01)	
C12N 5/0783	(2010.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2016 PCT/JP2016/073077**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17026389**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2016 E 16835086 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024 EP 3335725**

54 Título: **Epítomos de PDS5A como inductores de la inmunidad**

30 Prioridad:

10.08.2015 JP 2015158539

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.09.2024

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku
Tokyo 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**KURIHARA AKIRA y
OKANO FUMIYOSHI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 977 955 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

Epítomos de PDS5A como inductores de la inmunidad

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo inductor de inmunidad útil como principio activo en un agente para tratar o prevenir el cáncer.

10 **Antecedentes de la técnica**

La proteína PDS5A (PDS5, regulador del mantenimiento de la cohesión, homólogo A), también conocida como SSC-112, es una proteína identificada como un regulador del ciclo celular implicado en la distribución de los cromosomas.

15 Se ha sugerido que la proteína PDS5A está asociada al desarrollo del cáncer. Por ejemplo, la referencia de patente 1 divulga que la expresión de PDS5A es mayor en el cáncer nasofaríngeo, el cáncer renal, el cáncer de hígado y un tipo de células de cáncer de mama, en comparación con el tejido normal. Además, la referencia de patente 1 también divulga que la proliferación de células cancerosas puede inhibirse suprimiendo la expresión de la proteína PDS5A en las células cancerosas utilizando un ácido nucleico antisentido, ribozima o ARNpi dirigido contra el gen de PDS5A, o
20 un anticuerpo contra la proteína PDS5A, y que puede inducir la apoptosis en células cancerosas mediante la administración de la proteína PDS5A de longitud completa o un péptido parcial de la proteína.

Por otro lado, la referencia de patente 2 divulga que la proteína PDS5A que se une a HLA-A0201, que es un subtipo de moléculas de MHC de clase I, y los péptidos parciales de la misma, tienen una actividad de inducción inmunitaria
25 contra las células cancerosas, y por lo tanto es útil para el tratamiento y/o la prevención del cáncer. Sin embargo, la referencia de patente 2 no divulga todos los péptidos que se unan a HLA-A0201, ni contiene información sobre los péptidos que se unen a subtipos distintos de HLA-A0201.

30 **Lista de citas****Referencias de patentes**

Referencia de patente 1: documento WO 2002/081641

Referencia de patente 2: WO 2011/027807

35 **Sumario de la invención****Problema técnico**

40 Un objeto de la presente invención es encontrar un nuevo polipéptido útil como principio activo en un agente para tratar o prevenir el cáncer, y proporcionar el uso del polipéptido como un inductor de inmunidad.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una célula presentadora de antígenos aislada que incluya un complejo del polipéptido y una molécula del HLA y un linfocito T aislado que se una selectivamente a un complejo del
45 polipéptido y una molécula del HLA, así como un agente para tratar o prevenir el cáncer que incluya la misma.

Solución al problema

Como resultado de investigaciones intensivas, los presentes inventores han descubierto que la proteína PDS5A humana que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 se expresa específicamente
50 en tejidos o células de leucemia, linfoma maligno, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, tumor cerebral maligno, cáncer de esófago y cáncer de pulmón. Además, los inventores han descubierto que un péptido parcial presente en una región específica de la proteína PDS5A tiene una capacidad (actividad de inducción inmunitaria) para activar y propagar
55 linfocitos T específicos para el polipéptido mediante la presentación por las células presentadoras de antígenos, y que la actividad de inducción inmunitaria es útil para el tratamiento o la prevención del cáncer. Basándose en estos hallazgos, los inventores han descubierto que el polipéptido puede utilizarse como principio activo en un inductor de inmunidad para tratar y/o prevenir el cáncer, y que las células presentadoras de antígenos que han estado en contacto con el péptido, y los linfocitos T que han estado en contacto con las células presentadoras de antígenos también son
60 útiles en el tratamiento o la prevención del cáncer, completando de este modo la presente invención.

La presente invención se define en las reivindicaciones.

Efectos de la invención

65 La presente invención proporciona un nuevo inductor de inmunidad útil como principio activo en un agente para tratar

o prevenir el cáncer.

Además, como se muestra específicamente en los ejemplos que se describirán más adelante, los polipéptidos utilizados en la presente invención pueden inducir células inmunitarias que eliminan las células cancerosas, permitiendo así la reducción del tamaño o la remisión de un cáncer ya existente. Además, los péptidos utilizados en la presente invención también pueden potenciar la inducción de las células inmunitarias que eliminan las células cancerosas y, por tanto, permitir la reducción del tamaño o la remisión de un cáncer ya existente. Por tanto, los polipéptidos de acuerdo con la presente invención son útiles como principio activo en un agente para tratar o prevenir el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 muestra los patrones de expresión del gen PDS5A, en tejidos tumorales humanos y líneas celulares de cáncer. El número de referencia 1 indica el patrón de expresión del gen PDS5A humano. El número de referencia 2 indica el patrón de expresión del gen GAPDH humano, que es un gen humano constitutivo.

[Figura 2] La figura 2 muestra que los linfocitos T CD8-positivos específicos para cada uno de los polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 19 reconocen el complejo que consiste en el polipéptido y HLA-A0201 y producen IFN- γ . En la figura 2, los carriles 13 a 29 del eje horizontal muestran la capacidad de producción de IFN- γ de los linfocitos T CD8-positivos HLA-A0201-positivos en respuesta a la estimulación por células dendríticas pulsadas con los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 19, respectivamente. El carril 1 muestra el resultado obtenido cuando el tratamiento anterior se realizó sin añadir ningún polipéptido (tratamiento simulado); el carril 2 muestra el resultado obtenido cuando el tratamiento anterior se llevó a cabo con la adición de un polipéptido de control negativo que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 74, que se encuentra fuera del alcance de la presente invención; el carril 3 muestra el resultado obtenido cuando el tratamiento anterior se llevó a cabo con la adición de la proteína PDS5A de longitud completa, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, y los carriles 4 a 12 muestran los resultados obtenidos cuando se llevó a cabo el tratamiento anterior con la adición de polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 75 a 83, respectivamente, que se encuentran fuera del alcance de la presente invención.

[Figura 3] La figura 3 muestra que los linfocitos T CD8-positivos específicos para cada uno de los polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 20 a 34 reconocen el complejo que consiste en el polipéptido y HLA-A24 y producen IFN- γ . En la figura 3, los carriles 4 a 18 del eje horizontal muestran la capacidad de producción de IFN- γ de los linfocitos T CD8-positivos HLA-A24-positivos en respuesta a la estimulación por células dendríticas pulsadas con los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 20 a 34, respectivamente. El carril 1 muestra el resultado obtenido cuando el tratamiento anterior se realizó sin añadir ningún polipéptido (tratamiento simulado); el carril 2 muestra el resultado obtenido cuando el tratamiento anterior se llevó a cabo con la adición de un péptido de control negativo que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84, que se encuentra fuera del alcance de la presente invención; y el carril 3 muestra el resultado obtenido cuando el tratamiento anterior se llevó a cabo con la adición de la proteína PDS5A de longitud completa, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

[Figura 4A] La figura 4A muestra la actividad citotóxica, contra las células cancerosas, de los linfocitos T CD8-positivos específicos para cada uno de los polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 19. En la figura 4A, los carriles 4 a 24 del eje horizontal muestran las actividades citotóxicas, contra células U251, de los linfocitos T CD8-positivos HLA-A0201-positivos inducidos usando los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 13 a 29, respectivamente. El carril 1 muestra la actividad citotóxica de linfocitos T CD8-positivos inducidos sin añadir ningún polipéptido (tratamiento simulado); el carril 2 muestra la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8-positivos inducidos utilizando el polipéptido de control negativo (SEQ ID NO: 74); el carril 3 muestra la actividad citotóxica de linfocitos T CD8-positivos inducidos utilizando la proteína SCD1 de longitud completa que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2; y los carriles 4 a 12 muestran las actividades citotóxicas de los linfocitos T CD8-positivos inducidos usando los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 75 a 83, respectivamente, que se encuentran fuera del alcance de la presente invención.

[Figura 4B] La figura 4B muestra la actividad citotóxica, contra las células cancerosas, de los linfocitos T CD8-positivos específicos para cada uno de los polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 19. En la figura 4B, los carriles 12 a 48 del eje horizontal muestran las actividades citotóxicas, contra las células Jurkat, de los linfocitos T CD8-positivos HLA-A0201-positivos inducidos usando los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 19, respectivamente. El carril 1 muestra la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8-positivos inducidos sin añadir ningún polipéptido (tratamiento simulado); el carril 2 muestra la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8-positivos inducidos utilizando el polipéptido de control negativo (SEQ ID NO: 74); el carril 3 muestra la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8-positivos inducidos utilizando la proteína PDS5A de longitud completa que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2; y los carriles 4 a 11 muestran las actividades citotóxicas de linfocitos T CD8-positivos inducidos utilizando los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 75 a 83, respectivamente, que se encuentran fuera del alcance

de la invención.

[Figura 5A] La figura 5A es una gráfica que muestra la actividad citotóxica, contra las células cancerosas, de los linfocitos T CD8-positivos específicos para cada uno de los polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 20 a 34. En la figura 5A, los carriles 4 a 18 del eje horizontal muestran las actividades citotóxicas, contra células THP1, de los linfocitos T CD8-positivos HLA-A24-positivos estimulados usando los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 20 a 34, respectivamente. El carril 1 muestra la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8-positivos inducidos sin añadir ningún polipéptido (tratamiento simulado); el carril 2 muestra la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8-positivos inducidos utilizando el polipéptido de control negativo (SEQ ID NO: 84); y el carril 3 muestra la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8 inducidos utilizando la proteína PDS5A que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

[Figura 5B] La figura 5B muestra la actividad citotóxica, contra las células cancerosas, de los linfocitos T CD8-positivos específicos para cada uno de los péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 20 a 34. En la figura 5B, los carriles 4 a 18 del eje horizontal muestran las actividades citotóxicas, contra células SW480, de los linfocitos T CD8-positivos HLA-A24-positivos estimulados usando los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 20 a 34, respectivamente. El carril 1 muestra la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8-positivos inducidos sin añadir ningún polipéptido (tratamiento simulado); el carril 2 muestra la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8-positivos inducidos utilizando el polipéptido de control negativo (SEQ ID NO: 84); y el carril 3 muestra la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8 inducidos utilizando la proteína PDS5A que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

[Figura 6] La figura 6 es una gráfica que muestra que los linfocitos T CD4-positivos específicos para cada uno de los polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 35 a 67 reconocen el complejo del polipéptido y HLA-DRB1*04 y producen IFN- γ . En la figura 6, los carriles 4 a 36 del eje horizontal muestran la capacidad de producción de IFN- γ de los linfocitos T CD4-positivos HLA-DRB1*04-positivos en respuesta a la estimulación por células dendríticas pulsadas con los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 35 a 67, respectivamente. El carril 1 muestra el resultado obtenido cuando el tratamiento anterior se realizó sin añadir ningún polipéptido (simulado); el carril 2 muestra el resultado obtenido cuando el tratamiento anterior se llevó a cabo con la adición de un polipéptido de control negativo que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 85, que se encuentra fuera del alcance de la presente invención; y el carril 3 muestra el resultado obtenido cuando el tratamiento anterior se llevó a cabo con la adición de la proteína PDS5A de longitud completa, que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

Descripción de las realizaciones

<Polipéptido>

En la presente invención, el término "polipéptido" se refiere a una molécula formada por la unión peptídica de una pluralidad de aminoácidos. Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención incluyen no solo moléculas polipeptídicas compuestas por un gran número de aminoácidos, sino también moléculas de bajo peso molecular (oligopéptidos) compuestas por un pequeño número de aminoácidos.

El polipéptido que constituye el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, al menos un polipéptido que tenga una actividad de inducción inmunitaria y que se seleccione entre el grupo de los polipéptidos (a) a (c) a continuación:

(a) polipéptidos compuestos por 7 o más aminoácidos consecutivos dentro de la región de las posiciones 24 a 97 (74 aminoácidos), las posiciones 134 a 197 (64 aminoácidos), las posiciones 265 a 332 (68 aminoácidos), las posiciones 378 a 463 (86 aminoácidos), las posiciones 472 a 498 (27 aminoácidos), las posiciones 533 a 567 (35 aminoácidos), las posiciones 613 a 643 (31 aminoácidos), las posiciones 671 a 735 (65 aminoácidos), las posiciones 737 a 780 (44 aminoácidos), las posiciones 792 a 830 (39 aminoácidos), las posiciones 832 a 899 (68 aminoácidos), las posiciones 920 a 943 (24 aminoácidos), las posiciones 946 a 993 (58 aminoácidos), o las posiciones 1074 a 1215 (142 aminoácidos) en la proteína PDS5A humana que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, cuando el iniciador metionina se define como la posición 1;

(b) polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 7, 22, 36, 42, 63 y 64;

(c) polipéptidos que comprenden una, dos o tres eliminaciones, sustituciones, y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los polipéptidos de (a) y (b), y que conservan la actividad inductora de la inmunidad de dichos polipéptidos.

En la presente invención, la expresión "que consiste en una secuencia de aminoácidos" significa que los restos de aminoácidos están dispuestos en un orden específico. Por tanto, por ejemplo, un "polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2" se refiere a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos Met Asp Phe Thr... (omitido)... Asp Leu Gln Arg representada por la SEQ ID NO: 2, y que tiene un tamaño de 1337 restos de aminoácidos. Además, en la presente memoria descriptiva, el "polipéptido que consiste en la

secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2" se abrevia a menudo como el "polipéptido de SEQ ID NO: 2", por ejemplo. Lo mismo ocurre con la expresión "que consiste en una secuencia de bases".

El término "actividad de inducción inmunitaria", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de activar y propagar linfocitos T que responden a las células cancerosas que expresan la proteína PDS5A. Específicamente, la actividad de inducción inmunitaria significa que: la capacidad de producción de IFN- γ de los linfocitos T citotóxicos y/o de los linfocitos T colaboradores estimulados por la proteína PDS5A o un polipéptido parcial de la misma es mayor que la de los linfocitos T de control no estimulados; la actividad citotóxica contra las células cancerosas que expresan la proteína PDS5A de los linfocitos T citotóxicos estimulados por la proteína PDS5A o un polipéptido parcial de la misma es mayor que la de los linfocitos T de control no estimulados; la actividad citotóxica de los linfocitos T colaboradores estimulados por la proteína PDS5A o un polipéptido parcial de la misma es mayor, en comparación con la de los linfocitos T de control no estimulados; o los linfocitos T citotóxicos o los linfocitos T colaboradores estimulados por la proteína PDS5A o un polipéptido parcial de la misma proliferan más que los linfocitos T de control no estimulados.

La proliferación de células puede confirmarse mediante: observación visual; recuento de células al microscopio; citometría de flujo; la cantidad de timidina marcada con tritio en el medio que se incorpora en las células; y similares. Además, se puede realizar la medición de la capacidad de producción de IFN- γ , por ejemplo, mediante el conocido ensayo ELISPOT y similares. Específicamente, como se describirá en los ejemplos más adelante, por ejemplo, en primer lugar, los linfocitos T se cocultivan con un polipéptido cuya actividad de inducción inmunitaria se vaya a evaluar (la proteína PDS5A o un polipéptido parcial de la misma en la presente invención) y células presentadoras de antígenos derivadas de células mononucleares de sangre periférica (en adelante, denominadas "PBMC"), para permitir que los linfocitos T entren en contacto con las células presentadoras de antígenos que presentan el polipéptido a evaluar. Posteriormente, se mide la cantidad de IFN- γ producida por los linfocitos T utilizando un anticuerpo específico contra el IFN- γ . Esto permite medir el número de células inmunitarias en los linfocitos T. A continuación, se puede evaluar la actividad de inducción inmunitaria basándose en los resultados de las mediciones obtenidas de este modo.

La actividad citotóxica puede evaluarse, por ejemplo, mediante el cocultivo de linfocitos T con un polipéptido cuya actividad citotóxica se quiere evaluar (la proteína PDS5A o un polipéptido parcial de la misma en la presente invención) y células presentadoras de antígenos derivadas de PBMC, y analizando después si los linfocitos T muestran o no una capacidad de suprimir la proliferación de células tumorales o de eliminar células tumorales (en adelante, denominada "actividad citotóxica") *in vitro*). La puesta en contacto entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos puede lograrse mediante el cocultivo de ambas células en un medio líquido, como se describirá más adelante. La medición de la actividad citotóxica puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un método conocido denominado ensayo de liberación de ^{51}Cr , descrito en *Int. J. Cancer*, 58: P 317, 1994.

Mediante la administración de los linfocitos T inducidos como se ha descrito anteriormente a un cuerpo vivo portador de un cáncer, puede reducirse el tamaño del tumor o puede causarse la remisión del tumor gracias a la actividad citotóxica de los linfocitos T. Por tanto, la actividad de inducción inmunitaria descrita anteriormente también puede evaluarse como capacidad para suprimir la proliferación de células cancerosas, o como capacidad de provocar la reducción del tamaño o la desaparición de un tejido canceroso (tumor) (en lo sucesivo, denominada "actividad antitumoral").

En los casos donde se usa el polipéptido anteriormente descrito para el tratamiento o la prevención del cáncer, la evaluación de la actividad inductora de inmunidad se lleva a cabo preferentemente usando como índice la actividad citotóxica o la actividad antitumoral, aunque el índice no se limita particularmente a estas.

Dado que un polipéptido de aproximadamente 7 o más restos de aminoácidos puede incluir un epítipo y dicho polipéptido puede presentar antigenicidad e inmunogenicidad, y puede tener una actividad de inducción inmunitaria, como es bien conocido en la técnica, y por lo tanto puede utilizarse como el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención.

Por consiguiente, el polipéptido (a) es un polipéptido formado por 7 o más aminoácidos consecutivos, preferentemente 8, 9 o 10 o más aminoácidos consecutivos, dentro de la región de las posiciones 24 a 97, las posiciones 134 a 197, las posiciones 265 a 332, las posiciones 378 a 463, las posiciones 472 a 498, las posiciones 533 a 567, las posiciones 613 a 643, las posiciones 671 a 735, las posiciones 737 a 780, las posiciones 792 a 830, las posiciones 832 a 899, las posiciones 920 a 943, las posiciones 946 a 993 o las posiciones 1074 a 1215 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2; y que tiene una actividad inductora de inmunidad. En particular, el polipéptido tiene preferentemente la secuencia de aminoácidos de las posiciones 24 a 97, las posiciones 134 a 197, las posiciones 265 a 332, las posiciones 378 a 463, las posiciones 472 a 498, las posiciones 533 a 567, las posiciones 613 a 643, las posiciones 671 a 735, las posiciones 737 a 780, las posiciones 792 a 830, las posiciones 920 a 943, las posiciones 946 a 993 o las posiciones 1074 a 1215 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

Como principio de inducción inmunitaria mediante la administración de un polipéptido de antígeno de cáncer, el polipéptido se incorpora a una célula presentadora de antígenos y luego se degrada en fragmentos más pequeños por las peptidasas de la célula, y posteriormente, los fragmentos del péptido antigénico se presentan en la superficie de

la célula presentadora de antígenos. Se sabe que los linfocitos T citotóxicos y similares reconocen los antígenos que se presentan en la superficie celular y matan selectivamente las células cancerosas que presentan los antígenos en la superficie celular. Además, también se sabe que los linfocitos T colaboradores reconocen los antígenos presentados en la superficie de las células presentadoras de antígenos y potencian la inducción de linfocitos T citotóxicos que eliminan selectivamente las células cancerosas que presentan los antígenos en la superficie celular. El tamaño del polipéptido antigénico presentado sobre la superficie de la célula presentadora del antígeno es relativamente pequeño y de aproximadamente 7 a 30 aminoácidos. Por tanto, en términos de permitir la presentación del polipéptido en las células presentadoras de antígenos, el polipéptido (a) tiene preferentemente de aproximadamente 7 a 30 aminoácidos consecutivos, en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 24 a 97, las posiciones 134 a 197, las posiciones 265 a 332, las posiciones 378 a 463, las posiciones 472 a 498, las posiciones 533 a 567, las posiciones 613 a 643, las posiciones 737 a 780, las posiciones 792 a 830, las posiciones 832 a 899, las posiciones 920 a 943, las posiciones 946 a 993 o las posiciones 1074 a 1215 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2. Es suficiente un polipéptido que conste de aproximadamente 8 a 30, aproximadamente 9 a 30 o aproximadamente 9 a 25 aminoácidos. Estos polipéptidos relativamente pequeños pueden presentarse directamente sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos sin que se incorporen a las células.

Además, ya que el polipéptido incorporado a una célula presentadora de antígenos se escinde en sitios aleatorios mediante las peptidasas de la célula para dar lugar a varios fragmentos de polipéptido, y los fragmentos de polipéptido resultantes se presentan en la superficie de la célula presentadora de antígenos, la administración de un polipéptido grande, tal como uno que tiene la secuencia de aminoácidos de las posiciones 24 a 97, las posiciones 134 a 197, las posiciones 265 a 332, las posiciones 378 a 463, las posiciones 472 a 498, las posiciones 533 a 567, las posiciones 613 a 643, las posiciones 671 a 735, las posiciones 737 a 780, las posiciones 792 a 830, las posiciones 832 a 899, las posiciones 920 a 943, las posiciones 946 a 993 o las posiciones 1074 a 1215 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, causa inevitablemente la producción de fragmentos polipeptídicos activos para la inducción inmunitaria a través de las células presentadoras de antígenos, debido a la degradación del polipéptido en las células presentadoras de antígenos. Por tanto, un gran polipéptido también puede utilizarse para inducir la inmunidad a través de las células presentadoras de antígenos. Por ejemplo, puede usarse un polipéptido que conste de 30 o más aminoácidos, preferentemente, 40 o más, más preferentemente 50 o más y aún más preferentemente 100 o más aminoácidos.

Además, los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden comprobarse con un medio de comprobación, tal como HLA Peptide Binding Predictions (http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/index.html) en Bioinformatics & Molecular Analysis Selection (BIMAS) o SYFPEITHI, que puede buscar péptidos epitópicos que constan de 8 a 25, preferentemente de 9 a 24 y más preferentemente de 9 a 23 aminoácidos y que tienen motivos de unión para moléculas de clase I o de clase II del MHC (HLA, en humanos) que se describirán más adelante, para llevar a cabo la detección sistemática de péptidos que pueden ser péptidos epitópicos. Específicamente, el polipéptido descrito anteriormente es un polipéptido que consta de 7 o más aminoácidos consecutivos dentro de la región de las posiciones 24 a 97, las posiciones 134 a 197, las posiciones 265 a 332, las posiciones 378 a 463, las posiciones 472 a 498, las posiciones 533 a 567, las posiciones 613 a 643, las posiciones 671 a 735, las posiciones 737 a 780, las posiciones 792 a 830, las posiciones 832 a 899, las posiciones 920 a 943, las posiciones 946 a 993 o las posiciones 1074 a 1215 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2. Los ejemplos del polipéptido incluyen: polipéptidos representados por las SEQ ID NO: 3 a 6, 8 a 21, 23 a 34, 35, 37 a 41, 43 a 62 y 65 a 67; y polipéptidos que comprenden cada uno como secuencia parcial uno cualquiera de estos polipéptidos y que tienen de 10 a 30 restos de aminoácidos. Entre los polipéptidos representados por las SEQ ID NO: 3 a 67, y los polipéptidos que comprenden cada uno como una secuencia parcial cualquiera de los polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 67 y que tienen de 10 a 30 restos de aminoácidos, la actividad de inducción inmunitaria de los polipéptidos representados por las SEQ ID NO: 3 a 34 se debe a la unión a moléculas del MHC de clase I, y a la actividad de inducción inmunitaria de los polipéptidos representados por las SEQ ID NO: 35 a 67 se debe a la unión a las moléculas del MHC de clase II.

Por otro lado, el polipéptido (c) es un polipéptido que comprende una, dos o tres sustituciones, eliminaciones, y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del polipéptido (a) o (b), y que tiene una actividad de inducción inmunitaria. Por ejemplo, el polipéptido (c) incluye un polipéptido que comprende una, dos o tres sustituciones, eliminaciones, y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por una cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 67.

El término "varios", como se usa en la presente divulgación, se refiere a un número entero de 2 a 10, preferentemente un número entero de 2 a 6, más preferentemente un número entero de 2 a 4 y aún más preferentemente, un número entero de 2 o 3.

En general, se cree que la modificación de uno o varios aminoácidos de un polipéptido no afecta a las funciones del polipéptido original; en algunos casos, se cree que una modificación de este tipo puede incluso mejorar una función deseada del polipéptido original. De hecho, se sabe que un péptido modificado que comprende de una a varias modificaciones (a saber, sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones) en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos original conserva la actividad biológica del péptido original (Mark *et al.*, 1984, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 5662-5666, Zoller y Smith, 1982, *Nucleic Acids Res.* 10: 6487-6500, Dalbadie-McFarland *et al.*,

1982, *Proc Natl Acad Sci USA*. 79: 6409-6413). Por consiguiente, el polipéptido (b) también puede exhibir una actividad de inducción inmunitaria, y por lo tanto puede utilizarse para la preparación del inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención.

- 5 Los 20 tipos de aminoácidos que constituyen las proteínas naturales pueden clasificarse en grupos de aminoácidos con propiedades similares, tales como, por ejemplo: aminoácidos neutros con cadenas laterales de baja polaridad (Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met y Pro); aminoácidos neutros que tienen cadenas laterales hidrófilas (Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr y Cys); aminoácidos ácidos (Asp y Glu), aminoácidos básicos (Arg, Lys e His); y aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr y Trp). Se sabe, en muchos casos, que las sustituciones de aminoácidos dentro del mismo grupo no alteran las propiedades del polipéptido. Por tanto, en los casos en que uno o varios restos de aminoácidos del polipéptido (a) de la presente invención estén sustituidos, las una o más sustituciones se realizan preferentemente dentro del mismo grupo, debido a que aumenta la probabilidad de retener la actividad inmunitaria.

- 15 Como se usa en el presente documento, la expresión "identidad de secuencia" entre las secuencias de aminoácidos (o las secuencias de bases) se refiere a un valor porcentual obtenido mediante: alineamiento de dos secuencias de aminoácidos (o secuencias de bases) que se van a comparar, de tal forma que se maximiza el número de restos de aminoácidos (o bases) coincidentes entre las secuencias de aminoácidos (o las secuencias de bases); y dividiendo el número de restos de aminoácidos coincidentes (o el número de bases coincidentes) entre el número total de restos de aminoácidos (o el número total de bases). Al alinear las secuencias, se insertan uno o más huecos en una o ambas de las secuencias que se van a comparar, en caso de que sea necesario. Esta alineación de secuencias puede llevarse a cabo mediante un programa conocido, tal como BLAST, FASTA o CLUSTAL W. En los casos en los que se insertan uno o más huecos, el número total de restos de aminoácidos anteriormente descrito es el número de restos obtenido al contar un hueco como un resto de aminoácido. Cuando el número total de restos de aminoácidos contado de este modo es diferente entre las dos secuencias a comparar, la identidad de secuencia (%) se calcula dividiendo el número de restos de aminoácidos coincidentes entre el número total de restos de aminoácidos de la secuencia más larga.

- 30 Cuando se usa en relación con el tratamiento o la prevención del cáncer, el polipéptido de acuerdo con la presente invención debe expresarse sobre la superficie de una célula o de un exosoma, preferentemente en forma de un complejo del péptido y cualquiera de las diversas clases del HLA. Por consiguiente, se prefiere seleccionar un péptido que no solo tenga una actividad inductora de inmunidad, sino también una elevada afinidad de unión por diversas clases de HLA. Para este fin, el péptido puede modificarse mediante sustitución, inserción, eliminación y/o adición de sus restos de aminoácidos para obtener un péptido modificado que tenga una afinidad de unión mejorada. Dado que se conoce la regularidad de las secuencias de los péptidos que se presentan mediante la unión a varias clases de HLA, además de la regularidad de los péptidos presentados naturalmente (*J Immunol*, 1994, 152: 3913; *Immunogenetics*, 1995, 41: 178; *J Immunol*, 1994, 155: 4307), es posible introducir una modificación basada en dicha regularidad en el péptido inmunogénico de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, la sustitución del segundo aminoácido desde el extremo N por leucina o metionina y/o la sustitución del aminoácido en el extremo C por valina o leucina puede ser deseable con el fin de mejorar la afinidad de unión a HLA-A24. Por consiguiente, un péptido que tenga la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 20 a 34, en el que el segundo aminoácido desde el extremo N está sustituido por leucina o metionina y/o el aminoácido en el extremo C está sustituido por valina o leucina, también se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

- 45 Las sustituciones pueden introducirse no solo en los aminoácidos terminales, sino también en los posibles sitios de reconocimiento del TCR de los péptidos. Varios estudios han demostrado que un péptido sustituido con un aminoácido tiene las mismas o mejores propiedades que el péptido original, y entre los ejemplos de péptidos sustituidos por aminoácidos se encuentra CAP1, p53 (264-272), Her-2/neu (369-377) y gp100 (209-217) (Zaremba *et al.* 1997, *Cancer Res.* 57: 4570-4577, T. K. Hoffmann *et al.* 2002, *J Immunol.* 168 (3): 1338-47, S. O. Dionne *et al.* 2003, *Cancer Immunol immunother.* 52: 199-206 y S. O. Dionne *et al.* 2004, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 53: 307-314).

- 50 Además de las modificaciones anteriormente descritas, también es posible unir el polipéptido de acuerdo con la presente invención con otras sustancias, siempre que el polipéptido unido resultante conserve la actividad inductora de inmunidad necesaria del péptido original. Entre los ejemplos de la otra sustancia se incluyen, pero sin limitación, péptidos, lípidos, azúcares y cadenas de azúcar, grupos acetilo y polímeros naturales y sintéticos. El péptido también puede incluir una modificación, tal como glucosilación, oxidación de las cadenas laterales o fosforilación, siempre que la actividad biológica del péptido original no se vea afectada por la modificación. Estos tipos de modificaciones pueden llevarse a cabo para conferir funciones adicionales (tal como la función de orientación y la función de administración) al polipéptido, o para estabilizar el polipéptido. Por ejemplo, se conoce en la técnica la introducción de un D-aminoácido, un mimético de aminoácido o un aminoácido no natural en un polipéptido con el fin de potenciar la estabilidad *in vivo* del mismo; y este concepto puede utilizarse en los polipéptidos de acuerdo con la presente invención. La estabilidad de un polipéptido puede evaluarse mediante varios métodos. Por ejemplo, la estabilidad puede evaluarse utilizando peptidasas, así como diversos tipos de medios biológicos, tal como plasma y suero humanos (véase, por ejemplo, Verhoef *et al.*, 1986, *Eur J Drug Metab Pharmacokin*, 11: 291-302).

- 65 Además, el polipéptido de acuerdo con la presente invención puede unirse a otros uno o más péptidos mediante uno o más espaciadores o enlazadores. Entre los ejemplos del otro péptido se incluyen, pero sin limitación, péptidos epitópicos procedentes de otros polipéptidos. Como alternativa, pueden unirse dos o más polipéptidos de acuerdo con

la presente invención mediante uno o más espaciadores o enlazadores. Los péptidos que se van a unir mediante uno o más espaciadores o enlazadores pueden ser iguales o diferentes entre sí. Los tipos del espaciador y del enlazador no están particularmente limitados, y los ejemplos de los mismos incluyen aquellos compuestos por péptidos, más preferentemente, aquellos compuestos por péptidos que tienen uno o más sitios de escisión que pueden escindirse por enzimas tales como las peptidasas, proteasas y proteasomas. El enlazador o espaciador puede ser, por ejemplo, AAY (P. M. Daftarian *et al.*, *J Trans Med*, 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Suttmüller *et al.*, *J Immunol.* 2000, 165: 7308-7315), o de uno a varios restos de lisina (S. Ota *et al.*, 2002, *Can Res.* 62: 1471-1476, K. S. Kawamura *et al.*, 2002, *J Immunol.* 168: 5709-5715), pero no se limita a estos. La presente invención contempla un polipéptido unido a otros uno o más péptidos a través de uno o más espaciadores o enlazadores.

En los casos en que los polipéptidos de acuerdo con la presente invención contienen restos de cisteína, estos polipéptidos tienden a formar dímeros mediante enlaces disulfuro entre los grupos SH de los restos de cisteína. Por tanto, los dímeros de estos polipéptidos también están incluidos en los polipéptidos de acuerdo con la presente invención.

Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los polipéptidos pueden sintetizarse mediante un método de síntesis química, tal como el método de Fmoc (método de fluorenilmetiloxycarbonilo) o el método de tBoc (método de t-butoxicarbonilo). Además, pueden sintetizarse mediante métodos convencionales usando diversos tipos de sintetizadores de péptidos disponibles comercialmente.

Además, el polipéptido de interés puede obtenerse usando técnicas de ingeniería genética conocidas: preparando un polinucleótido que codifica el polipéptido anterior; incorporando el polinucleótido en un vector de expresión; introduciendo el vector en una célula hospedadora; y después dejando que el polipéptido de interés se produzca en la célula hospedadora. Cuando se obtiene el polipéptido de interés de las células hospedadoras, el polipéptido puede purificarse o aislarse de forma que el polipéptido no incluya sustancialmente otras proteínas naturales de la célula hospedadora y fragmentos de las mismas u otras sustancias químicas arbitrarias.

El polinucleótido que codifica el polipéptido anterior puede prepararse fácilmente mediante una técnica de ingeniería genética conocida o un método convencional que use un sintetizador de ácidos nucleicos disponible comercialmente. Por ejemplo, el ADN que tiene la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 1 puede prepararse llevando a cabo una PCR usando un ADN cromosómico humano o una biblioteca de ADNc como molde y un par de cebadores diseñados para amplificar la secuencia de bases representada por la SEQ ID NO: 1. Las condiciones de reacción para la PCR pueden establecerse según convenga, y los ejemplos de las mismas incluyen, pero sin limitación, la repetición de un ciclo que consiste en reacciones a: 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante de 30 segundos a 1 minuto (hibridación) y 72 °C durante 2 minutos (extensión), durante 30 ciclos, seguido de una reacción a 72 °C durante 1 minuto. Además, el ADN deseado puede aislarse preparando una o más sondas o cebadores adecuados basándose en la información de la secuencia de bases representada por la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos y explorando una biblioteca de ADNc de ser humano o similares usando las una o más sondas o cebadores. La biblioteca de ADNc se prepara preferentemente a partir de una célula, órgano o tejido que expresa la proteína de la SEQ ID NO: 2. Las operaciones anteriormente descritas, tales como la preparación de una o más sondas o cebadores, la construcción de una biblioteca de ADNc, la exploración de una biblioteca de ADNc y la clonación de un gen de interés son conocidas por los expertos en la materia y pueden llevarse a cabo según los métodos descritos, por ejemplo, en Green, M. R. y Sambrook, J., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, cuarta Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; *Current Protocols in Molecular Biology*: www.currentprotocols.com; y similares. A partir del ADN obtenido de este modo, puede obtenerse el ADN que codifica el polipéptido (a) o (b). Además, dado que se conocen los codones que codifican cada aminoácido, puede especificarse fácilmente la secuencia de bases de un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos específica. Por consiguiente, la secuencia de bases de un polinucleótido que codifica el polipéptido (b) anteriormente descrito también puede especificarse fácilmente y por tanto, dicho polinucleótido también puede sintetizarse usando un sintetizador de ácidos nucleicos comercial de acuerdo con un método convencional.

La célula hospedadora puede ser cualquier célula, en tanto que pueda expresar el polipéptido anteriormente descrito. Entre los ejemplos de células procariotas se incluyen, pero sin limitación, *E. coli*; y entre los ejemplos de células eucariotas se incluyen, pero sin limitación, células de mamífero cultivadas, incluidas las células de riñón de mono COS-1 y las células de ovario de hámster chino CHO; levaduras de gemación; levaduras de fisión; células de gusano de seda; y células de huevo de *Xenopus laevis*.

En los casos donde se usa una célula procariota como célula hospedadora, se usa un vector de expresión que contiene un origen que permite su replicación en una célula procariota, un promotor, un sitio de unión a ribosomas, un sitio de clonación de ADN, un terminador, etc. Entre los ejemplos del vector de expresión de *E. coli* se incluyen el sistema pUC, pBluescript II, el sistema de expresión pET y el sistema de expresión pGEX. El polipéptido codificado por el ADN puede expresarse en la célula hospedadora procariota mediante la incorporación de un ADN que codifica el polipéptido anterior en dicho vector de expresión, transformando una célula hospedadora procariota con dicho vector y después cultivando el transformante resultante. En este proceso, también puede expresarse el polipéptido en forma de una proteína de fusión con otra proteína.

En los casos donde se usa una célula eucariota como célula hospedadora, se usa un vector de expresión para células eucariotas que contiene un promotor, un sitio de corte y empalme, un sitio de adición de poli(A), etc. Entre los ejemplos de dicho vector de expresión se incluyen pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, vector de VEB, pRS, pcDNA3, pMSG y pYES2. Del mismo modo descrito anteriormente, el polipéptido codificado por el ADN puede expresarse en la célula eucariota mediante la incorporación de un ADN que codifica el polipéptido anterior en dicho vector de expresión, transformando una célula hospedadora eucariota con dicho vector y después cultivando el transformante resultante. En los casos en los que se use pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1, pEGFP-C1 o similares como vector de expresión, el polipéptido anterior puede expresarse como una proteína de fusión a la que se le añade cualquiera de los diversos tipos de marcadores, tales como el marcador His, el marcador FLAG, el marcador myc, el marcador HA y GFP.

La introducción del vector de expresión en la célula hospedadora puede llevarse a cabo mediante un método conocido, tal como electroporación, el método de fosfato de calcio, el método de los liposomas o el método de DEAE dextrano.

El polipéptido de interés puede aislarse y purificarse de las células hospedadoras mediante una combinación de operaciones de separación conocidas. Entre los ejemplos de las operaciones de separación conocidas se incluyen, pero sin limitación: tratamiento con un desnaturalizante, tal como urea o con un tensioactivo; tratamiento de ultrasonidos; digestión enzimática; extracción por saturación de sal o precipitación fraccionada del disolvente; diálisis; centrifugación; ultrafiltración; filtración en gel; SDS-PAGE; isoelectroenfoque; cromatografía de intercambio iónico; cromatografía hidrófoba; cromatografía de afinidad; y cromatografía en fase inversa.

Los polipéptidos obtenidos mediante el método anterior también incluyen, como se ha mencionado anteriormente, aquellos en forma de una proteína de fusión con otra proteína arbitraria. Los ejemplos de las mismas incluyen proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST) y proteínas de fusión con un marcador His. Por consiguiente, dicho polipéptido en forma de una proteína de fusión también se incluye dentro del ámbito de la presente invención. Además, un polipéptido expresado en la célula transformada puede modificarse postraduccionalmente de varias maneras. Dicho polipéptido modificado postraduccionalmente también se incluye dentro del ámbito de la presente invención, en tanto que tenga una actividad inductora de inmunidad. Entre los ejemplos de dicha modificación postraducciona se incluyen: eliminación de la metionina N-terminal; acetilación N-terminal; glucosilación; degradación limitada por una proteasa intracelular; miristoilación; isoprenilación y fosforilación.

<Inductor de inmunidad>

Se puede provocar la remisión de un tumor ya existente mediante la administración del polipéptido que tiene una actividad inductora de inmunidad de acuerdo con la presente invención o un vector de expresión que contiene el gen que codifica el polipéptido, a un cuerpo vivo que tiene cáncer. Además, puede prevenirse la aparición de un tumor mediante la administración del polipéptido descrito anteriormente que tiene una actividad de inducción inmunitaria o del gen que codifica el polipéptido a un cuerpo vivo antes de la aparición del cáncer. Por consiguiente, el polipéptido de acuerdo con la presente invención o el gen que codifica el polipéptido puede utilizarse como principio activo en el inductor de inmunidad.

Los términos "tumor" y "cáncer" se usa en cada caso en el presente documento para hacer referencia a una neoplasia maligna y se usan indistintamente. En este caso, el cáncer que se va a tratar es preferentemente un cáncer que expresa la proteína PDS5A y es, más preferentemente, leucemia, linfoma maligno, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, tumor cerebral maligno, cáncer de pulmón o cáncer de esófago.

El sujeto animal es preferentemente un mamífero, más preferentemente un mamífero, tal como un primate, un animal de compañía, un animal doméstico o un animal de deporte, aún más preferentemente un ser humano, un perro o un gato y de manera particularmente preferida, un ser humano.

El individuo afectado por el cáncer (un paciente con cáncer, en los casos en que el individuo es un ser humano) que se va a tratar es preferentemente un individuo afectado por el cáncer cuyas células cancerosas expresan la proteína PDS5A *in vivo*. Específicamente, se prefiere un individuo afectado por cáncer que se ha seleccionado mediante el método de detección de cáncer descrito en el documento WO 2011/027807. En particular, el individuo afectado por el cáncer es preferentemente uno seleccionado por el hecho de que los niveles de expresión de los anticuerpos contra la proteína PDS5A contenidos en la muestra obtenida del cuerpo vivo del sujeto son más altos en comparación con los niveles de expresión de los anticuerpos contenidos en la muestra obtenida de un individuo sano. Entre los ejemplos de la muestra que se utilizará para la selección de las personas afectadas por el cáncer que se va a tratar se encuentran los fluidos corporales, tales como sangre, suero, plasma, ascitis y efusión pleural; tejidos; y células. En los casos en los que la selección se lleve a cabo midiendo los niveles de expresión de anticuerpos contra la proteína PDS5A, la muestra es preferentemente suero, plasma, ascitis o efusión pleural.

La administración del inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención puede realizarse por vía oral o parenteral. Sin embargo, las vías de administración preferidas son las parenterales, tales como administración intramuscular, administración subcutánea, administración intravenosa y administración intraarterial. En los casos

donde el inductor de inmunidad se usa para el tratamiento del cáncer, puede administrarse en un nódulo linfático regional próximo al tumor que se vaya a tratar, para potenciar su actividad antineoplásica. El inductor de inmunidad puede administrarse en cualquier cantidad de dosis eficaz para inducir la inmunidad. Por ejemplo, en los casos donde el inductor de inmunidad se usa para el tratamiento o la prevención del cáncer, el agente puede administrarse en una cantidad eficaz para el tratamiento o la prevención del cáncer. La cantidad eficaz para el tratamiento o la prevención del cáncer puede seleccionarse según convenga dependiendo del tamaño del tumor, los síntomas, el peso corporal y el volumen del animal en cuestión y similares. En los casos donde el animal en cuestión es un ser humano, la cantidad eficaz es normalmente de 0,0001 a 1.000 µg y preferentemente, de 0,001 a 1.000 µg al día. La cantidad de dosificación anteriormente descrita puede administrarse en una sola dosis o en varias dosis divididas. Se prefiere que la cantidad de dosis anterior se divida y administre varias veces al día, y que la administración de la misma se lleve a cabo cada varios días o varios meses. Como se describirá específicamente en los ejemplos más adelante, el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención puede causar la remisión de un tumor ya formado. Por tanto, dado que el inductor de inmunidad puede ejercer su actividad antineoplásica también contra un pequeño número de células cancerosas en las etapas tempranas, puede prevenirse el desarrollo o la recidiva del cáncer usando el agente antes de la aparición o después del tratamiento del cáncer. En otras palabras, el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención es útil tanto en el tratamiento como en la prevención del cáncer, y puede utilizarse como principio activo en un agente para tratar o prevenir el cáncer.

El inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención contiene como principio activo el polipéptido descrito anteriormente, de acuerdo con la presente invención, y puede consistir en un solo polipéptido, o en una combinación de una pluralidad de polipéptidos. Al combinar una pluralidad de los polipéptidos de acuerdo con la presente invención, la actividad de inducción de la inmunidad (actividad para inducir y activar los linfocitos T citotóxicos) de cada uno de los polipéptidos es mayor, y puede lograrse un tratamiento o prevención del cáncer más eficaz.

El inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención también puede utilizarse en combinación con uno o varios péptidos conocidos capaces de inducir linfocitos T citotóxicos. Al combinar los uno o más polipéptidos de acuerdo con la presente invención con dichos péptidos conocidos, la actividad de inducción de la inmunidad (actividad para inducir y activar los linfocitos T citotóxicos) de cada uno de los polipéptidos es mayor, y puede lograrse un tratamiento o prevención del cáncer más eficaz. El término "combinación", como se usa en este caso, incluye el caso en el que el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención y uno o más péptidos conocidos capaces de inducir linfocitos T citotóxicos se administran por separado o simultáneamente. La expresión "administrarse por separado", como se usa en el presente documento, significa que el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención y un péptido o péptidos conocidos capaces de inducir linfocitos T citotóxicos se administran por separado en distintos momentos con un cierto intervalo de tiempo entre ellos. No existen limitaciones en cuanto al orden de la administración. Por otro lado, la expresión "que se va a administrar simultáneamente" significa que el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención y uno o más péptidos conocidos capaces de inducir linfocitos T citotóxicos se mezclan previamente y se administran en forma de una mezcla o que el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención y uno o más péptidos conocidos capaces de inducir linfocitos T citotóxicos se administran en formas separadas pero al mismo tiempo sin ningún intervalo de tiempo.

El inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención puede utilizarse en combinación con otro potenciador inmunitario capaz de potenciar la respuesta inmunitaria *in vivo*. El otro potenciador inmunitario puede estar incluido en el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención, o puede administrarse a un paciente como una composición separada, en combinación con la administración del inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención.

El "otro potenciador inmunitario" incluye, por ejemplo, un adyuvante. Un adyuvante puede potenciar la respuesta inmunitaria proporcionando una reserva de antígeno (de manera extracelular o dentro de macrófagos), activar los macrófagos y estimular conjuntos de linfocitos específicos, a fin de potenciar la actividad antineoplásica. Por tanto, en los casos donde el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención se usa como principio activo en un agente para el tratamiento o la prevención del cáncer, se prefiere que el inductor de inmunidad contenga adicionalmente un adyuvante, además del polipéptido de acuerdo con la presente invención como principio activo. Se conocen en la técnica diversos tipos de adyuvantes y puede usarse cualquiera de estos adyuvantes. Algunos ejemplos específicos de adyuvantes incluyen MPL (SmithKline Beecham), análogos del lipopolisacárido de *Salmonella minnesota* Re 595 obtenidos tras la purificación y la hidrólisis ácida del lipopolisacárido; QS21 (SmithKline Beecham), saponina QA-21 pura purificada de un extracto de *Quillja saponaria*; DQS21, descrito en la solicitud PCT WO 96/33739 (SmithKline Beecham); QS-7, QS-17, QS-18 y QS-L1 (So, H. S., *et al.*, "Molecules and cells", 1997, 7: 178-186); adyuvante incompleto de Freund; adyuvante completo de Freund; vitamina E; montanida; alumbre; oligonucleótidos de CpG (véase, por ejemplo, Kreig, A. M., *et al.*, 1995, *Nature* 374: 546-549); poli-I:C y derivados del mismo (tales como poli ICLC); y diversas emulsiones de agua en aceite preparadas a partir de aceites biodegradables tales como escualeno y/o tocoferol. Entre estos, se prefiere el adyuvante incompleto de Freund; la montanida; el poli-I:C y sus derivados; y los oligonucleótidos de CpG. La relación de mezcla del adyuvante anteriormente descrito al polipéptido es típicamente de aproximadamente 1:10 a 10:1, preferentemente de aproximadamente 1:5 a 5:1 y más preferentemente, aproximadamente 1:1. Sin embargo, el adyuvante no se limita a los ejemplos descritos anteriormente, y también se puede utilizar cualquier adyuvante conocido en la técnica distinto de los descritos anteriormente, cuando se administra el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención (véase, por

ejemplo, Goding, "*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*", 2.^a edición, 1986). Los métodos para preparar una mezcla o una emulsión de un inductor de inmunidad y un adyuvante son bien conocidos por los expertos en la técnica de la vacunación.

- 5 Además, aparte de los adyuvantes anteriormente descritos, pueden usarse factores que estimulan la respuesta inmunitaria del sujeto como el otro potenciador inmunitario. Por ejemplo, puede usarse cualquiera de los diversos tipos de citocinas que tienen la propiedad de estimular a los linfocitos y/o a las células presentadoras de antígenos como potenciador inmunitario, en combinación con el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención. Los expertos en la materia conocen varias de dichas citocinas capaces de potenciar la respuesta inmunitaria y entre los
- 10 ejemplos de estas se incluyen, pero sin limitación, interleucina-12 (IL-12), GM-CSF, IL-18, interferón- α (IFN- α), interferón- β (IFN- β), interferón- ω (IFN- ω), interferón- γ (IFN- γ) y ligando Flt3, que se ha demostrado que potencian la acción protectora de las vacunas. También puede usarse cualquiera de estos factores como el potenciador inmunitario anteriormente descrito y puede administrarse a un paciente en combinación con el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención, ya sea incorporándolo en el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención o
- 15 como una composición separada.

<Agente para tratar o prevenir el cáncer>

- 20 El inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención puede usarse como principio activo en un agente para el tratamiento o prevención del cáncer.

El agente para el tratamiento o la prevención del cáncer puede formularse mezclando, según convenga, el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención con uno o más aditivos, tales como un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para cada forma farmacéutica.

- 25 Los métodos de formulación y los aditivos que pueden usarse se conocen bien en la técnica de formulación farmacéutica y puede usarse cualquiera de los métodos y aditivos. Entre los ejemplos específicos de aditivos se incluyen, pero sin limitación: diluyentes, tales como soluciones tamponadoras fisiológicas; excipientes, tales como azúcar, lactosa, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol y glicina; aglutinantes, tales como jarabe, gelatina, goma arábica, sorbitol, cloruro de polivinilo y tragacanto; y lubricantes, tales como estearato de magnesio, polietilenglicol, talco y sílice. Entre los ejemplos de la forma farmacéutica se incluyen preparaciones orales, tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos y jarabes; y preparaciones parenterales, tales como inhalaciones, soluciones para inyección, supositorios y soluciones. Estas formulaciones pueden prepararse mediante métodos de producción comúnmente conocidos.

- 35 <Células presentadoras de antígenos>

- 40 El polipéptido puede presentarse por las células presentadoras de antígenos poniendo en contacto el polipéptido descrito anteriormente con las células presentadoras de antígenos *in vitro*. En otras palabras, el polipéptido (a) a (c) anteriormente descrito puede usarse como un agente para tratar a las células presentadoras de antígenos. Como células presentadoras de antígenos, se pueden utilizar preferentemente células dendríticas o linfocitos B que tengan moléculas de MHC de clase I y de clase II. Se han identificado diversas moléculas del MHC de clase I y de clase II que son bien conocidas. Las moléculas del MHC en seres humanos se denominan HLA.

- 45 Los ejemplos de moléculas de clase I de HLA incluyen HLA-A, HLA-B y HLA-C. Algunos ejemplos más específicos de moléculas de clase I de HLA incluyen HLA-A, HLA-B y HLA-C; y entre los ejemplos más específicos de las mismas se incluyen HLA-A1, HLA-A0201, HLA-A0204, HLA-A0205, HLA-A0206, HLA-A0207, HLA-A11, HLA-A24, HLA-A31, HLA-A6801, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B2705, HLA-B37, HLA-Cw0401 y HLA-Cw0602.

- 50 Entre los ejemplos de moléculas de HLA de clase II se incluyen HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP; y entre los ejemplos más específicos se incluyen HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*08, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*15, HLA-DRB1*15, HLA-DQA1, HLA-DQB1 y HLA-DPB1.

- 55 Las células dendríticas o los linfocitos B que tienen moléculas de HLA de clase I o HLA de clase II pueden prepararse a partir de sangre o similares mediante un método bien conocido. Por ejemplo, pueden inducirse células dendríticas específicas de tumores induciendo células dendríticas de la médula ósea, la sangre del cordón umbilical o la sangre periférica del paciente usando factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-3 (o IL-4) y después añadiendo un péptido relacionado con los tumores al sistema de cultivo.

- 60 Se puede inducir una respuesta inmunitaria deseable para tratar el cáncer administrando una cantidad eficaz de las células dendríticas obtenidas de este modo. Las células que se van a usar pueden obtenerse de médula ósea o sangre de cordón umbilical proporcionada por un individuo sano o de médula ósea o sangre periférica o similares del propio paciente. Se prefiere el uso de células autólogas obtenidas del propio paciente, ya que son altamente seguras y se espera evitar efectos secundarios graves. La sangre periférica o la médula ósea puede proceder de cualquiera de una muestra fresca, una muestra conservada en frío o una muestra congelada. La sangre periférica puede obtenerse mediante el cultivo de la sangre completa, o mediante el cultivo únicamente de los componentes leucocitarios
- 65

separados, siendo este último más eficaz y, por tanto, preferido. Además, las células mononucleares pueden separarse de entre los componentes leucocitarios. En los casos en los que las células que se van a usar proceden de médula ósea o de sangre de cordón umbilical, pueden cultivarse todas las células que forman la médula ósea o pueden separarse células mononucleares de la misma y cultivarse. La sangre periférica, los componentes leucocitarios de la misma y las células de médula ósea contienen células mononucleares, células madre hematopoyéticas y células dendríticas inmaduras, de las que proceden las células dendríticas, así como células CD4-positivas y similares. No existe ninguna limitación particular en cuanto al método de producción de las citocinas que se van a utilizar, y cualquier citocina, ya sea natural o recombinante, puede utilizarse siempre que se haya confirmado su seguridad y su actividad fisiológica. Es preferible utilizar un preparado de calidad garantizada para uso médico, en una cantidad mínima necesaria. La concentración de las citocinas que se van a añadir no está particularmente limitada, en tanto que pueda inducir a las células dendríticas. En general, la concentración total de las una o más citocinas es preferentemente de aproximadamente 10 a 1.000 ng/ml y más preferentemente, de aproximadamente 20 a 500 ng/ml. El cultivo puede llevarse a cabo usando un medio bien conocido comúnmente usado para el cultivo de leucocitos. La temperatura de cultivo no está particularmente limitada en tanto que pueda propagar los leucocitos; sin embargo, se prefiere particularmente una temperatura de aproximadamente 37 °C, que es la temperatura del cuerpo humano. Además, el ambiente atmosférico durante el cultivo no está particularmente limitado mientras pueda propagar los leucocitos; sin embargo, es preferible que se deje fluir un 5% de CO₂. El período de tiempo de cultivo no está particularmente limitado siempre que se pueda inducir un número necesario de células dentro de ese período. El cultivo normalmente se lleva a cabo durante un periodo de 3 días a 2 semanas. Los aparatos utilizados para la separación y el cultivo de las células pueden seleccionarse según convenga. Se prefieren los aparatos cuya seguridad para el uso médico haya sido confirmada, y que pueden funcionar de forma estable y sencilla. En cuanto al aparato para el cultivo celular, en particular, es posible usar no solo un recipiente convencional como una placa de Petri, un matraz o una botella, sino también un recipiente multicapa, un recipiente multietapa, un matraz rotatorio, un matraz de centrifugación, un recipiente de cultivo de tipo bolsa, una columna de fibra hueca o similares.

El proceso para poner en contacto el polipéptido anteriormente descrito con las células presentadoras de antígenos *in vitro* puede llevarse a cabo mediante un método bien conocido. Por ejemplo, puede llevarse a cabo cultivando las células presentadoras de antígenos en un medio de cultivo que contiene el polipéptido anteriormente descrito. La concentración del péptido en el medio no está particularmente limitada, y suele ser de aproximadamente 1 a 100 µg/ml, y preferentemente de aproximadamente 5 a 20 µg/ml. La densidad celular durante el cultivo no está particularmente limitada, y normalmente es de aproximadamente 10³ a 10⁷ células/ml, y preferentemente, de aproximadamente 5 x 10⁴ a 5 x 10⁶ células/ml. El cultivo se realiza preferentemente a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂, de acuerdo con un método convencional. La longitud máxima del péptido que puede presentarse sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos es normalmente una longitud de aproximadamente 30 restos de aminoácidos. Por tanto, en los casos donde las células presentadoras de antígenos se ponen en contacto con el polipéptido *in vitro*, el polipéptido puede prepararse de tal forma que su longitud no sea de más de aproximadamente 30 restos de aminoácidos, pero no se limitan particularmente a los mismos.

Al cultivar las células presentadoras de antígenos con el polipéptido anteriormente descrito, el polipéptido se incorpora en moléculas del MHC de las células presentadoras de antígenos y se presenta sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos. Por tanto, las células presentadoras de antígenos que contienen el complejo del polipéptido y la molécula del MHC pueden prepararse usando el polipéptido anteriormente descrito. Estas células presentadoras de antígenos pueden presentar el polipéptido a los linfocitos T *in vivo* o *in vitro*, inducir linfocitos T citotóxicos o linfocitos T colaboradores específicos para el polipéptido, y propagar estas células.

Al poner en contacto las células presentadoras de antígenos que contienen el complejo del polipéptido anteriormente descrito y la molécula del MHC con los linfocitos T *in vitro*, es posible inducir linfocitos T citotóxicos o linfocitos T colaboradores específicos para el polipéptido, y permitir la proliferación de estas células. Esto puede lograrse cocultivando las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T en un medio líquido. Por ejemplo, puede llevarse a cabo suspendiendo las células presentadoras de antígenos en un medio líquido, colocando la suspensión resultante en un recipiente, tal como en los pocillos de una microplaca, añadiendo linfocitos T a la misma y después, cultivando las células. La relación de mezcla de las células presentadoras de antígenos a los linfocitos T cuando se cocultivan estas células no está particularmente limitada, y suele ser de aproximadamente 1:1 a 1:100, y preferentemente de aproximadamente 1:5 a 1:20 en términos de número de células. La densidad de las células presentadoras de antígenos que se van a suspender en el medio líquido no está particularmente limitada y normalmente es de aproximadamente 100 a 10 millones de células/ml y preferentemente, de aproximadamente 10.000 a 1 millón de células/ml. El cocultivo se realiza preferentemente a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂, de acuerdo con un método convencional. El periodo de cultivo no está particularmente limitado, y suele ser de aproximadamente 2 días a 3 semanas, y preferentemente de aproximadamente 4 días a 2 semanas. Además, el cocultivo se lleva a cabo preferentemente en presencia de uno o más tipos de interleucinas, tales como IL-2, IL-6, IL-7 y/o IL-12. En dichos casos, la concentración de IL-2 o IL-7 es normalmente de aproximadamente 5 a 20 U/ml, la concentración de IL-6 es habitualmente de aproximadamente 500 a 2000 U/ml y la concentración de IL-12 es habitualmente de aproximadamente 5 a 20 ng/ml, pero sin limitarse a las mismas. El cocultivo descrito anteriormente puede repetirse una o varias veces, añadiendo células presentadoras de antígenos nuevas. Por ejemplo, la operación de desechar el sobrenadante de cultivo después del cocultivo y de añadir una suspensión fresca de las células presentadoras de antígenos seguir llevando a cabo el cocultivo, puede repetirse una o varias veces. Las condiciones de cada cocultivo pueden ser las mismas a las

descritas anteriormente.

El cocultivo descrito anteriormente permite la inducción y proliferación de linfocitos T citotóxicos y linfocitos T colaboradores específicos para el polipéptido. Por tanto, los linfocitos T aislados que se unen selectivamente al complejo del polipéptido y la molécula del MHC pueden prepararse usando el polipéptido descrito anteriormente.

Como se describirá en los ejemplos más adelante, el gen (gen PDS5A) que codifica la proteína PDS5A se expresa específicamente en cada uno de: leucocitos de leucemia, tejidos de linfoma maligno, células de linfoma maligno, tejidos de cáncer de próstata, células de cáncer de próstata, tejidos de cáncer de hígado, células de cáncer de hígado, tejidos de cáncer de mama, células de cáncer de mama, tejidos de cáncer de páncreas, células de cáncer de páncreas, tejidos de cáncer de ovario, células de cáncer de ovario, tejidos de cáncer renal, células de cáncer renal, tejidos de cáncer colorrectal, células de cáncer colorrectal, tejidos de cáncer de estómago, células de cáncer de estómago, tejidos de tumores cerebrales malignos, células de tumores cerebrales malignos, tejidos de cáncer de pulmón, células de cáncer de pulmón, tejidos de cáncer de esófago y células de cáncer de esófago. Por tanto, se cree que en las células de estos tipos de cáncer está presente una cantidad significativamente mayor de la proteína PDS5A, que en las células normales. Cuando los linfocitos T citotóxicos o los linfocitos T colaboradores preparados como se ha descrito anteriormente se administran a un cuerpo vivo, mientras que una parte de la proteína PDS5A presente en las células cancerosas se presenta por las moléculas del MHC en la superficie de las células cancerosas, la proteína presentada de este modo sirve como marcador para permitir que los linfocitos T citotóxicos dañen las células cancerosas o para potenciar la actividad citotóxica de los linfocitos T citotóxicos. Dado que las células presentadoras de antígenos que presentan el polipéptido descrito anteriormente pueden inducir y propagar linfocitos T citotóxicos y linfocitos T colaboradores específicos para el polipéptido, también *in vivo*, la administración de las células presentadoras de antígenos a un organismo vivo también puede permitir que los linfocitos T citotóxicos dañen las células cancerosas o potenciar la actividad citotóxica de los linfocitos T citotóxicos. En otras palabras, los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos T colaboradores, así como las células presentadoras de antígenos preparadas con el polipéptido anterior, también son útiles como agentes para tratar o prevenir el cáncer, al igual que el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención.

En caso de administrar las células presentadoras de antígenos anteriormente descritas aisladas o linfocitos T aislados a un organismo vivo, estas células se preparan preferentemente tratando células presentadoras de antígenos o linfocitos T recogidos del paciente que se va a tratar, con el polipéptido (a) a (c) como se ha descrito anteriormente, para evitar la respuesta inmunitaria en el organismo vivo, que ataca a estas células como sustancias extrañas.

El agente para tratar o prevenir el cáncer que comprende como principio activo las células presentadoras de antígenos o los linfocitos T aislados, se administra preferentemente mediante una vía de administración parenteral, tal como administración intravenosa o intraarterial. La cantidad de dosis se selecciona según convenga en función de los síntomas, el fin de la administración y similares. La cantidad de dosis suele ser de uno a 10 billones de células, y preferentemente de 1 millón a 1.000 millones de células, administrándose dicha cantidad una vez cada varios días o varios meses. La formulación puede ser, por ejemplo, una suspensión de las células en solución salina fisiológica tamponada y la formulación puede utilizarse en combinación con uno o más agentes antineoplásicos diferentes, una o más citocinas y/o similares. Además, también pueden añadirse a la formulación uno, o dos o más aditivos conocidos en el campo de la formulación farmacéutica.

<Vacuna génica>

La inducción inmunitaria, en concreto, la inducción de la producción de anticuerpos o de linfocitos T citotóxicos en el cuerpo de un animal en cuestión, también puede lograrse permitiendo que un polinucleótido que codifica el polipéptido (a) a (c) se exprese en el organismo vivo. Esto proporciona un efecto equivalente al proporcionado por la administración del polipéptido. En otras palabras, el inductor de inmunidad de acuerdo con la presente invención puede comprender como principio activo un vector recombinante que contiene el polinucleótido que codifica el polipéptido descrito anteriormente (a) a (c) y que puede expresar el polipéptido en un organismo vivo. Dicho vector recombinante capaz de expresar un polipéptido antigénico, que se mostrará en los ejemplos más adelante, también se denomina "vacuna génica".

El vector que se utilizará para la producción de una vacuna génica no está particularmente limitado siempre que pueda expresar un polipéptido en una célula del animal en cuestión (preferentemente, en una célula de mamífero). El vector puede ser un vector plasmídico o un vector vírico, y puede utilizarse cualquier vector conocido en el campo de las vacunas génicas. El polinucleótido, tal como ADN o ARN, que codifica el polipéptido descrito anteriormente puede prepararse fácilmente como se ha descrito anteriormente, mediante un método convencional. Además, el polinucleótido puede incorporarse en un vector usando un método bien conocido por los expertos en la materia.

La vacuna génica se administra preferentemente por vía parenteral, tal como mediante administración intramuscular, subcutánea, intravenosa o intraarterial. La cantidad de dosis de la vacuna génica puede seleccionarse según convenga en función del tipo de antígeno y similares, y suele ser de aproximadamente 0,1 µg a 100 mg, y preferentemente de aproximadamente 1 µg a 10 mg, en términos del peso de la vacuna génica por 1 kg de peso corporal.

El método que utiliza un vector de virus puede ser, por ejemplo, un método en el que se incorpora un polinucleótido que codifica el polipéptido anteriormente descrito en un virus de ARN o un virus de ADN, tal como un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus del herpes, virus vaccinia, virus de la viruela, poliovirus o virus de Sindbis y después se infecta a un animal en cuestión con el virus resultante. En particular, se prefiere particularmente un método

Entre los ejemplos de otros métodos se incluye un método en el que el plásmido de expresión se administra directamente por vía intramuscular (método de vacuna de ADN), el método de liposomas, el método de lipofectina, el método de microinyección, el método de fosfato de calcio y el método de electroporación. De estos, el método de la vacuna de ADN y el método de los liposomas son particularmente preferidos.

Los métodos para permitir que el gen que codifica el polipéptido utilizado en la presente invención actúe realmente como un fármaco incluyen: un método *in vivo* que comprende la introducción directa del gen en el organismo de un sujeto; y un método *ex vivo* que comprende la recogida de un determinado tipo de células de un animal en cuestión, y la introducción del gen en las células *ex vivo*, seguido de la reintroducción de las células en el cuerpo del animal en cuestión. De estos, se prefiere especialmente el método *in vivo*.

Cuando el gen se administra mediante el método *in vivo*, el gen puede administrarse mediante una vía de administración adecuada que depende de la enfermedad que se vaya a tratar, los síntomas y similares. Por ejemplo, el gen puede administrarse mediante una administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular o similares. En el caso de la administración del gen mediante el método *in vivo*, el gen puede formularse en una forma farmacéutica, tal como una solución; pero generalmente se formula como una solución para inyección o similares que contiene el ADN que codifica el péptido anteriormente descrito de acuerdo con la presente invención como principio activo. Puede usarse en caso necesario uno o más portadores comúnmente usados. En el caso de usar un liposoma o un liposoma que se fusione con la membrana (virus Sendai (HVJ)-liposoma o similar) que contiene el ADN, puede formularse el liposoma en una preparación liposómica, tal como una suspensión, preparación congelada o preparación congelada concentrada por centrifugación.

En la presente invención, "la secuencia de bases representada por la SEQ ID NO: 1" incluye no solo la secuencia de bases realmente representada por la SEQ ID NO: 1, sino también la secuencia complementaria a la misma. Por tanto, "un polinucleótido que tiene la secuencia de bases representada por la SEQ ID NO: 1" incluye un polinucleótido monocatenario que tiene la secuencia de bases realmente representada por la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido monocatenario que tiene la secuencia de bases complementaria a la misma y un polinucleótido bicatenario que consiste en estos polinucleótidos monocatenarios. Cuando se prepara el polinucleótido que codifica el polipéptido usado en la presente invención, se seleccionará una de estas secuencias de bases según convenga, y los expertos en la materia pueden realizar fácilmente dicha selección.

Ejemplos

La presente invención se describirá de manera más específica a continuación, mediante ejemplos.

<Ejemplo 1: análisis de expresión en diversos tejidos>

(1) Análisis de la expresión del gen PDS5A en varias líneas celulares de cáncer

La secuencia del gen (SEQ ID NO: 1) que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína PDS5A humana se obtiene de GeneBank. La expresión del gen obtenido de este modo en varios tipos de líneas celulares humanas se analizó mediante RT-PCR (PCR con retrotranscripción). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo del siguiente modo. Específicamente, se extrajo el ARN total de 50 a 100 mg de cada tejido o de 5 a 10 x10⁶ células de cada línea celular usando reactivo TRIZOL (fabricado por Life Technologies, Inc.) de acuerdo con el protocolo descrito en las instrucciones adjuntas. El ARN total obtenido de este modo se usó para sintetizar ADNc, usando el sistema de síntesis Superscript First-Strand para RT-PCR (fabricado por Life Technologies, Inc.) según el protocolo descrito en las instrucciones adjuntas. Como ADNc de tejidos normales humanos (cerebro, hipocampo, testículo, colon y placenta), se usó ADNc Gene Pool (fabricado por Life Technologies, Inc.), ADNc QUICK-Clone (fabricado por Clontech Laboratories, Inc.) y Large-Insert cDNA Library (fabricado por Clontech Laboratories, Inc.). La reacción de la PCR se llevó a cabo del siguiente modo, usando cebadores específicos para el gen obtenido (las secuencias de bases de los cebadores están representadas por las SEQ ID NO: 68 y 69). Específicamente, se añadieron reactivos y un tampón adjunto para preparar una mezcla con un volumen total de 25 µl, y que contenía 0,25 µl de una muestra preparada mediante la reacción de retrotranscripción, 2 µM de cada uno de los cebadores anteriormente descritos, 0,2 mM de cada uno de los dNTP y 0,65 U de polimerasa ExTaq (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.). A continuación, la reacción se llevó a cabo con un termociclador (fabricado por Bio-Rad laboratories Inc.) repitiendo un ciclo que consistía en reacciones a 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto, durante 30 veces. Al mismo tiempo, se usaron cebadores específicos para GAPDH, que es un gen constitutivo (las secuencias de bases de los cebadores de GAPDH humano están representadas por las SEQ ID NO: 70 y 71) como control para la comparación.

Como resultado, como se muestra en la figura 1, la expresión del gen humano PDS5A se detectó en la mayoría de las líneas celulares de cáncer, en concreto, en las líneas celulares de leucemia, linfoma maligno, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, tumor cerebral maligno, cáncer de pulmón y cáncer de esófago.

(2) Expresión de la proteína PDS5A en tejido canceroso humano (tinción inmunohistoquímica)

La tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo en 72 muestras de tejido canceroso en un conjunto de tejidos de cáncer múltiple incluidos en parafina (fabricado por Biomax Inc.). La matriz de tejido canceroso humano se trató a 60 °C durante 3 horas y se colocó en un frasco de tinción relleno de xileno y se repitió 3 veces la operación de reemplazo de xileno por xileno fresco cada 5 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo la misma operación usando etanol y PBS-T en lugar de xileno. La matriz de tejido de cáncer humano se colocó en un frasco de tinción con una solución de tampón citrato 10 mM (pH 6,0) que contenía Tween 20 al 0,05 %, se trató a 125 °C durante 5 minutos y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 40 minutos o más. El exceso de humedad alrededor de las secciones de tejido se limpió con toallitas Kimwipes, se rodearon las secciones de tejido usando un bolígrafo DAKOPEN y se añadió por goteo a las mismas una cantidad adecuada de Peroxidase Block (fabricado por DAKO). Después de dejar reposar la matriz a temperatura ambiente durante 5 minutos, la matriz se colocó en un frasco de tinción relleno de PBS-T y se repitió 3 veces la operación de reemplazo del PBS-T por PBS-T fresco cada 5 minutos. Como solución de bloqueo, se aplicó a la matriz una solución de PBS-T que contenía FBS al 10 % y se dejó reposar la matriz en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se diluyó un anticuerpo policlonal de conejo comercial (fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC.), que reacciona con la proteína PDS5A, con una solución de PBS-T que contenía FBS al 5 % hasta una concentración de 10 µg/ml y la solución resultante se aplicó a la matriz, seguido de dejar reposar la matriz durante toda la noche en una cámara húmeda controlada a 4 °C. Después de lavar la matriz con PBS-T durante 10 minutos, 3 veces, se añadió por goteo una cantidad adecuada de polímero conjugado marcado con peroxidasa (fabricado por DAKO) y se dejó reposar la matriz en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de lavar la matriz con PBS-T durante 10 minutos, 3 veces, se aplicó una solución de revelado del color DAB (fabricada por DAKO) y se dejó reposar la matriz a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. A continuación, se desechó la solución de revelado del color y se lavó la matriz con PBS-T durante 10 minutos, 3 veces, seguido de aclarado con agua destilada. Después se sumergió la matriz de manera sucesiva en soluciones de etanol al 70 %, 80 %, 90 %, 95 % y 100 % durante 1 minuto cada una y luego se dejó reposar toda la noche sumergida en xileno. Se recuperó el portaobjetos de vidrio de la matriz, se montó con medio de montaje Glycerogel (fabricado por DAKO) y después se observó.

Como resultado, se observó una fuerte expresión de la proteína PDS5A en la mayoría de los tejidos de los cánceres analizados, en concreto: cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, tumor cerebral maligno, cáncer de pulmón y cáncer de esófago.

<Ejemplo 2: inducción de linfocitos T CD8-positivos reactivos con el epítipo peptídico>

(1) Predicción de motivos peptídicos que se unen a HLA-A0201 y HLA-A24

La información acerca de la secuencia de aminoácidos de la proteína PDS5A humana representada por la SEQ ID NO: 2 se obtuvo de GenBank. Para la predicción de los motivos de unión a HLA-A0201 y HLA-A24, se analizó la secuencia de aminoácidos de la proteína humana PDS5A mediante un programa de predicción informático usando un programa conocido, BIMAS (disponible en http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/). Como resultado, se seleccionaron 17 tipos de polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 19, que se esperaba fueran capaces de unirse a la molécula HLA-A0201; y 14 tipos de polipéptidos consistentes en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 20 a 34, que se esperaba fueran capaces de unirse a la molécula HLA-A24. Todos los polipéptidos seleccionados fueron sintetizados por Greiner Japan Co. Ltd., que ofrece servicios de síntesis de péptidos a medida. La calidad de los polipéptidos sintetizados se ha garantizado mediante análisis por HPLC y espectrometría de masas.

(2) Inducción de linfocitos T CD8-positivos reactivos con el epítipo peptídico

Se separó sangre periférica a partir de sangre de un individuo sano HLA-A0201-positivo. La sangre periférica se colocó en medio de separación de linfocitos (Organon Teknica Corporation, Durham, NC), y después se centrifugó a 1.500 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se recogió una fracción que contenía PBMC y se lavó 3 veces (o más) con una solución tampón de fosfato fría para obtener las PBMC. Las PBMC obtenidas de este modo se suspendieron en 20 ml de medio AIM-V (fabricado por Life Technologies, Inc.) y se dejó que se adhiriesen a un matraz de cultivo (fabricado por Falcon Plastics Co.) durante 2 horas en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂. Se usaron células no adherentes para la preparación de linfocitos T y células adherentes para la preparación de células dendríticas.

Las células adherentes se cultivaron en medio AIM-V en presencia de IL-4 (1.000 U/ml) y GM-CSF (1.000 U/ml). Seis días después, se reemplazó el medio con medio AIM-V complementado con IL-4 (1.000 U/ml), GM-CSF (1.000 U/ml), IL-6 (1.000 U/ml, fabricada por Genzyme Corporation), IL-1β (10 ng/ml, fabricada por Genzyme Corporation) y TNF-α

(10 ng/ml, fabricado por Genzyme Corporation), y las células se cultivaron durante otros 2 días. La población resultante de las células no adherentes se usó como células dendríticas.

Las células dendríticas preparadas de este modo se suspendieron en medio AIM-V a una densidad celular de 1×10^6 células/ml. Cada uno de los péptidos que se seleccionaron en el procedimiento (1) descrito anteriormente y que se esperaba que fueran capaces de unirse a la molécula HLA-A0201 se añadió a las células a una concentración de 10 µg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂, usando una placa de 96 pocillos. Después del cultivo, se irradiaron las células con rayos X (3000 rad), se lavaron con medio AIM-V, se suspendieron en medio AIM-V que contenía suero AB humano al 10 % (fabricado por Nabi Biopharmaceuticals Inc.), IL-6 (1.000 U/ml) e IL-12 (10 ng/ml, fabricada por Genzyme Corporation), y después se dispusieron en los pocillos de una placa de 24 pocillos a una densidad de 1×10^5 células por pocillo. Además, se añadió a los pocillos la población de linfocitos T preparados a una densidad de 1×10^6 células por pocillo y los pocillos se cultivaron en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂. Siete días después, se desechó el sobrenadante de cada cultivo. Posteriormente, se suspendieron las células dendríticas obtenidas de la misma manera que la descrita anteriormente mediante el tratamiento con cada péptido y la posterior irradiación con rayos X (densidad celular: 1×10^5 células/ml) en medio AIM-V que contenía suero AB humano al 10 % (fabricado por Nabi Biopharmaceuticals Inc.), IL-7 (10 U/ml, fabricada por Genzyme Corporation) e IL-2 (10 U/ml, fabricada por Genzyme Corporation), y la suspensión resultante se añadió a los pocillos de la placa de 24 pocillos a una densidad de 1×10^5 células por pocillo, seguido de un nuevo cultivo de las células. Se repitieron 4 veces los mismos procedimientos a intervalos de 7 días y después se recogieron los linfocitos T estimulados. A continuación, se confirmó la inducción de linfocitos T CD8-positivos mediante citometría de flujo.

Además, se llevó a cabo un tratamiento como el descrito anteriormente, usando como control negativo, un péptido (SEQ ID NO: 74) que tiene una secuencia fuera del ámbito de la presente invención; y utilizando como ejemplos comparativos los péptidos conocidos (SEQ ID NO: 75 a 83) que se unen a la molécula de HLA-A0201 y la proteína PDS5A que se había preparado de acuerdo con el ejemplo 5 del documento WO 2011/027807 y que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

La inducción de linfocitos T CD8-positivos reactivos con el epítipo peptídico se probó también para los péptidos que se esperaba que fueran capaces de unirse a la molécula de HLA-A24, del mismo modo descrito anteriormente, usando células dendríticas y una población de linfocitos T inducidos procedentes de sangre periférica de un individuo sano HLA-A24 positivo. Además, se llevó a cabo un tratamiento como el descrito anteriormente, usando como control negativo, un péptido (SEQ ID NO: 84) que tiene una secuencia fuera del ámbito de la presente invención; y utilizando como ejemplo comparativo, la proteína PDS5A que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

<Ejemplo 3: determinación de los epítopos antigénicos para los linfocitos T citotóxicos>

(1) Capacidad de producción de IFN-γ

Para examinar la especificidad de los respectivos linfocitos T inducidos en el ejemplo 2 (2) contra los respectivos péptidos epitópicos y la proteína, se pulsaron células dendríticas que expresan la molécula HLA-A0201 con diversos tipos de polipéptidos. Las células dendríticas se prepararon mediante cultivo en medio AIM-V complementado con cada polipéptido a una concentración de 10 µg/ml en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂ durante 4 horas. Como varios tipos de polipéptidos, se utilizaron los respectivos polipéptidos representados por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 19 y que se espera que sean capaces de unirse a la molécula HLA-A0201, el polipéptido de control negativo (SEQ ID NO: 74), los polipéptidos conocidos (SEQ ID NO: 75 a 83) que se unen a la molécula de HLA-A0201 y la proteína PDS5A que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2. Se añadieron 5×10^3 linfocitos T a 5×10^4 células dendríticas que se habían pulsado con cada péptido y las células se cultivaron durante 24 horas en medio AIM-V que contenía suero AB humano al 10 %, en una placa de 96 pocillos. Después del cultivo, se recogió cada sobrenadante y se midió la cantidad de IFN-γ producido mediante ELISA.

Como resultado, se observó una producción de IFN-γ claramente mayor en los sobrenadantes de los carriles 13 a 29 en los que se usaron células dendríticas pulsadas con los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 19, en comparación con los sobrenadantes de los carriles 1 y 2 en los que se usaron células dendríticas no pulsadas con ningún polipéptido y células dendríticas pulsadas con el polipéptido de control negativo, respectivamente (figura 2). Estos resultados revelaron que los péptidos de las SEQ ID NO: 3 a 19 son péptidos epitópicos de linfocitos T que tienen la capacidad de estimular específicamente la proliferación de linfocitos T CD8-positivos HLA-A0201-positivos y de inducir la producción de IFN-γ. Además, también se ha revelado que las cantidades de IFN-γ producidas por los linfocitos T estimulados con estos péptidos eran notablemente superiores a las cantidades de IFN-γ producidas por los linfocitos T estimulados con los péptidos conocidos que se unen a la molécula de HLA-A0201 y que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 75 a 83 (carriles 4 a 12) y la proteína PDS5A de longitud completa que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 (carril 3). En otras palabras, estos resultados indican que los polipéptidos de las SEQ ID NO: 3 a 19 tienen una actividad inductora de inmunidad notablemente mayor en comparación con la de los péptidos anteriormente notificados. Además, aunque las secuencias de las SEQ ID NO: 3 a 19 que tienen la actividad de inducción inmunitaria descrita anteriormente están incluidas en la secuencia de aminoácidos de la proteína PDS5A

de longitud completa representada por la SEQ ID NO: 2, la cantidad de IFN- γ producida por los linfocitos T estimulados con la proteína PDS5A de longitud completa de la SEQ ID NO: 2 fue baja. Se cree que el motivo de esto es que la proteína PDS5A de longitud completa no logró demostrar suficiente actividad inductora de inmunidad, ya que la secuencia de aminoácidos de la proteína PDS5A de longitud completa también incluye varias secuencias que inhiben la actividad inductora de inmunidad.

Además, con el fin de examinar la especificidad de cada uno de los linfocitos T CD8-positivos reactivos con el epítipo peptídico inducidos en el ejemplo 3 (2) usando los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 20 a 34, contra los epítopos peptídicos, se midió mediante ELISA, del mismo modo al descrito anteriormente, la cantidad de IFN- γ producido por los linfocitos T, contra las células dendríticas que expresaban la molécula HLA-A24, habiéndose pulsado dichas células dendríticas con cada uno de: los polipéptidos de las SEQ ID NO: 20 a 34 (carriles 4 a 18); el polipéptido de control negativo que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84; y la proteína PDS5A de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2.

Como resultado, se observó una producción de IFN- γ notablemente mayor en los sobrenadantes de cultivo de los carriles 4 a 18 en los que se usaron las células dendríticas pulsadas con los polipéptidos de las SEQ ID NO: 20 a 34, en comparación con los sobrenadantes de los carriles 1 y 2 en los que se usaron las células dendríticas no pulsadas con ningún polipéptido y las células dendríticas pulsadas con el polipéptido de control negativo, respectivamente (figura 3).

Estos resultados revelaron que los polipéptidos de las SEQ ID NO: 20 a 34 son péptidos epitópicos de linfocitos T que tienen la capacidad de estimular específicamente la proliferación de linfocitos T CD8-positivos HLA-A24-positivos y de inducir la producción de IFN- γ . Además, también se ha revelado que las cantidades de IFN- γ producidas por los linfocitos T estimulados con estos polipéptidos eran notablemente superiores a las cantidades de IFN- γ producidas por los linfocitos T estimulados con la proteína PDS5A de longitud completa que tiene en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2. Se cree que el motivo de esto es que la proteína PDS5A de longitud completa no logró demostrar suficiente actividad inductora de inmunidad, por el mismo motivo que se ha descrito anteriormente.

(2) Ensayo de citotoxicidad

Posteriormente, se examinó lo siguiente: si los polipéptidos que tienen las secuencias representadas por las SEQ ID NO: 3 a 19, que se usan en la presente invención, se presentan en las moléculas HLA-A0201 de las células tumorales que son HLA-A0201-positivas y que expresan la proteína humana PDS5A; si los linfocitos T CD8-positivos estimulados con los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden o no dañar las células tumorales que son HLA-A0201-positivas y que expresan la proteína PDS5A humana; y además, si los linfocitos T CD8-positivos descritos anteriormente tienen una capacidad notablemente mayor de dañar las células tumorales en comparación con los linfocitos T CD8-positivos estimulados con los péptidos conocidos (SEQ ID NO: 75 a 83) y los estimulados con la proteína PDS5A.

Se recogieron en un tubo para centrifugación de 50 ml células de cada una de los 10 tipos de líneas celulares cuya expresión de la proteína PDS5A humana se había confirmado, en concreto: células de la línea celular U251 de glioma humano (tumor cerebral maligno); células de la línea celular Jurkat de leucemia; una línea celular SK-Hep-1 de cáncer de hígado; una línea celular MCF7 de cáncer de mama; una línea celular Panel de cáncer de páncreas; una línea celular OVCAR3 de cáncer de ovario; una línea celular A498 de cáncer renal; una línea celular HCT116 de cáncer colorrectal; una línea celular KATO3 de cáncer de estómago; y una línea celular NCI-H522 de cáncer de pulmón (adquiridas de la ATCC), a razón de 1×10^6 células de cada una de ellas. Tras añadir 100 μ Ci de cromo 51 a las mismas, se incubaron las células a 37 °C durante 2 horas. A continuación, se lavaron las células de cada tipo 3 veces con medio RPMI (fabricado por Gibco Brl Co.) que contenía suero fetal bovino al 10 % (en lo sucesivo denominado FBS; fabricado por Gibco Brl Co.) y se colocaron en los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo en V a una densidad de 1×10^3 células por pocillo. A cada pocillo se añadieron 5×10^4 linfocitos T CD8-positivos HLA-A0201-positivos suspendidos en medio RPMI que contenía un FBS al 10 %, habiéndose inducido dichas células mediante estimulación con cada uno de: los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 19, los polipéptidos de control negativo (SEQ ID NO: 74), los péptidos conocidos (SEQ ID NO: 75 a 83) y la proteína PDS5A de longitud completa con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, seguido de cultivo durante 4 horas en condiciones de 37 °C y un 5 % de CO₂. Después del cultivo, se midió la cantidad de cromo 51 liberada por las células tumorales dañadas en cada sobrenadante de cultivo, con lo que se calculó la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8 positivos inducida por la estimulación con cada uno de los polipéptidos y la proteína.

Como resultado, se desveló que los linfocitos T CD8-positivos HLA-A0201-positivos inducidos mediante estimulación con los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 19 presentan una actividad citotóxica notablemente elevada, que se encuentra muy por encima del intervalo generalmente predecible, contra todas las 10 tipos de células descritas anteriormente. Como ejemplos representativos, la actividad citotóxica contra las células U251 y las células Jurkat se muestran en la figura 4A y la figura 4B, respectivamente. Puede observarse que los linfocitos T CD8-positivos estimulados con los polipéptidos que tienen las secuencias de

aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 19 (carriles 13 a 29, respectivamente) muestran una actividad citotóxica notablemente superior contra las células U251 y las células Jurkat, en comparación con los linfocitos T CD8-positivos estimulados con los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 75 a 83 (carriles 4 a 12, respectivamente) y los estimulados con la proteína PDS5A de longitud completa (carril 3). Por otro lado, los linfocitos T CD8-positivos inducidos con el polipéptido de control negativo (carril 2) no mostraron ninguna actividad citotóxica, el resultado es aproximadamente el mismo que en el caso del tratamiento simulado (carril 1). Estos resultados sugieren que cada uno de los polipéptidos de las SEQ ID NO: 3 a 19 utilizados en la presente invención se presenta en las moléculas HLA-A0201 en las células tumorales que son HLA-A0201-positivas y que expresan el polipéptido PDS5A humano, y además, que los polipéptidos de acuerdo con la presente invención tienen la capacidad de inducir linfocitos T citotóxicos CD8-positivos capaces de dañar dichas células tumorales hasta un nivel muy por encima de un intervalo predecible. Además, independientemente de que la secuencia de aminoácidos de la proteína PDS5A de longitud completa incluya las secuencias de las SEQ ID NO: 3 a 19, los linfocitos T CD8-positivos estimulados con la proteína PDS5A de longitud completa mostraron una actividad citotóxica notablemente inferior, en comparación con la de los linfocitos T CD8-positivos estimulados con los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 19 (carriles 3, 13 a 29). Se cree que esto se debe a que la proteína PDS5A no logró inducir linfocitos T con una elevada actividad citotóxica, ya que la secuencia de aminoácidos de la proteína PDS5A incluye varias secuencias que inhiben la actividad inductora de inmunidad.

De manera similar, se examinó si los polipéptidos de las SEQ ID NO: 20 a 34 se presentan en las moléculas HLA-A24 de las células tumorales que son HLA-A24-positivas y que expresan la proteína humana PDS5A; si los linfocitos T CD8-positivos estimulados con los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden o no dañar las células tumorales que son HLA-A24-positivas y que expresan la proteína PDS5A humana; y además, si los linfocitos T CD8-positivos descritos anteriormente tienen una capacidad notablemente mayor de dañar las células tumorales en comparación con los linfocitos T CD8-positivos estimulados con la proteína PDS5A.

Se permitió la incorporación de cromo 51 en un total de 6 tipos de líneas celulares que son HLA-A24-positivas y que expresan la proteína humana PDS5A, en concreto: una línea celular THP1 de leucemia; una línea celular SK-Hep1 de cáncer de hígado; una línea celular Caki 1 de cáncer renal; una línea celular SW480 de cáncer colorrectal; y una línea celular KATO3 de cáncer de estómago adquiridas de JCRB, RIKEN y la ATCC). Cada tipo de células se cultivó con los linfocitos T CD8-positivos HLA-A24-positivos que habían sido inducidos por la estimulación con cada uno de: los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 20 a 34; el polipéptido de control negativo (SEQ ID NO: 84); y la proteína PDS5A de longitud completa, y se midió la cantidad de cromo 51 liberado por las células dañadas en cada sobrenadante de cultivo.

Como resultado, se desveló que los linfocitos T CD8-positivos HLA-A24-positivos estimulados con los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 20 a 34 presentan una actividad citotóxica notablemente elevada, que está muy por encima del intervalo generalmente predecible, contra todos los tipos de células cancerosas usadas. Como ejemplos representativos, la actividad citotóxica contra las células THP1 y las células SW480 se muestran en la figura 5A y la figura 5B, respectivamente. Puede observarse que los linfocitos T CD8-positivos estimulados con los polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 20 a 34 (carriles 4 a 18, respectivamente) muestran una actividad citotóxica notablemente superior contra las células THP1 y las células SW480, en comparación con los linfocitos T CD8-positivos (carril 3) estimulados con la proteína SCD1 de longitud completa. Por otro lado, los linfocitos T CD8-positivos inducidos con el polipéptido de control negativo (carril 2) no mostraron ninguna actividad citotóxica, el resultado es aproximadamente el mismo que en el caso del tratamiento simulado (carril 1). Por tanto, puede observarse que cada uno de los polipéptidos de las SEQ ID NO: 24 a 36 se presenta en las moléculas HLA-A24 en las células que son HLA-A24-positivas y que expresan la proteína SCD1 humana, y estos resultados sugieren que los polipéptidos de acuerdo con la presente invención tienen la capacidad de inducir linfocitos T citotóxicos CD8-positivos capaces de dañar dichas células.

Por otro lado, cuando los 14 tipos de células cancerosas descritas anteriormente se expusieron a los polipéptidos representados por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 a 34 y la proteína PDS5A de longitud completa que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, no se eliminó ninguna célula cancerosa. Esto confirmó el hecho de que estos polipéptidos no tienen una actividad que elimine directamente las células cancerosas.

La actividad citotóxica se determinó como se ha descrito anteriormente, mezclando 5×10^4 células de los linfocitos T CD8-positivos estimulados e inducidos con cada uno de los polipéptidos usados en la presente invención y 1×10^3 células de cada tipo de célula tumoral en las que se había incorporado cromo 51; cultivando cada mezcla de células durante 4 horas; midiendo la cantidad de cromo 51 liberada en cada medio de cultivo durante el cocultivo; y calculando la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8-positivos contra cada uno de los tipos de células tumorales (denominadas células diana) de acuerdo con la siguiente fórmula*.

*Fórmula: actividad citotóxica (%) = cantidad de cromo 51 liberada de las células diana tras la adición de linfocitos T CD8-positivos / cantidad de cromo 51 liberada de las células diana tras la adición de ácido clorhídrico $1 \text{ N} \times 100$.

<Ejemplo 4: inducción de linfocitos T CD4-positivos reactivos con los epítomos peptídicos procedentes de un péptido derivado de la proteína PDS5A>

Para predecir los epítomos antigénicos para linfocitos T CD4-positivos, se analizó la secuencia de aminoácidos de la proteína PDS5A humana con un programa de predicción informático que utiliza el algoritmo SYFPEITHI (de Rammensee) y se seleccionaron 33 tipos de péptidos representados por las SEQ ID NO: 35 a 67 y que se espera que sean péptidos de unión a HLA de clase II. Todos los péptidos seleccionados fueron sintetizados por Greiner Japan Co. Ltd., que ofrece servicios de síntesis de péptidos a medida.

Se separó sangre periférica a partir de sangre de un individuo sano HLA-DRB1*04-positivo. La sangre periférica se colocó en un medio de separación de linfocitos (fabricado por Organon Teknika Corporation) y se centrifugó a 1.500 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se recogió una fracción que contenía PBMC y se lavó 3 veces (o más) con una solución tampón de fosfato fría para obtener las PBMC. Las PBMC obtenidas de este modo se suspendieron en 20 ml de medio AIM-V (fabricado por Life Technologies, Inc.) y se dejó que se adhiriesen a un matraz de cultivo (fabricado por Falcon Plastics Co.) durante 2 horas en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂. Se usaron células no adherentes para la preparación de linfocitos T y células adherentes para preparar las células dendríticas.

Las células adherentes se cultivaron en medio AIM-V en presencia de IL-4 (1.000 U/ml) y GM-CSF (1.000 U/ml). Seis días después, se reemplazó el medio con medio AIM-V complementado con IL-4 (1.000 U/ml), GM-CSF (1.000 U/ml), IL-6 (1.000 U/ml, fabricada por Genzyme Corporation), IL-1β (10 ng/ml, fabricada por Genzyme Corporation) y TNF-α (10 ng/ml, fabricado por Genzyme Corporation), y las células se cultivaron durante otros 2 días. La población obtenida de las células no adherentes se usó como células dendríticas.

Las células dendríticas preparadas de este modo se suspendieron en medio AIM-V a una densidad celular de 1 x 10⁶ células/ml. Se añadió a las células cada uno de los polipéptidos de las SEQ ID NO: 35 a 67, el polipéptido de control negativo (SEQ ID NO: 85) y la proteína PDS5A que consistía en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, a una concentración de 10 mg/ml, seguido de cultivo durante 4 horas en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂, usando una placa de 96 pocillos. Después del cultivo, se irradiaron las células con rayos X (3000 rad), se lavaron con medio AIM-V, se suspendieron en medio AIM-V que contenía suero AB humano al 10 % (fabricado por Nabi Biopharmaceuticals Inc.), IL-6 (1.000 U/ml) e IL-12 (10 ng/ml, fabricada por Genzyme Corporation), y después se dispusieron en los pocillos de una placa de 24 pocillos a una densidad de 1 x 10⁵ células por pocillo. Además, se añadió a los pocillos la población de linfocitos T preparados a una densidad de 1 x 10⁶ células por pocillo y los pocillos se cultivaron en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂. Siete días después, se desechó cada uno de los sobrenadantes de cultivo. Posteriormente, las células dendríticas tratadas con cada péptido obtenido del mismo modo al descrito anteriormente o con la proteína PDS5A, seguido de irradiación con rayos X se suspendieron en medio AIM-V que contenía suero AB humano al 10 % (fabricado por Nabi Biopharmaceuticals Inc.), e IL-2 (10 U/ml, fabricada por Genzyme Corporation), y la suspensión resultante se añadió a los pocillos de la placa de 24 pocillos a una densidad de 1 x 10⁵ células por pocillo, seguido de un nuevo cultivo de las células. Se repitieron 4 veces los mismos procedimientos a intervalos de 7 días y después se recogieron los linfocitos T estimulados. A continuación, se confirmó la inducción de linfocitos T CD4-positivos mediante citometría de flujo. Como resultado, se confirmó la proliferación de los linfocitos T inducidos en cada pocillo.

<Ejemplo 5: determinación de los epítomos de antígeno de linfocitos T colaboradores procedentes de la proteína PDS5A que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos HLA-DRB1*4-positivos>

Para examinar la especificidad de los respectivos linfocitos T CD4-positivos inducidos en el ejemplo 4 anteriormente descrito contra las respectivas proteínas peptídicas, se pulsaron las PBMC que expresan moléculas HLA-DRB1*04 con diversos tipos de polipéptidos. Las PBMC se prepararon mediante cultivo en medio AIM-V complementado con cada polipéptido a una concentración de 10 µg/ml en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂ durante 4 horas. Como varios tipos de polipéptidos, se utilizaron los respectivos polipéptidos representados por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 35 a 67, el polipéptido de control negativo (SEQ ID NO: 85) y la proteína PDS5A de longitud completa que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2. Se añadieron 5 x 10⁴ linfocitos T CD4-positivos a 5 x 10⁴ PBMC que se habían pulsado con cada péptido y las células se cultivaron durante 24 horas en medio AIM-V que contenía suero AB humano al 10 %, en una placa de 96 pocillos. Después del cultivo, se recogió cada sobrenadante y se midió la cantidad de IFN-γ producido mediante ELISA.

Como resultado, se confirmó una producción de 1.000 pg/ml de IFN-γ o más en los sobrenadantes de cultivo en los pocillos de las PBMC pulsadas con los respectivos péptidos de las SEQ ID NO: 35 a 67. Por otro lado, apenas se observó producción de IFN-γ en los sobrenadantes de cultivo en el pocillo de las PBMC pulsadas con el polipéptido de control negativo y en el pocillo con solo células dendríticas no pulsadas con ningún polipéptido. Por tanto, se desveló que los polipéptidos representados por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 35 a 67 son péptidos epítópicos de linfocitos T que tienen la capacidad de estimular y propagar específicamente los linfocitos T CD4-positivos HLA-DRB1*04-positivos y de inducir la producción de IFN-γ. Además, independientemente del hecho de que la secuencia de aminoácidos de la proteína PDS5A de longitud completa incluyese las secuencias anteriormente descritas de las SEQ ID NO: 35 a 67 que tienen una actividad inductora de inmunidad, la cantidad de IFN-γ producido en el sobrenadante de cultivo en el pocillo de las PBMC pulsadas con la proteína PDS5A de longitud completa era

extremadamente baja. Se cree que el motivo de esto es que la proteína PDS5A no logró demostrar suficiente actividad inductora de inmunidad, ya que la secuencia de aminoácidos de la proteína PDS5A incluye varias secuencias que inhiben la actividad inductora de la inmunidad.

- 5 Posteriormente, se examinó si los polipéptidos de las SEQ ID NO: 35 a 67 que tienen la capacidad de estimular la proliferación de los linfocitos T HLA-DRB1*04-positivos son epítomos que se procesan de forma natural a partir de la proteína PDS5A en las células presentadoras de antígenos y se presentan en HLA-DR. Se añadió un lisado de células HEK293 (adquiridas de la ATCC) que expresaba transitoriamente la proteína PDS5A a células dendríticas inmaduras para permitir la digestión de la proteína y la maduración de las células dendríticas. Posteriormente, se examinó si los
- 10 linfocitos T estimulados con cada uno de los polipéptidos de las SEQ ID NO: 35 a 67, el polipéptido de control negativo y la proteína PDS5A se estimulan por las células dendríticas resultantes. Se separó sangre periférica a partir de sangre de un individuo sano HLA-DRB1*04-positivo. La sangre periférica se colocó en un medio de separación de linfocitos y se centrifugó a 1.500 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se recogió la interfase que contenía las PBMC y se lavó 3 veces (o más) con una solución tampón de fosfato fría para obtener las PBMC. Las PBMC obtenidas de este modo se suspendieron en 20 ml de medio AIM-V y se dejó que se adhiriesen a un matraz de cultivo (fabricado por Falcon Plastics Co.) durante 2 horas en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂. Las células adherentes se cultivaron en medio AIM-V en presencia de IL-4 (1.000 U/ml) y GM-CSF (1.000 U/ml) durante 6 días, obteniéndose células dendríticas inmaduras. El lisado anteriormente descrito se añadió a 5 x 10⁵ células dendríticas inmaduras, seguido de cultivo en medio AIM-V complementado con IL-4 (1.000 U/ml), GM-CSF (1.000 U/ml), IL-6 (1.000 U/ml), IL-1β (10 ng/ml) y TNF-α (10 ng/ml) durante 2 días. Las células dendríticas cultivadas se irradiaron con rayos X (3000 rad), se lavaron con medio AIM-V, se suspendieron en medio AIM-V que contenía suero AB humano al 10 % y después se colocaron en los pocillos de una placa de 96 pocillos a una densidad de 3,3 x 10⁴ células por pocillo. A cada pocillo se le añadieron 5 x 10⁴ linfocitos T estimulados con cada uno de los polipéptidos de las SEQ ID NO: 35 a 67, el polipéptido de control negativo y la proteína PDS5A y las células se cultivaron en condiciones de 37 °C y un 5 % de CO₂ durante
- 25 24 horas. Después del cultivo, se recogió cada sobrenadante y se midió la cantidad de IFN-γ producido mediante ELISA.

- Como resultado, como se muestra en la figura 6, se ha comprobado que los linfocitos T de los carriles 4 a 36 se estimularon con los polipéptidos de las SEQ ID NO: 35 a 67, respectivamente, produjeron IFN-γ en respuesta a la estimulación con las células dendríticas a las que se añadió la proteína PDS5A. Por otro lado, apenas se observó producción de IFN-γ en los linfocitos T del carril 2 estimulados con el polipéptido de control negativo y los linfocitos T del carril 1 no estimulados con ningún polipéptido. Por tanto, se desveló que los polipéptidos de las SEQ ID NO: 35 a 67 son epítomos que se procesan de forma natural a partir de la proteína PDS5A en las células presentadoras de antígenos y se presentan en HLA-DR. Además, la producción de IFN-γ en los linfocitos T del carril 3 pulsados con la proteína PDS5A de longitud completa fue extremadamente baja, también en el presente experimento. Se cree que el motivo de esto es que la proteína PDS5A de longitud completa no logró demostrar suficiente actividad inductora de inmunidad, ya que la secuencia de aminoácidos de la proteína PDS5A de longitud completa incluye varias secuencias que inhiben la actividad inductora de la inmunidad.
- 30
- 35

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene una actividad inductora de inmunidad y se selecciona entre el grupo de polipéptidos (a) a (c) a continuación:
 - 5 (a) polipéptidos que tienen una actividad inductora de inmunidad y que consisten en 7 o más aminoácidos consecutivos dentro de la región de las posiciones 24 a 97, las posiciones 134 a 197, las posiciones 265 a 332, las posiciones 378 a 463, las posiciones 472 a 498, las posiciones 533 a 567, las posiciones 613 a 643, las posiciones 671 a 735, las posiciones 737 a 780, las posiciones 792 a 830, las posiciones 832 a 899, las posiciones 920 a 943, las posiciones 946 a 993 o las posiciones 1074 a 1215 en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2;
 - 10 (b) polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 7, 22, 36, 42, 63 y 64;
 - (c) polipéptidos que comprenden una, dos o tres eliminaciones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los polipéptidos de (a) y (b) y que conservan la actividad inductora de inmunidad de dichos polipéptidos.
 - 15
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que se une a una molécula de MHC de clase I.
3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el polipéptido es un polipéptido cualquiera seleccionado entre el grupo de polipéptidos (d) a (f) a continuación:
 - 20 (d) polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 3 a 6, 8 a 21 y 23 a 34;
 - (e) polipéptidos que comprenden una, dos o tres eliminaciones, sustituciones y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los polipéptidos de (d);
 - 25 (f) polipéptidos que comprenden cada uno como secuencia parcial uno cualquiera de los polipéptidos (d) o (e).
4. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que se une a una molécula de MHC de clase II.
5. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en donde el polipéptido es un polipéptido cualquiera seleccionado entre el grupo de polipéptidos (g) a (i) a continuación:
 - 30 (g) polipéptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 35, 37 a 41, 43 a 62 y 65 a 67;
 - (h) polipéptidos que comprenden una, dos o tres eliminaciones, sustituciones y/o adiciones en la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los polipéptidos (g);
 - 35 (i) polipéptidos que comprende cada uno como secuencia parcial uno cualquiera de los polipéptidos (g) o (h).
6. Una célula presentadora de antígenos aislada que comprende un complejo del polipéptido que tiene una actividad inductora de inmunidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y una molécula de MHC.
- 40 7. Un linfocito T aislado que se une de manera selectiva a un complejo del polipéptido que tiene una actividad inductora de inmunidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y una molécula de MHC.
8. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una composición que comprende (i) al menos un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o (ii) un vector recombinante que comprende al menos un polinucleótido que codifica uno cualquiera de los polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y que es capaz de expresar el polipéptido *in vivo*; o una célula presentadora de antígenos aisladas de acuerdo con la reivindicación 6; o un linfocito T aislado de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el polipéptido, la composición, la célula presentadora de antígenos aislada o el linfocito T aislado es para su uso en un método de tratamiento médico.
- 45
- 50 9. El polipéptido, la composición, la célula presentadora de antígenos o el linfocito T para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el uso es el tratamiento o la prevención del cáncer.
10. El polipéptido, la composición, la célula presentadora de antígenos, el linfocito T o el polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el cáncer es un cáncer que expresa la proteína PDS5A.
- 55
11. El polipéptido, la composición, la célula presentadora de antígenos o el linfocito T o el polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde el cáncer es leucemia, linfoma maligno, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, tumor cerebral maligno, cáncer de pulmón o cáncer de esófago.
- 60
12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que además comprende un potenciador inmunitario seleccionado entre un adyuvante o una citocina que tiene una propiedad para estimular los linfocitos y/o las células presentadoras de antígenos.

Fig. 1

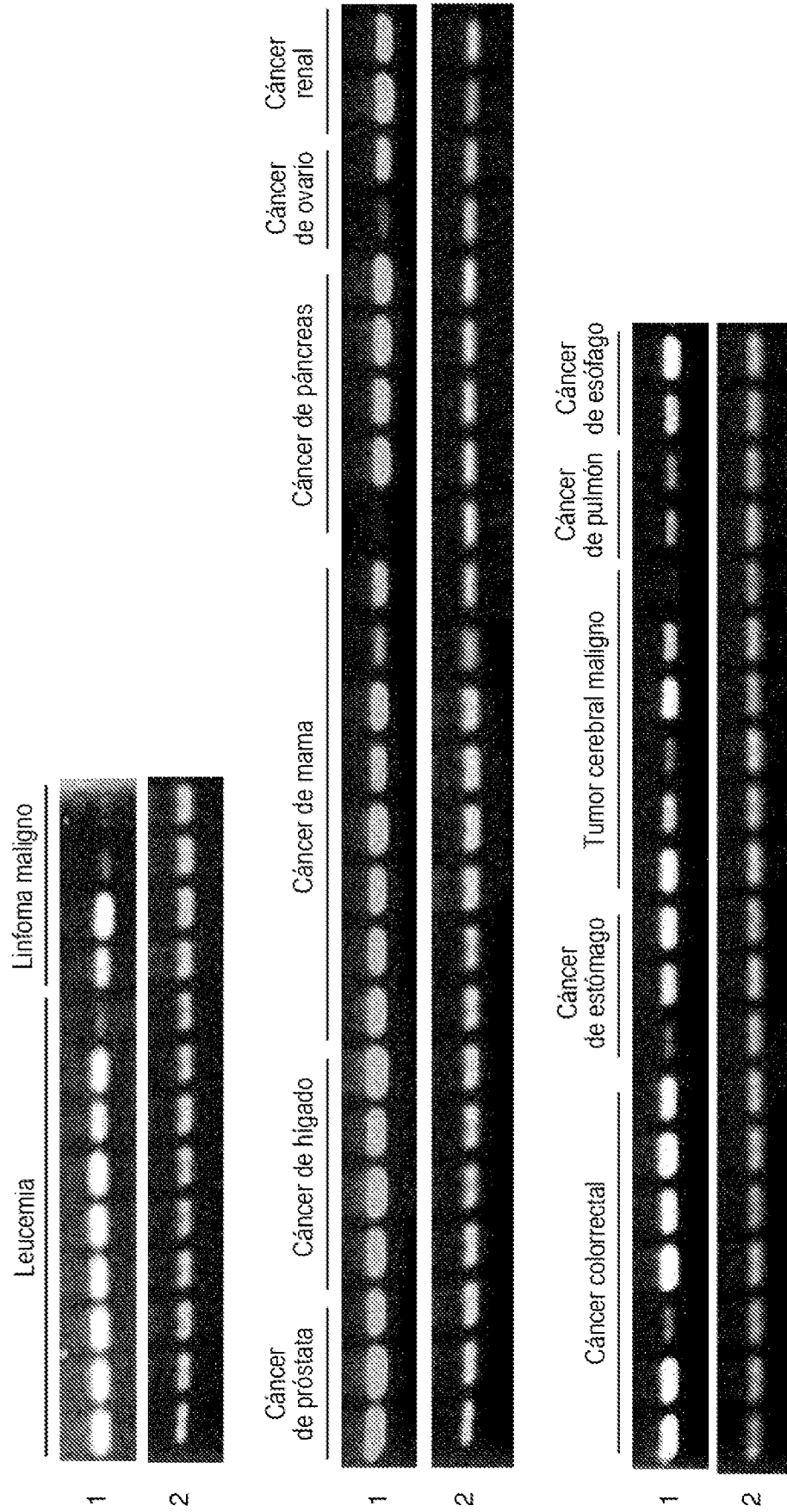


Fig. 2

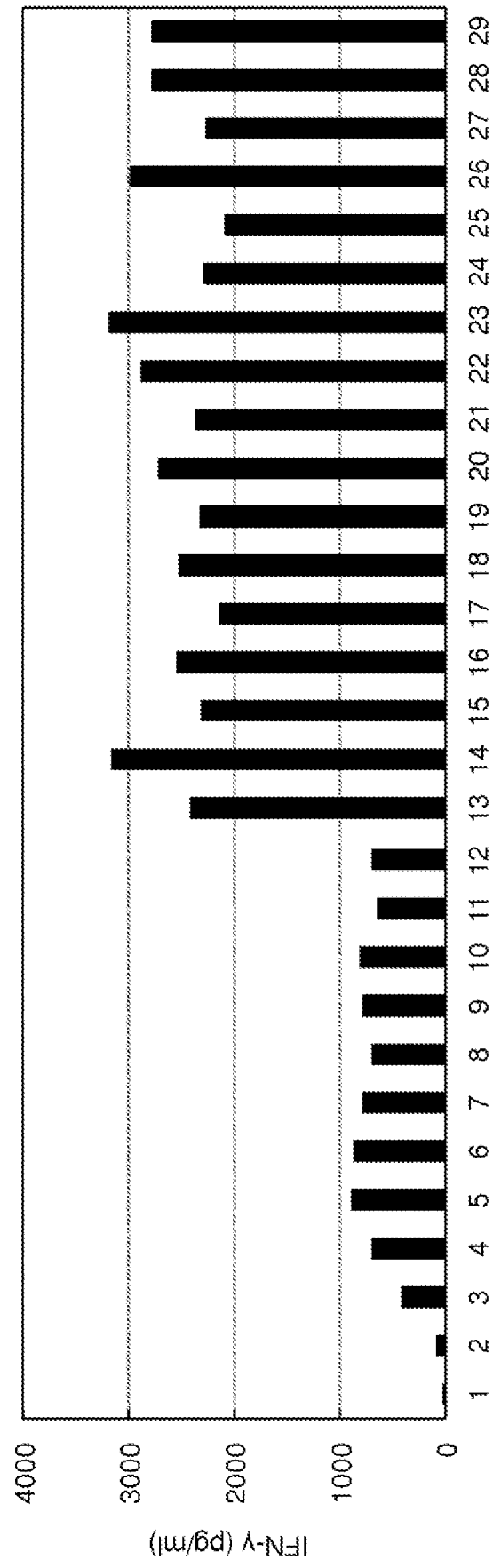


Fig. 3

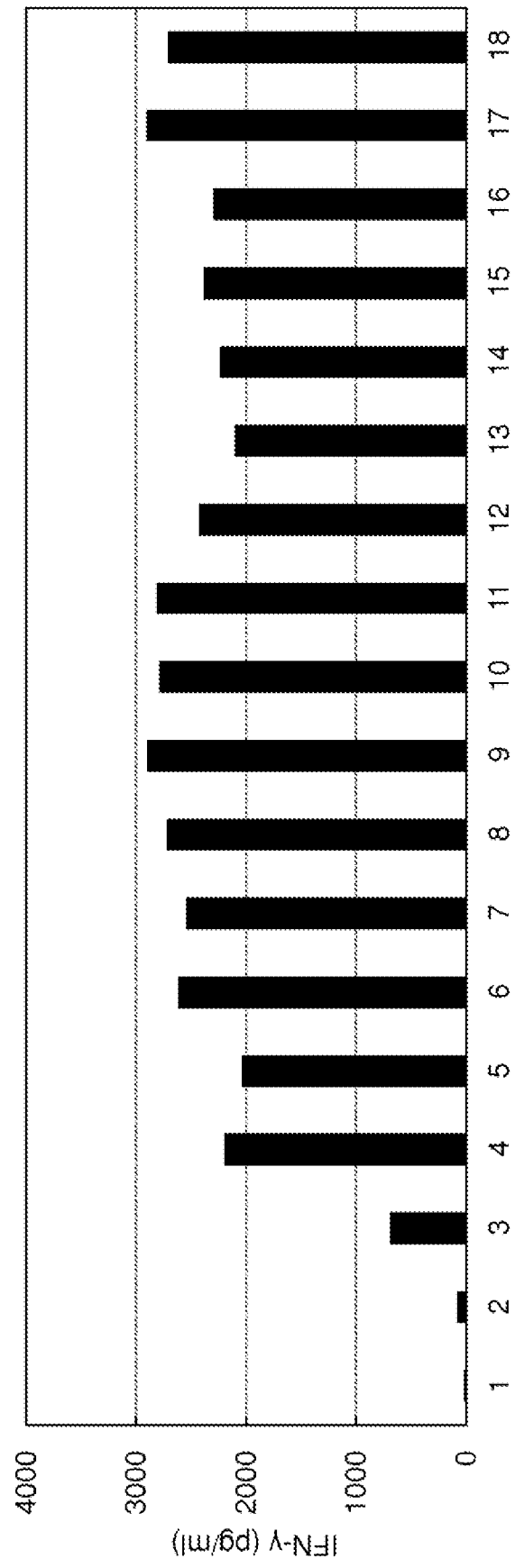


Fig. 4A

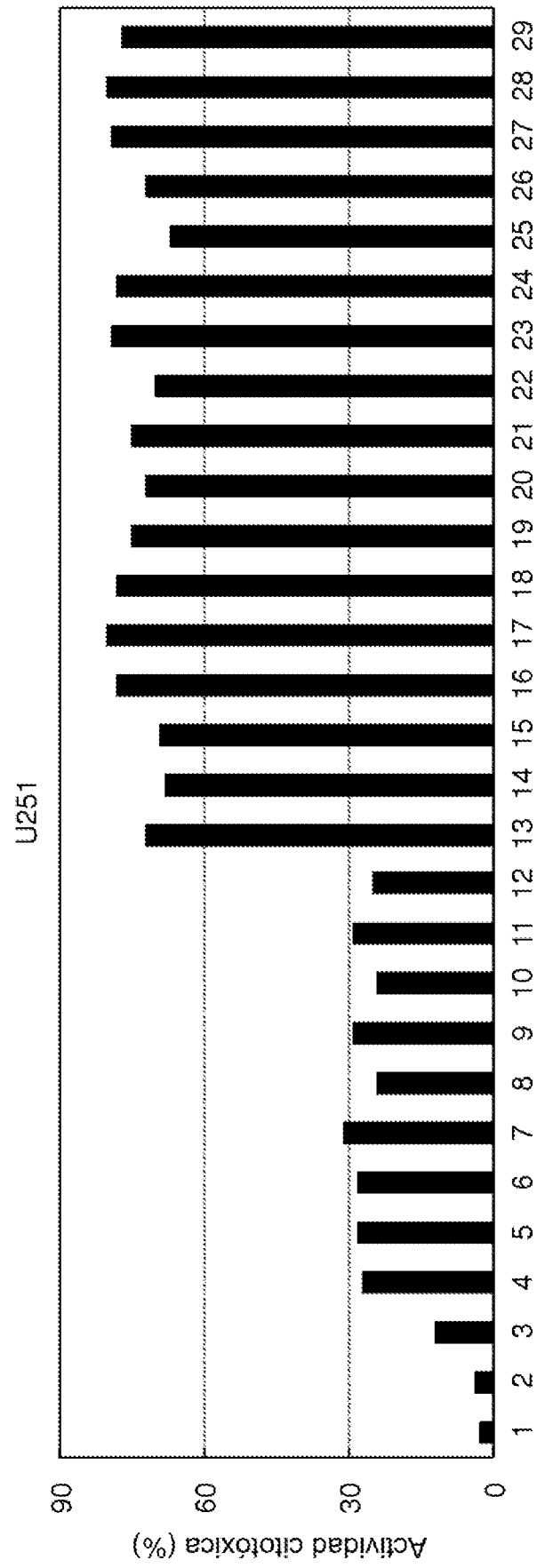


Fig. 4B

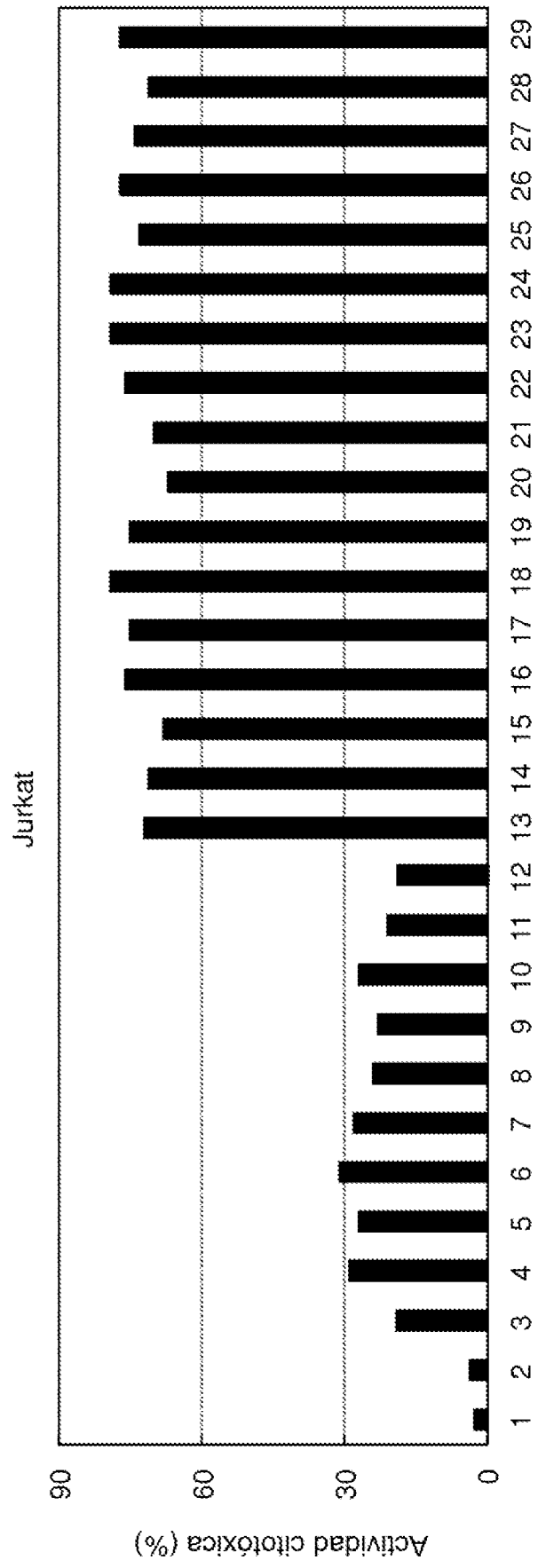


Fig. 5A

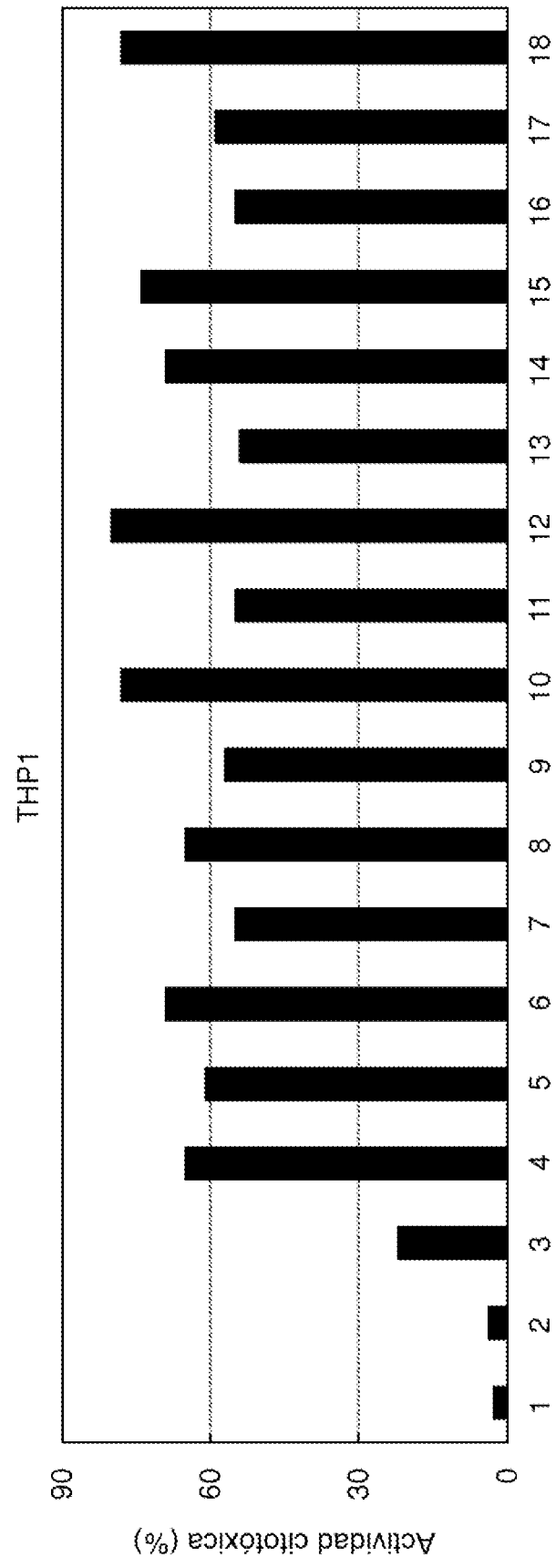


Fig. 5B

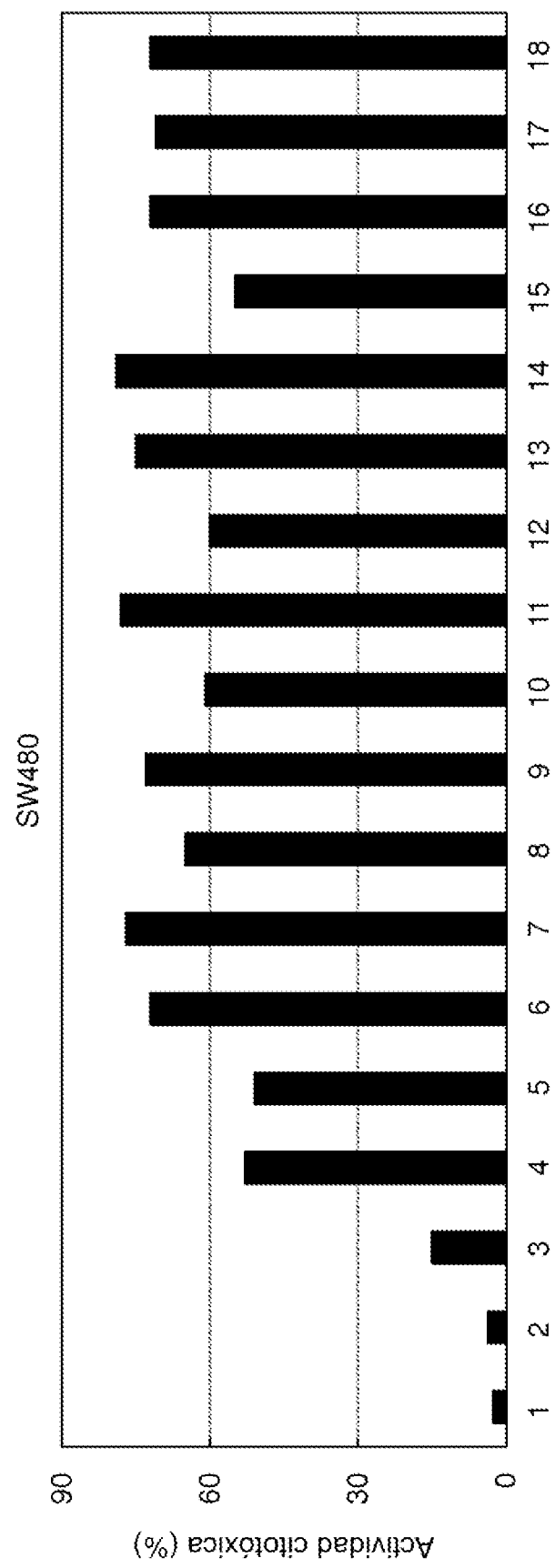


Fig. 6

