

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 834**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06	(2006.01) C12N 5/0786	(2010.01)
A61K 31/7088	(2006.01) C12N 5/10	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01) C12N 15/09	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01) C12Q 1/02	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01) G01N 33/15	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01) G01N 33/50	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)	
C07K 16/18	(2006.01)	
C12N 5/0783	(2010.01)	
C12N 5/0784	(2010.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015 PCT/JP2015/071839**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16021510**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015 E 15829303 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2021 EP 3178837**

54 Título: **Péptido derivado de URLC10 y vacuna que contiene el mismo**

30 Prioridad:

04.08.2014 JP 2014158925

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TSUNODA, TAKUYA;
OSAWA, RYUJI;
YAMASHITA, SACHIKO;
WATANABE, TOMOHISA y
HIKICHI, TETSURO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 856 834 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptido derivado de URLC10 y vacuna que contiene el mismo

[Campo Técnico]

5 La presente invención se refiere al campo de la ciencia biológica, más específicamente al campo de la terapia del cáncer. En particular, la presente invención se refiere a nuevos péptidos que son muy eficaces como vacunas para el cáncer, a métodos para cualquiera o ambos del tratamiento y la prevención de tumores usando el péptido o los péptidos y a composiciones farmacéuticas que comprenden el péptido o los péptidos.

10 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Japonesa Nº 2014-158925 presentada el 4 de agosto de 2014.

[Especialidad Anterior]

15 Se ha observado que los linfocitos T citotóxicos (CTLs) reconocen péptidos epitópicos derivados de los antígenos asociados a tumores (TAAs) encontrados en la molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I, y a continuación destruyen las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia de antígenos del melanoma (MAGE), se han descubierto muchos otros TAAs a través de enfoques inmunológicos (NPL1: Boon T, Int J Cancer 8 de mayo de 1993, 54(2): 177-80; NPL2: Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1 de marzo de 1996, 183(3): 725-9). Algunos de estos TAAs se están sometiendo actualmente a desarrollo clínico como dianas inmunoterapéuticas.

20 En varios de estos TAAs, se identifican péptidos epitópicos que pueden ser reconocidos por CTLs y se anticipa su aplicación en inmunoterapia para diversos tipos de cáncer (NPL3: Harris CC, J Natl Cancer Inst 16 de octubre de 1996, 88(20): 1442-55; NPL4: Butterfield LH y cols., Cancer Res 1 de julio de 1999, 59(13): 3134-42; NPL5: Vissers JL y cols., Cancer Res 1 de noviembre de 1999, 59(21): 5554-9; NPL6: van der Burg SH y cols., J Immunol 1 de mayo de 1996, 156(9) 3308-14; NPL7: Tanaka F y cols., Cancer Res 15 de octubre de 1997, 57(20): 4465-8; NPL8: Fujie T y cols., Int J Cancer 18 de enero de 1999, 80(2): 169-72; NPL9: Kikuchi M y cols., Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81(3): 439-66; NPL10: Oiso M y cols., Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81(3): 387-94). Hasta ahora, se han presentado varios estudios clínicos que usan estos péptidos epitópicos derivados de TAA. Desgraciadamente CTL, muchos de estos ensayos clínicos muestran un bajo grado de respuesta objetiva (NPL11: Belli F y cols., J Clin Oncol 15 de octubre de 2002, 20(20): 4169-80; NPL12: Coulie PG y cols., Immunol Rev octubre de 2002, 188: 33-42; NPL13: Rosenberg SA y cols., Nat Med septiembre de 2004, 10(9): 909-15). Por lo tanto, sigue habiendo una demanda para la
30 identificación de nuevos epítomos de CTL que se puedan usar en inmunoterapia para el cáncer.

URLC10 (complejo de antígenos linfocíticos 6, locus K: que también se describe como LY6K; Número de Registro del GeneBank BC117142 (SEQ ID NO: 36)), se ha identificado como un gen regulado al alza en cáncer de pulmón y
35 cáncer de esófago mediante el análisis del perfil de expresión génica usando una micromatriz de ADNc de genoma completo que contiene 27.648 genes (NPL14: Ishikawa N y cols., Cancer Res. 15 de diciembre de 2007; 67(24): 11601-11; PTL1: documento WO2004/031413; PTL2: documento WO2009/016691). Se ha observado que la expresión de URLC10 está particularmente regulada al alza en 80% o más de células tumorales en pacientes con cáncer de pulmón y cáncer de esófago, y no se expresa en órganos importantes normales además de los testículos. Además, se ha observado que la regulación a la baja mediada por ARNs de la expresión de URLC10 provoca la supresión de la
40 proliferación celular en líneas celulares de cáncer de pulmón y líneas celulares de cáncer de esófago (NPL14 y PTL2).

Recientemente, se han identificado péptidos epitópicos de CTL restringidos a HLA-A24 (NPL15: Suda T y cols., Cancer Sci. 2 de septiembre de 2007; 98(11): 1803-08; PTL3: documento WO2006/090810) y péptidos epitópicos de CTL restringidos a HLA-A2 derivados de URLC10 (PTL4: documento WO2008/102557). Estos péptidos son eficaces en
45 pacientes con cáncer que tienen el tipo HLA-A24 o el tipo HLA-A2, pero no se puede esperar que tengan efecto sobre pacientes con cáncer que no tengan estos tipos de HLA.

[Lista de Citas]

[Bibliografía de Patentes]

50 [PTL 1] Documento WO2004/031413

[PTL 2] Documento WO2009/016691

[PTL 3] Documento WO2006/090810

55 [PTL 4] Documento WO2008/102557

[Bibliografía No Relacionada con las Patentes]

[NPL 1] Boon T, Int J Cancer 8 de mayo de 1993, 54(2):177-80

[NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1 de marzo de 1996, 183(3):725-9

5 [NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 16 de octubre de 1996, 88(20):1442-55

[NPL 4] Butterfield LH y cols., Cancer Res 1 de julio de 1999, 59(13):3134-42

10 [NPL 5] Vissers JL y cols., Cancer Res 1 de noviembre de 1999, 59(21):5554-9

[NPL 6] van der Burg SH y cols., J Immunol 1 de mayo de 1996, 156(9):3308-14

[NPL 7] Tanaka F y cols., Cancer Res 15 de octubre de 1997, 57(20):4465-8

15 [NPL 8] Fujie T y cols., Int J Cancer 18 de enero de 1999, 80(2):169-72

[NPL 9] Kikuchi M y cols., Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81(3):459-66

20 [NPL 10] Oiso M y cols., Int J Cancer 5 de mayo de 1999, 81(3):387-94

[NPL 11] Belli F y cols., J Clin Oncol 15 de octubre de 2002, 20(20):4169-80

[NPL 12] Coulie PG y cols., Immunol Rev octubre de 2002, 188:33-42

25 [NPL 13] Rosenberg SA y cols., Nat Med septiembre de 2004, 10(9):909-15

[NPL 14] Ishikawa N y cols., Cancer Res. 15 de diciembre de 2007;67(24):11601-11

30 [NPL 15] Suda T y cols., Cancer Sci. 2 de septiembre de 2007;98(11): 1803-08

Sumario de la Invención

La presente invención se refiere a péptidos que pueden inducir CTLs específicos para células que expresan URLC10. Cuando estos péptidos son presentados sobre células que presentan antígenos (APCs) por el antígeno leucocitario humano (HLA), se inducen CTLs que muestran una actividad citotóxica específica contra células que expresan URLC10. Los péptidos derivados de URLC10 que se ha identificado hasta ahora que tienen capacidad inductora de CTL (inducibilidad de CTL) son péptidos bien restringidos a HLA-A2 o bien restringidos a HLA-A24, y no pueden inducir CTLs contra células que no expresen estos HLA. Por lo tanto, los péptidos convencionales no son adecuados para realizar inmunoterapia en sujetos que no tengan estos HLA. HLA-A11 es un alelo comúnmente observado en asiáticos (Sette A, Sidney J., Immunogenetics 1999, 50: 201-12) y HLA-A03 es un alelo comúnmente observado en caucásicos (Cao y cols., Hum Immunol 2001; 62(9): 1009-30). Es deseable administrar péptidos restringidos a HLA-A11 a sujetos positivos a HLA-A11 y péptidos restringidos a HLA-A03 a sujetos positivos a HLA-A03. De ahí que la presente invención se refiera a péptidos derivados de URLC10 con capacidad inductora de CTL que sean restrictivos para HLA-A11 o HLA-A03. Basándose en los resultados divulgados en la presente, los péptidos de la presente invención han resultado ser péptidos epitópicos que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica contra células que expresen URLC10 y HLA-A11 o HLA-A03.

Por lo tanto, uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar péptidos derivados de URLC10 que puedan inducir CTLs de un modo restrictivo para HLA-A11. Estos péptidos se pueden usar para inducir CTLs *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, o se pueden usar para la administración a los sujetos con el propósito de inducir una respuesta inmunitaria contra células cancerosas que expresan URLC10. Péptidos preferibles son péptidos de menos de 15 aminoácidos que tienen capacidad inductora de células T citotóxicas (CTL) y que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13; péptidos más preferibles son nonapéptidos, decapeptidos o undecapéptidos; y péptidos aún más preferibles son péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13.

Los péptidos de la presente invención abarcan péptidos en los que uno, dos, tres o cuatro aminoácidos están sustituidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 9 y 13, en donde las una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en (i) el segundo aminoácido desde el extremo N se sustituye por treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o tirosina; (ii) el tercer aminoácido desde el extremo N se sustituye por leucina, fenilalanina, tirosina, isoleucina o alanina; (iii) el séptimo

aminoácido desde el extremo N se sustituye por leucina, isoleucina, tirosina, valina o fenilalanina; y (iv) el aminoácido C-terminal se sustituye por lisina o arginina, con la condición de que los péptidos modificados resultantes retengan la capacidad inductora de CTL del péptido original.

5 La presente invención proporciona además polinucleótidos aislados que codifican uno de los péptidos de la presente invención. De forma similar a los péptidos de la presente invención, estos polinucleótidos se pueden usar para inducir APCs con capacidad inductora de CTL, y se pueden administrar a sujetos para inducir una respuesta inmunitaria contra células cancerosas que expresan URLC10.

10 La presente invención también proporciona composiciones que comprenden uno o más tipos de péptidos de la presente invención, uno o más tipos de polinucleótidos que codifican uno o más tipos de péptidos de la presente invención, APCs de la presente invención, exosomas que presentan péptidos de la presente invención, y/o CTLs de la presente invención. Las composiciones de la presente invención son preferiblemente composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar destinadas al uso en el tratamiento y/o la
15 prevención del cáncer, así como la prevención de su recaída posoperatoria. También pueden estar destinadas al uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra el cáncer. Cuando se administra a un sujeto, un péptido de la presente invención se presenta sobre la superficie de una APC, y como resultado se inducen CTLs que se dirigen al péptido. Por lo tanto, otro objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones que induzcan CTLs, en donde las composiciones comprenden uno o más tipos de péptidos de la presente invención, uno o más tipos de polinucleótidos que codifican uno o más tipos de péptidos de la presente invención, APCs de la presente invención y/o exosomas que presentan péptidos de la presente invención.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar métodos *in vitro* o *ex vivo* para inducir APCs que tienen capacidad inductora de CTL, en donde los métodos comprenden una etapa de puesta en contacto de uno o más tipos
25 de péptidos de la presente invención con una APC, o una etapa de introducción de un polinucleótido que codifica un péptido cualquiera de la presente invención en una APC.

La presente invención proporciona además un método *in vitro* para inducir CTLs, que comprende una etapa de cocultivo de una célula T positiva a CD8 con una APC que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención, una etapa de cocultivo de una célula T positiva a CD8 con un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención, o una etapa de introducción en una célula T positiva a CD8 de un vector que comprende un polinucleótido que codifica cada subunidad de un receptor de células T (TCR) capaz de unirse a un péptido de la presente invención presentado por un antígeno HLA sobre una superficie celular. El antígeno HLA en la presente invención es HLA-A11.

35 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar APCs aisladas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención, y que se induce mediante el método *in vitro* o *ex vivo* de inducción de APCs que tienen capacidad inductora de CTL según la presente invención. La presente invención proporciona además CTLs aisladas que se dirigen a un péptido de la presente invención, que es inducido mediante el método *in vitro* de inducción de CTLs según la presente invención. Estas APCs y CTLs se pueden usar en inmunoterapia para cánceres que expresan URLC 10. En la presente invención, el cáncer que se va a someter a inmunoterapia es, por ejemplo, un cáncer presente en pacientes que tienen un homocigoto o heterocigoto de HLA-A11. Esto es, la presente invención proporciona inmunoterapia para cánceres que expresan URLC10 y el antígeno HLA HLA-A11.

45 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para el uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra un cáncer en un sujeto, en donde la composición comprende un péptido o péptidos de la presente invención, un polinucleótido o polinucleótidos que codifican el péptido o los péptidos, una APC o APCs de la presente invención, un exosoma o exosomas que presentan un péptido o péptidos de la presente invención, y/o un CTL o CTLs de la presente invención.

Breve Descripción de los Dibujos

Fig. 1-1: La Fig. 1 consiste en las fotografías (a) a (d) que muestran resultados de un ensayo de inmuoadsorción por puntos con enzimas ligadas (ELISPOT) de interferón (IFN)-gamma en CTLs inducidas usando péptidos derivados de URLC10. En comparación con el control, los CTLs en el Pocillo nº 5 con URLC10-A11-9-98 (SEQ ID NO: 1) (a), el
55 Pocillo nº 4 con URLC10-A11-9-18 (SEQ ID NO: 9) (b) y el Pocillo nº 3 con URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13) (c) mostraban una potente producción de IFN-gamma. En estas fotografías, el recuadro sobre los pocillos muestra que las células procedentes de los pocillos respectivos se propagaban para el establecimiento de líneas de CTL. En contraste, URLC10-A11-10-63 (SEQ ID NO: 12) (d) se muestra como un ejemplo de datos negativos típicos en los que no había producción específica de IFN-gamma. En la figura, "+" muestra producción de IFN-gamma contra células diana impulsadas con un péptido apropiado; y "-" muestra la producción de IFN-gamma contra células diana que no se han impulsado con péptidos.

La Fig. 2 es un gráfico de líneas que muestra los resultados de un ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas (ELISA) de IFN-gamma que confirma la producción de IFN-gamma en líneas de CTL estimuladas con URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13). Este resultado prueba que las líneas de CTL establecidas mediante estimulación con cada uno de los péptidos mostraban una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" muestra la producción de IFN-gamma contra células diana impulsadas con un péptido apropiado; y "-" muestra la producción de IFN-gamma contra células diana que no se han impulsado con péptidos. La relación R/S indica la relación del número de células de la línea CTL (células sensibles) y el número de células de las células diana (células estimuladoras).

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la producción de IFN-gamma en un clon de CTL establecido mediante dilución limitante a partir de la línea de CTL estimulada con URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13). Estos resultados prueban que los clones de CTL establecidos mediante la estimulación con cada uno de los péptidos mostraban una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" muestra la producción de IFN-gamma contra células diana impulsadas con un péptido apropiado; y "-" muestra la producción de IFN-gamma contra células diana que no se han impulsado con péptidos. La relación R/S indica la relación del número de células del clon de CTL (células sensibles) y el número de células de las células diana (células estimuladoras).

La Fig. 4 es un gráfico de líneas que muestra la actividad de CTL específica contra células diana que expresan tanto URLC10 como HLA-A*1101. Se prepararon como el control células COS7 transfectadas bien con HLA-A*1101 o bien con el gen de URLC10 de longitud completa. El clon de CTL establecido usando URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13) demostraba una actividad de CTL específica contra células COS7 transfectadas tanto con URLC10 como con HLA-A*1101 (diamante negro). Por otra parte, no se mostraba una actividad de CTL específica significativa contra células diana transfectadas con uno cualquiera de HLA-A*1101 (triángulo blanco) y URLC10 (círculo blanco).

Fig. 5-1: La Fig. 5 consiste en las fotografías (a) a (o) que muestran resultados de un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma en CTLs inducidos usando péptidos derivados de URLC10. En comparación con el control, los CTLs en el Pocillo nº 2 con URLC 10-A03-9-64 (SEQ ID NO: 5) (a), el Pocillo nº 5 con URLC 10-A03-9-98 (SEQ ID NO: 1) (b), el Pocillo nº 3 con URLC10-A03-9-131 (SEQ ID NO: 6) (c), el Pocillo nº 1 con URLC10-A03-9-127 (SEQ ID NO: 3) (d), el Pocillo nº 6 con URLC10-A03-10-63 (SEQ ID NO: 12) (e), el Pocillo nº 3 con URLC10-A03-10-166 (SEQ ID NO: 22) (f), el Pocillo nº 5 con URLC10-A03-10-126 (SEQ ID NO: 14) (g), el Pocillo nº 1 con URLC10-A03-10-149 (SEQ ID NO: 16) (h), el Pocillo nº 1 con URLC10-A03-10-161 (SEQ ID NO: 18) (i), el Pocillo nº 1 con URLC10-A03-10-143 (SEQ ID NO: 15) (j), el Pocillo nº 2 con URLC 10-A03-10-204 (SEQ ID NO: 27) (k), el Pocillo nº 2 con URLC10-A03-10-183 (SEQ ID NO: 17) (l), el Pocillo nº 1 con URLC10-A03-10-209 (SEQ ID NO: 30) (m) y el Pocillo nº 5 con URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) (n) mostraban una potente producción de IFN-gamma. En estas fotografías, el recuadro sobre los pocillos muestra que las células procedentes de los pocillos respectivos se propagaban para el establecimiento de líneas de CTL. En contraste, URLC10-A03-9-7 (SEQ ID NO: 8) (o) se muestra como un ejemplo de datos negativos típicos en los que no había producción específica de IFN-gamma. En la figura, "+" muestra producción de IFN-gamma contra células diana impulsadas con un péptido apropiado; y "-" muestra la producción de IFN-gamma contra células diana que no se han impulsado con péptidos.

La Fig. 5-2 muestra la continuación de la Fig. 5-1.

La Fig. 6 consiste en los gráficos de líneas (a) y (b) que muestran resultados de ELISA de IFN-gamma que confirman la producción de IFN-gamma en líneas de CTL estimuladas con URLC10-A03-10-166 (SEQ ID NO: 22) (a) o URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) (b). Estos resultados prueban que las líneas de CTL establecidas mediante estimulación con cada uno de los péptidos mostraban una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" muestra la producción de IFN-gamma contra células diana impulsadas con un péptido apropiado; y "-" muestra la producción de IFN-gamma contra células diana que no se han impulsados con péptidos. La relación R/S indica la relación del número de células de la línea de CTL (células sensibles) y el número de células de las células diana (células estimuladoras).

La Fig. 7 consiste en los gráficos de líneas (a) y (b) que muestran la producción de IFN-gamma en clones de CTL establecidos mediante dilución limitante a partir de líneas de CTL estimuladas con URLC10-A03-10-166 (SEQ ID NO: 22) (a) o URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) (b). Estos resultados prueban que los clones de CTL establecidos mediante la estimulación con cada uno de los péptidos mostraban una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, "+" muestra la producción de IFN-gamma contra células diana impulsadas con un péptido apropiado; y "-" muestra la producción de IFN-gamma contra células diana que no se han impulsado con péptidos. La relación R/S indica la relación del número de células del clon de CTL (células sensibles) y el número de células de las células diana (células estimuladoras).

La Fig. 8 es un gráfico de líneas que muestra la actividad de CTL específica contra células diana que expresan tanto URLC10 como HLA-A*0301. Se prepararon como el control células COS7 transfectadas bien con HLA-A*0301 o bien con el gen de URLC10 de longitud completa. El clon de CTL establecido usando URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) demostraba una actividad de CTL específica contra células COS7 transfectadas tanto con URLC10 como con HLA-A*0301 (diamante negro). Por otra parte, no se mostraba una actividad de CTL específica significativa contra células diana transfectadas con uno cualquiera de HLA-A*0301 (triángulo blanco) y URLC10 (círculo blanco).

[Modo para Llevar a cabo la Invención]

Descripción de Realizaciones

Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente se pueden usar en la práctica o las pruebas de realizaciones de la presente invención, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen ahora. Sin embargo, antes de que se describan los presentes materiales y métodos, se entiende que la presente invención no se limita a los tamaños, las conformaciones, las dimensiones, los materiales, las metodologías, los protocolos, etc. particulares descritos en la presente, ya que estos pueden variar según la experimentación y optimización habituales. También se entiende que la terminología usada en la descripción tiene el propósito de describir solamente las versiones o realizaciones particulares, y no está destinada a limitar el alcance de la presente invención que solamente estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

I. Definiciones

Las palabras "un", "uno(a)" y "el(la)" según se usan en la presente significan "al menos uno(a)" a menos que se indique específicamente otra cosa.

Los términos "aislado" y "purificado" usados con relación a una sustancia (por ejemplo, péptido, anticuerpo, polinucleótido o similares) indican que la sustancia no contiene sustancialmente al menos una sustancia que también pueda estar incluida en una fuente natural. Así, un péptido aislado o purificado se refiere a un péptido que no contiene sustancialmente otro material celular, por ejemplo, un carbohidrato, lípido y otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente de células o tejido de la que se deriva el péptido. Cuando el péptido se sintetiza químicamente, un péptido aislado o purificado se refiere a un péptido que no contiene sustancialmente una sustancia precursora u otra sustancia química. La expresión "no contiene sustancialmente un material celular" incluye preparaciones peptídicas en las que el péptido está separado de componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce recombinantemente. Así, un péptido que no contiene sustancialmente un material celular abarca preparaciones peptídicas que contienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% o 5%, 3%, 2% o 1% (basado en el peso seco) de otros materiales celulares. Cuando el péptido se produce recombinantemente, un péptido aislado o purificado no contiene sustancialmente medio de cultivo, lo que abarca preparaciones peptídicas que contienen medio de cultivo en menos de aproximadamente 20%, 10% o 5%, 3%, 2% o 1% (basado en el peso seco) del volumen de la preparación peptídica. Cuando el péptido se sintetiza químicamente, un péptido aislado o purificado no contiene sustancialmente una sustancia precursora u otras sustancias químicas, lo que abarca preparaciones peptídicas que contienen una sustancia precursora u otras sustancias químicas en menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 3%, 2% o 1% (basado en el peso seco) del volumen de la preparación peptídica. Que una preparación peptídica particular sea un péptido aislado o purificado se puede confirmar, por ejemplo, por la aparición de una sola banda después de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) y tinción del gel con Coomassie Brilliant Blue o similar. En una realización preferida, los péptidos y polinucleótidos de la presente invención están aislados o purificados.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan intercambiabilmente en la presente, y se refieren a polímeros de residuos de aminoácido. Estos términos también se aplican a polímeros de aminoácidos no presentes en la naturaleza que comprenden uno o más residuos de aminoácido no presentes en la naturaleza, además de polímeros de aminoácidos presentes en la naturaleza. Aminoácidos no presentes en la naturaleza incluyen análogos de aminoácidos, miméticos de aminoácidos y similares.

El término "aminoácido" según se usa en la presente se refiere a aminoácidos presentes en la naturaleza, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos presentes en la naturaleza. Los aminoácidos presentes en la naturaleza son los codificados por el código genético, así como los modificados después de la traducción en células (p. ej., hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina, etc.). La expresión "análogo de aminoácido" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica (un carbono alfa unido a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) que un aminoácido presente en la naturaleza pero tienen un grupo R modificado o esqueletos modificados (p. ej., homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metioninometilsulfonio, y similares). La expresión "mimético de aminoácido" se refiere a compuestos químicos que tienen estructuras diferentes pero funciones similares que los aminoácidos generales. Los aminoácidos pueden ser bien L-aminoácidos o bien D-aminoácidos, y los péptidos de la presente invención son preferiblemente polímeros de L-aminoácidos.

Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan intercambiabilmente en la presente, y se refieren a un polímero de nucleótidos.

El término "composición" usado en la presente memoria descriptiva está destinado a abarcar productos que incluyen ingredientes especificados en cantidades especificadas, y cualesquiera productos generados directamente o indirectamente a partir de una combinación de ingredientes especificados en las cantidades especificadas. Cuando la

composición es una composición farmacéutica, el término "composición" está destinado a abarcar productos que incluyen un ingrediente o ingredientes activos y un ingrediente o ingredientes inertes, así como cualesquiera productos generados directamente o indirectamente a partir de la combinación, complejación o agregación de cualesquiera dos o más ingredientes, a partir de la disociación de uno o más ingredientes, o a partir de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más ingredientes. Así, las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualesquiera composiciones elaboradas al mezclar compuestos o células de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable. Sin querer limitarse a esto, los términos "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo fisiológicamente aceptable" usados en la presente memoria descriptiva incluyen agentes de carga líquidos o sólidos, diluyentes, excipientes, disolventes y materiales de encapsulación; y significan materiales, composiciones, sustancias o medios farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables.

A menos que se especifique otra cosa, el término "cáncer" se refiere a un cáncer que sobreexpresa el gen URLC10; y ejemplos del mismo incluyen cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, tumor de tejidos blandos y similares, sin limitarse a los mismos. En una realización ejemplar, el "cáncer" es un cáncer que expresa URLC10 y HLA-A11 y/o HLA-A03.

A menos que se especifique otra cosa, los términos "linfocito T citotóxico" y "célula T citotóxica" y "CTL" se usan intercambiamente. A menos que se indique específicamente otra cosa, se refieren a un subgrupo de linfocitos T que pueden reconocer células extrañas (por ejemplo, células tumorales/cancerosas, células infectadas con virus) e inducir la muerte de estas células.

A menos que se especifique otra cosa, el término "HLA-A11" se refiere al tipo HLA-A11 que incluye subtipos tales como HLA-A*1101, HLA-A*1102, HLA-A*1103 y HLA-A*1104.

A menos que se especifique otra cosa, el término "HLA-A03" se refiere al tipo HLA-A03 que incluye subtipos tales como HLA-A*0301, HLA-A*0302 y HLA-A*0305.

En el contexto de un sujeto o paciente, la expresión "el antígeno HLA de un sujeto (o paciente) es HLA-A11" usada en la presente se refiere a que un sujeto o paciente tiene el gen del antígeno HLA-A11 homocigóticamente o heterocigóticamente como la molécula del MHC (complejo principal de histocompatibilidad) Clase I, y que el antígeno HLA-A11 se expresa en las células del sujeto o paciente como el antígeno HLA. De forma similar, la expresión "el antígeno HLA de un sujeto (o paciente) es HLA-A03" usada en la presente se refiere a que un sujeto o paciente tiene el gen del antígeno HLA-A03 homocigóticamente o heterocigóticamente como la molécula del MHC (complejo principal de histocompatibilidad) Clase I y que el antígeno HLA-A03 se expresa como el antígeno HLA en las células del sujeto o paciente.

Siempre que los métodos y las composiciones de la presente invención sean útiles en el contexto del "tratamiento" del cáncer, el tratamiento se considera "eficaz" cuando alcanza ventajas clínicas, por ejemplo, reducción en el tamaño, la extensión o la capacidad metastásica del cáncer, retardo de la progresión del cáncer, alivio de los síntomas clínicos del cáncer, prolongación del período de supervivencia, supresión de la recaída posoperatoria en un sujeto. Cuando el tratamiento se aplica profilácticamente, "eficaz" significa que el tratamiento retarda o previene la formación del cáncer, o previene o alivia síntomas clínicos del cáncer. La eficacia se determina en relación con cualquier método conocido públicamente para diagnosticar o tratar un tipo de tumor específico.

Siempre que los métodos y las composiciones de la presente invención sean útiles en el contexto de la "prevención (profilaxis)" del cáncer, el término "prevención (profilaxis)" incluye en la presente cualquier trabajo que facilite la carga de mortalidad o morbilidad del cáncer. La prevención (profilaxis) se puede llevar a cabo a los "niveles de prevención (profilaxis) primario, secundario y terciario". Mientras que la prevención (profilaxis) primaria evita el desarrollo de una enfermedad, la prevención (profilaxis) a los niveles secundario y terciario abarca la prevención (profilaxis) de la progresión de la enfermedad y la aparición de síntomas, así como trabajos destinados a reducir efectos adversos de la enfermedad existente al restaurar funciones y reducir complicaciones asociadas a la enfermedad. Alternativamente, la prevención (profilaxis) puede incluir el alivio de la gravedad de un trastorno específico, por ejemplo, terapia preventiva extensiva destinada a reducir el crecimiento y la metástasis tumorales.

En el contexto de la presente invención, el tratamiento y/o la prevención (profilaxis) del cáncer y/o la prevención (profilaxis) de su recaída posoperatoria incluyen cualquiera de los casos tales como la inhibición de la proliferación de células cancerosas, la involución o regresión de un tumor, la inducción de remisión y supresión del desarrollo del cáncer, la regresión tumoral, así como la reducción o inhibición de metástasis, la supresión de la recaída posoperatoria del cáncer, y la prolongación del período de supervivencia. El tratamiento y/o la prevención (profilaxis) eficaz del cáncer reducen la mortalidad, mejoran el pronóstico de un individuo con cáncer, reducen los niveles sanguíneos de marcadores tumorales y alivian síntomas detectables asociados con el cáncer. Por ejemplo, el alivio o la mejora de síntomas constituye un tratamiento y/o una prevención (profilaxis) eficaz, e incluye un estado en el que los síntomas sean estables o se alivien en 10%, 20%, 30% o más.

En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere a inmunoglobulinas y sus fragmentos que son específicamente reactivos con una de sus proteínas o péptidos indicados. Un anticuerpo puede incluir anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos fusionados a otras proteínas o radiomarcadores, y fragmentos de anticuerpos. Por otra parte, un "anticuerpo" se usa en la presente en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) formados por dos o más anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos con la condición de que exhiban la actividad biológica deseada. Un "anticuerpo" puede ser anticuerpos de todas las clases (p. ej., IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).

A menos que se especifique otra cosa, los términos técnicos y los términos científicos usados en la presente tienen todos los mismos significados que términos conocidos comúnmente por un experto normal en la especialidad a la que pertenece la presente invención.

II. Péptidos

HLA-A11 es un alelo comúnmente observado en asiáticos (Sette A, Sidney J., Immunogenetics 1999, 50: 201-12), y HLA-A03 es un alelo comúnmente observado en caucásicos (Cao y cols., Hum Immunol 2001; 62(9): 1009-30). Así, se puede proporcionar un método eficaz para tratar cánceres que expresan URLC10 para una gran población de asiáticos al proporcionar péptidos inductores de CTL derivados de URLC 10 restringidos a HLA-A11. Así, la presente invención proporciona péptidos derivados de URLC10 que son capaces de inducir CTLs de un modo restrictivo para HLA-A11.

Los péptidos de la presente invención son péptidos derivados de URLC10 que son capaces de inducir CTLs de un modo restrictivo para HLA-A11. Péptidos capaces de inducir CTLs de un modo restrictivo para HLA-A11 incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13.

CTLs que tienen una actividad citotóxica específica para estos péptidos se pueden establecer mediante la estimulación *in vitro* de células T mediante células dendríticas (DCs) impulsadas con estos péptidos. Los CTLs establecidos muestran una actividad citotóxica específica contra células diana impulsadas con cada uno de los péptidos.

El gen URLC10 se sobreexpresa en células cancerosas tales como células cancerosas en, por ejemplo, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, tumor de tejidos blandos y similares, pero no se expresa en la mayoría de los órganos normales. Así, es una excelente diana para inmunoterapia. Por lo tanto, los péptidos de la presente invención se pueden usar adecuadamente para la inmunoterapia del cáncer. Un péptido preferido es un nonapéptido (un péptido que consiste en 9 residuos de aminoácido), un decapeptido (un péptido que consiste en 10 residuos de aminoácido) o un undecapéptido (un péptido que consiste en 11 residuos de aminoácido), y es más preferiblemente un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13. Por ejemplo, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 es adecuado para la inducción de CTLs que muestran una actividad citotóxica específica contra células que expresan HLA-A11 y URLC10, y se puede usar adecuadamente para la inmunoterapia del cáncer para pacientes positivos a HLA-A11. En una realización más preferida, el péptido de la presente invención es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

Para los péptidos de la presente invención, se puede hacer que un residuo o residuos de aminoácido adicionales se adjunten a la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente invención, con la condición de que los péptidos resultantes retengan la capacidad inductora de CTL del péptido original. El residuo o los residuos de aminoácido adicionales pueden estar compuestos por cualesquiera tipos de aminoácido o aminoácidos, con la condición de que no dificulten la capacidad inductora de CTL del péptido original. Por lo tanto, los péptidos de la presente invención abarcan péptidos que tienen capacidad inductora de CTL, que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13. Estos péptidos tienen menos de 15 aminoácidos. Por lo tanto, si el péptido original es un nonapéptido, el péptido de la presente invención abarca péptidos que tienen una longitud de 10 aminoácidos o una longitud de 11-15 aminoácidos, que se producen al adjuntar un aminoácido o aminoácidos adicionales al péptido. Por otra parte, si el péptido original es un decapeptido y undecapéptido, el péptido de la presente invención abarca péptidos que tienen una longitud de 11-15 aminoácidos y una longitud de 12-15 aminoácidos, respectivamente, que se producen al adjuntar un aminoácido o aminoácidos adicionales al péptido. Un ejemplo preferido de un residuo o residuos de aminoácido adicionales es un residuo o residuos de aminoácido adyacentes a la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente invención en la secuencia de aminoácidos de URLC10 de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID NO: 37). Por lo tanto, los péptidos de la presente invención abarcan péptidos de menos de 15 aminoácidos que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13, y en donde los péptidos son fragmentos peptídicos de URLC10 y tienen capacidad inductora de CTL.

En general, las modificaciones de uno, dos o más aminoácidos en un cierto péptido no afectan a las funciones del péptido, o en algunos casos incluso mejoran las funciones deseadas del péptido original. De hecho, se sabe que los péptidos modificados (es decir, péptidos compuestos por la secuencia de aminoácidos en la que uno, dos o varios

residuos de aminoácido se modifican (es decir, se sustituyen, se eliminan, se insertan y/o se añaden) en comparación con la secuencia de referencia original) retienen la actividad biológica del péptido original (Mark y cols., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland y cols., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13). Así, en una realización, los péptidos de la presente invención pueden ser

5 péptidos de menos de 15 aminoácidos que comprenden la secuencia de aminoácidos en la que uno, dos, tres o cuatro aminoácidos están sustituidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13 y que tienen capacidad inductora de CTL; en donde las una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en (i) el segundo aminoácido desde el extremo N se sustituye por treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o tirosina; (ii) el tercer aminoácido desde el extremo N se sustituye por leucina, fenilalanina,

10 tirosina, isoleucina o alanina; (iii) el séptimo aminoácido desde el extremo N se sustituye por leucina, isoleucina, tirosina, valina o fenilalanina; y (iv) el aminoácido C-terminal se sustituye por lisina o arginina.

Un experto en la especialidad puede identificar qué sustituciones individuales en una secuencia de aminoácidos que alteran un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos tienden a dar como resultado la conservación de

15 las propiedades de la cadena o las cadenas de aminoácidos originales. Según esto, aquellas se denominan frecuentemente "sustituciones conservativas" o "modificaciones conservativas"; y la modificación de una proteína mediante "sustitución conservativa" o "modificación conservativa" puede dar como resultado una proteína modificada que tiene funciones similares que la proteína original. Tablas de sustituciones conservativas que presentan aminoácidos funcionalmente similares son conocidas en la especialidad. Ejemplos de características de cadenas de

20 aminoácidos que se asemejan funcionalmente incluyen, por ejemplo, aminoácidos hidrófobos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrófilos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene un grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene un átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene ácido carboxílico y amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene base (R, K, H); y una cadena lateral

25 que contiene un grupo aromático (H, F, Y, W). Además, cada uno de los ocho grupos siguientes contiene aminoácidos que son aceptados en la especialidad como sustituciones conservativas entre sí:

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

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

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

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

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

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

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

8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, p. ej., Creighton, Proteins 1984).

35 Con la condición de que un péptido retenga la capacidad inductora de CTL de un péptido original, se puede modificar (es decir, sustituir, eliminar, insertar y/o añadir) un pequeño número (por ejemplo, 1, 2 o varios) o un pequeño porcentaje de aminoácidos. En la presente, el término "varios" significa 5 o menos aminoácidos, por ejemplo, 4 o 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos que se va a modificar es preferiblemente 20% o menos, más preferiblemente 15% o menos, aún más preferiblemente 10% o menos o de 1 a 5%.

40 Cuando se usan en el contexto de la inmunoterapia, los péptidos de la presente invención se deben presentar sobre la superficie de una célula o un exosoma, preferiblemente como un complejo con un antígeno HLA. Por lo tanto, es preferible que los péptidos de la presente invención posean un alta afinidad de unión al antígeno HLA.

45 Por ejemplo, en péptidos que tienen afinidad de unión para HLA Clase I, el segundo aminoácido desde el extremo N y el aminoácido C-terminal son generalmente residuos de anclaje en la unión a HLA Clase I (Rammensee HG, y cols., Immunogenetics. 1995; 41(4): 178-228.). Por ejemplo, para HLA-A11, treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina y tirosina para el segundo aminoácido desde el extremo N, y lisina y arginina para el aminoácido C-terminal se conocen como residuos de anclaje con alta afinidad de unión para HLA-A11 (Falk, y cols., Immunogenetics 1994, 40: 232-

50 41; Chujoh, y cols., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9). Además, en HLA-A11, existen residuos de anclaje auxiliares en las posiciones 3 y 7 desde el extremo N; y se sabe que la leucina, fenilalanina, tirosina, isoleucina y alanina se prefieren como el tercer aminoácido desde el extremo N, y que la leucina, isoleucina, tirosina, valina y fenilalanina se prefieren como el séptimo aminoácido desde el extremo N (Falk, y cols., Immunogenetics 1994, 40: 232-41; Chujoh, y cols., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9). Así, para mantener o mejorar la afinidad de unión a HLA-A11, existe una posibilidad

de que sea deseable sustituir el segundo aminoácido desde el extremo N por treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o tirosina, y/o sustituir el aminoácido C-terminal por lisina o arginina. Además, existe una posibilidad de que también sea deseable sustituir el tercer aminoácido desde el extremo N por leucina, fenilalanina, tirosina, isoleucina o alanina, y/o sustituir el séptimo aminoácido desde el extremo N por leucina, isoleucina, tirosina, valina o fenilalanina. Así, péptidos con capacidad inductora de CTL, que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que, en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13, el segundo aminoácido desde el extremo N se sustituye por treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o tirosina; el tercer aminoácido desde el extremo N se sustituye por leucina, fenilalanina, tirosina, isoleucina o alanina; el séptimo aminoácido desde el extremo N se sustituye por leucina, isoleucina, tirosina, valina o fenilalanina; y/o el aminoácido C-terminal se sustituye por lisina o arginina, están abarcados por los péptidos de la presente invención. En una realización preferida, el péptido de la presente invención puede ser un péptido que tiene capacidad inductora de CTL que consista en una secuencia de aminoácidos en la que, en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13, el segundo aminoácido desde el extremo N está sustituido por treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o tirosina; el tercer aminoácido desde el extremo N está sustituido por leucina, fenilalanina, tirosina, isoleucina o alanina; el séptimo aminoácido desde el extremo N está sustituido por leucina, isoleucina, tirosina, valina o fenilalanina; y/o el aminoácido C-terminal está sustituido por lisina o arginina. Esto es, los péptidos de la presente invención abarcan péptidos de menos de 15 aminoácidos que tienen capacidad inductora de CTL, que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que una o más sustituciones seleccionadas de (a) a (d) posteriores se introducen en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13:

(a) el segundo aminoácido desde el extremo N se sustituye por treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o tirosina;

(b) el tercer aminoácido desde el extremo N se sustituye por leucina, fenilalanina, tirosina, isoleucina o alanina;

(c) el séptimo aminoácido desde el extremo N se sustituye por leucina, isoleucina, tirosina, valina o fenilalanina; y

(d) el aminoácido C-terminal se sustituye por lisina o arginina.

En una realización preferida, el péptido de la presente invención puede ser un péptido que tiene capacidad inductora de CTL que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que una o más sustituciones seleccionadas de (a) a (d) anteriormente se introducen en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13. En la presente invención, el número preferido de sustituciones es 1, 2, 3 o 4 sustituciones seleccionadas de (a) a (d) anteriormente.

El péptido de la presente invención puede ser un péptido de menos de 15 aminoácidos que tiene capacidad inductora de CTL, que comprende una secuencia de aminoácidos en la que, en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13, el segundo aminoácido desde el extremo N se sustituye por treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o tirosina, y/o el aminoácido C-terminal se sustituye por lisina o arginina. Preferiblemente, el péptido de la presente invención puede ser un péptido de menos de 15 aminoácidos que tiene capacidad inductora de CTL, que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que, en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13, el segundo aminoácido desde el extremo N está sustituido por treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o tirosina, y/o el aminoácido C-terminal está sustituido por lisina o arginina. Esto es, el péptido de la presente invención puede ser un péptido de menos de 15 aminoácidos que tiene capacidad inductora de CTL, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o dos sustituciones seleccionadas de (a) y (b) posteriormente en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13:

(a) el segundo aminoácido desde el extremo N se sustituye por treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o tirosina; y

(b) el aminoácido C-terminal se sustituye por lisina o arginina.

En una realización preferida, el péptido de la presente invención puede ser un péptido de menos de 15 aminoácidos que tiene capacidad inductora de CTL, que consiste en una secuencia de aminoácidos en la que una o dos sustituciones seleccionadas de (a) a (b) anteriormente se introducen en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13. En una realización más preferida, el segundo aminoácido desde el extremo N se sustituye por treonina, valina, isoleucina o leucina.

La presente invención también contempla que se puedan añadir uno, dos o varios aminoácidos al extremo N y/o el extremo C de los péptidos de la presente invención (por ejemplo, péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13). Estos péptidos modificados que retienen capacidad inductora de CTL también se incluyen en la presente invención. Por ejemplo, cuando un péptido en el que uno, dos o varios aminoácidos se añaden al extremo N y/o el extremo C de un péptido que consiste en la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 13 se pone en contacto con una APC o APCs, se incorpora en la APC o las APCs y se procesa para convertirse en un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. A continuación, puede inducir CTLs a través de la presentación sobre la superficie celular de una APC a través de la ruta de presentación de antígeno. Más específicamente, los péptidos de la presente invención pueden ser péptidos en los que uno, dos o varios aminoácidos se añaden a cualquiera o ambos del extremo N y el extremo C.

Sin embargo, cuando la secuencia de aminoácidos de un péptido es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, se pueden inducir efectos secundarios tales como trastornos autoinmunitarios y/o síntomas alérgicos frente a sustancias específicas. Por lo tanto, es preferible realizar búsquedas de homología usando bases de datos disponibles para evitar situaciones en las que la secuencia de aminoácidos del péptido coincida con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando se desprende de las búsquedas de homología que no existe un péptido con tan poco como 1 o 2 diferencias de aminoácidos en comparación con el péptido objetivo, el péptido objetivo se puede modificar a fin de incrementar su afinidad de unión con antígenos HLA y/o incrementar su capacidad inductora de CTL sin el peligro de estos efectos secundarios.

Se predice que los péptidos en los que uno, dos o varios aminoácidos de un péptido de la presente invención están modificados serán capaces de retener la capacidad inductora de CTL del péptido original; sin embargo, es preferible verificar la capacidad inductora de CTL de los péptidos modificados. En la presente, el "péptido que tiene capacidad inductora de CTL (inducibilidad de CTL)" se refiere a un péptido que induce CTLs a través de APCs estimuladas con el péptido. "Inducción de CTL" incluye la inducción de la diferenciación en CTLs, la inducción de la activación de CTL, la inducción de la proliferación de CTL, la inducción de la actividad citotóxica de CTL, la inducción de la disolución de células diana mediada por CTL y la inducción del incremento de la producción de IFN-gamma de CTLs.

La capacidad inductora de CTL se puede confirmar al inducir y estimular APCs que retienen un antígeno HLA (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas) con un péptido, y mezclarlo con células T positivas a CD8; y a continuación medir IFN-gamma liberado por CTLs contra las células diana. Para las APCs, se pueden usar preferiblemente células dendríticas derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana. Como un sistema de reacción, se pueden usar animales transgénicos generados para expresar un antígeno HLA. Alternativamente, por ejemplo, las células diana se pueden radiomarcarse con ^{51}Cr o similares, y la actividad citotóxica de los CTLs inducidos por péptido se puede calcular a partir de la radiactividad emitida desde las células diana. Alternativamente, en presencia de APCs estimuladas por péptido, es posible evaluar la capacidad inductora de CTL al medir el IFN-gamma producido y liberado por CTLs, y visualizar la zona de inhibición sobre el medio usando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

En la presente, el péptido de la presente invención también se describe como un "péptido o péptidos de URLC10" o un "polipéptido o polipéptidos de URLC10".

III. Preparación de péptidos de la presente invención

Se pueden usar técnicas muy conocidas para preparar péptidos de la presente invención. Por ejemplo, se puede usar tecnología de ADN recombinante o síntesis química para preparar péptidos de la presente invención. Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar individualmente, o como polipéptidos más largos que incluyen dos o más péptidos. Los péptidos de la presente invención se pueden aislar de células hospedadoras o productos de la reacción de síntesis después de que se produzcan en las células hospedadoras usando tecnología de ADN recombinante o después de que se sintetizen químicamente. Esto es, los péptidos de la presente invención se pueden purificar o aislar de modo que no contengan sustancialmente otras proteínas de la célula hospedadora y sus fragmentos, o cualesquiera otras sustancias.

Los péptidos de la presente invención pueden contener modificaciones, tales como glicosilación, oxidación de cadenas laterales o fosforilación con la condición de que estas modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Otras modificaciones ilustrativas incluyen la incorporación de D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácidos que se puedan usar, por ejemplo, para incrementar la semivida en suero de los péptidos.

Un péptido de la presente invención se puede obtener a través de síntesis química basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Ejemplos de métodos de síntesis de péptidos convencionales que se pueden adaptar a la síntesis incluyen los métodos descritos en los documentos posteriores:

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

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

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

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

(v) "Development of Pharmaceuticals" (en japonés), Continued Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;

(vi) el documento WO99/67288; y

(vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, Solid Phase Peptide Synthesis, Academic Press, Nueva York, 1980, 100-18.

- 5 Alternativamente, los péptidos de la presente invención se pueden obtener adaptando cualesquiera métodos de manipulación genética conocidos para producir péptidos (p. ej., Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (Wu y cols.) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, en primer lugar, se prepara un vector adecuado que aloja un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención en una forma expresable (p. ej., aguas abajo de una secuencia reguladora correspondiente a una secuencia promotora) y se transforma en una célula hospedadora adecuada. A continuación, la célula hospedadora se cultiva para producir el péptido de la presente invención. El péptido de la presente invención también se puede producir *in vitro* usando un sistema de traducción *in vitro*.

IV. Polinucleótidos

- 15 La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica cualquiera de los péptidos de la presente invención. Estos incluyen polinucleótidos derivados del gen URLC10 presente en la naturaleza (p. ej., N° de Registro de GenBank BC_117142 (SEQ ID NO: 36)) así como los que tienen una de sus secuencias nucleotídicas modificadas conservativamente. En la presente, la expresión "secuencia nucleotídica modificada conservativamente" se refiere a secuencias que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. A modo de ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Así, en cualquier posición en la que una alanina esté especificada por un codón, el codón se puede alterar por cualquiera de los codones correspondientes descritos anteriormente sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones del ácido nucleico son "variaciones sinónimas", que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Cualquier secuencia de ácido nucleico de la presente que codifica un péptido también describe cualquier posible variación sinónima del ácido nucleico. Un experto normal identificará que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) se puede modificar para dar una molécula funcionalmente idéntica. Según esto, cada variación sinónima de un ácido nucleico que codifica un péptido se describe implícitamente en cada secuencia divulgada.

- 30 El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto por ARN, ADN y sus derivados. Un ADN está compuesto adecuadamente por bases tales como A, T, C y G, y T está reemplazado por U en un ARN.

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

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

50 V. Exosomas

- La presente invención emplea además vesículas intracelulares, denominadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de la presente invención y antígenos HLA sobre su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, usando los métodos detallados en los documentos JPH11-510507 y WO99/03499, y se pueden preparar usando APCs obtenidas de pacientes que se someten a tratamiento y/o prevención (profilaxis). Los exosomas empleados según la presente invención se pueden inocular como vacunas, de un modo similar a los péptidos de la presente invención.

El tipo de los antígenos HLA incluidos en los complejos descritos anteriormente debe coincidir con los del sujeto que necesita el tratamiento y/o la prevención (profilaxis). Por ejemplo, HLA-A11 (por ejemplo, HLA-A*1101) es un alelo observado ampliamente y generalmente en poblaciones asiáticas, y se considera que es adecuado para el tratamiento en pacientes asiáticos. Típicamente en la práctica clínica, es posible seleccionar un péptido apropiado que tiene un alto nivel de afinidad de unión para un antígeno HLA específico o que tiene capacidad inductora de CTL mediante presentación de antígeno mediada por un antígeno HLA específico, al estudiar por adelantado el tipo de antígeno HLA del paciente que necesite el tratamiento.

Los exosomas empleados según la presente invención presentan sobre su superficie un complejo de un péptido de la presente invención y HLA-A11. El péptido de la presente invención es preferiblemente un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOS: 1, 9 y 13, y más preferiblemente un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOS: 1, 9 y 13.

VI. Células que presentan antígeno (APCs)

La presente invención proporciona además APCs que presentan sobre su superficie complejos formados entre antígenos HLA y péptidos de la presente invención. Alternativamente, la presente invención proporciona APCs que tienen sobre su superficie celular complejos formados entre antígenos HLA y péptidos de la presente invención. Las APCs de la presente invención pueden ser APCs aisladas. Cuando se use en el contexto de células (APCs, CTLs, etc.), el término "aisladas" significa que las células están separadas de otro tipo de células. Las APCs de la presente invención pueden ser APCs inducidas a partir de APCs derivadas del paciente que se va a someter a tratamiento y/o prevención (profilaxis), y se pueden administrar como una vacuna por sí mismas o en combinación con otros fármacos incluyendo un péptido o péptidos, un exosoma o exosomas o un CTL o CTLs de la presente invención.

Las APCs de la presente invención no se limitan a tipos de células específicos, e incluyen células que se sabe que presentan antígenos proteínicos sobre su superficie celular de modo que sean reconocidas por linfocitos, por ejemplo, células dendríticas (DCs), células de Langerhans, macrófagos, células B, y células T activadas. Puesto que la DC es una APC representativa que tiene la actividad inductora de CTL más fuerte entre las APCs, las DCs se pueden usar preferiblemente como las APCs de la presente invención. En la presente invención, la DC preferible es una DC aislada derivada de un ser humano. Además, las APCs de la presente invención pueden ser mezclas de múltiples tipos de células que tienen una función de presentación de antígeno y pueden ser mezclas de APCs cada una de las cuales presenta diferentes tipos de los péptidos de la presente invención.

Por ejemplo, las APCs de la presente invención se pueden obtener *in vitro* al poner en contacto APCs recogidas de un sujeto con un péptido de la presente invención.

A fin de inducir una respuesta inmunitaria contra células cancerosas que expresan URLC10 en un sujeto, las APCs de la presente invención se pueden administrar al sujeto por sí mismas o en combinación con otros fármacos incluyendo un péptido o péptidos, un exosoma o exosomas o un CTL o CTLs de la presente invención.

Las APCs de la presente invención obtenidas mediante un método tal como el descrito anteriormente tienen capacidad inductora de CTL. El término "capacidad inductora de CTL (inducibilidad de CTL)" usado en el contexto de una APC o APCs se refiere a la capacidad de la APC para ser capaz de inducir un CTL o CTLs cuando se ponen en contacto con una célula o células T positivas a CD8. Además, la "capacidad inductora de CTL (inducibilidad de CTL)" incluye la capacidad de una APC para inducir la activación de CTL, la capacidad de una APC para inducir la proliferación de CTL, la capacidad de una APC para facilitar la disolución de células diana mediada por CTL, y la capacidad de una APC para incrementar la producción de IFN-gamma mediada por CTL. El CTL o los CTLs inducidos por la APC de la presente invención son un CTL o CTLs específicos para URLC10 y demuestran una actividad citotóxica específica contra células que expresan URLC10.

Además del método descrito anteriormente, las APCs de la presente invención se pueden preparar al introducir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en APCs *in vitro*. El polinucleótido que se va a introducir puede estar en la forma de ADN o ARN. El método de introducción no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen diversos métodos realizados convencionalmente en la especialidad tales como lipofección, electroporación y el método del fosfato cálcico. Más específicamente, se pueden usar los métodos descritos en Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72 y el documento JP2000-509281.

Al introducir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en una APC, el polinucleótido se transcribe y se traduce en la célula, y a continuación el péptido producido se procesa mediante MHC Clase I y avanza a través de una ruta de presentación para presentar el péptido de la presente invención sobre la superficie celular de la APC.

La APC de la presente invención es una APC que presenta sobre su superficie un complejo formado entre un péptido de la presente invención y HLA-A11 (más preferiblemente HLA-A*1101). El péptido de la presente invención es preferiblemente un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOS: 1, 9 y 13, y

más preferiblemente un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13.

5 La APC o las APCs de la presente invención es una APC o APCs inducidas mediante un método que comprende una etapa descrita (a) o (b) posteriormente:

(a) poner en contacto una APC o APCs que expresan HLA-A11 (más preferiblemente HLA-A*1101) con un péptido de la presente invención; o

(b) introducir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en una APC o APCs que expresan HLA-A11 (más preferiblemente HLA-A*1101).

10 El péptido de la presente invención que se va a poner en contacto con la APC o las APCs que expresan HLA-A11 es preferiblemente un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13, y más preferiblemente un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13.

VII. Linfocitos T citotóxicos (CTLs)

15 El CTL inducido por un péptido de la presente invención se puede usar como una vacuna de un modo similar al péptido de la presente invención para mejorar una respuesta inmunitaria que se dirige a una célula que expresa URLC10 *in vivo*. Así, la presente invención proporciona CTLs que son inducidos o activados por un péptido de la presente invención. Los CTLs de la presente invención son CTLs que se dirigen a un péptido de la presente invención, son capaces de unirse a un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA, y son inducidos mediante el método *in vitro* de inducción de un CTL o CTLs según la presente invención. La unión de un CTL al complejo está mediada a través de un receptor de células T (TCR) presente sobre la superficie celular del CTL. Los CTLs de la presente invención pueden ser CTLs aislados. Los CTLs preferibles son CTLs aislados de origen humano. Los CTLs de la presente invención pueden ser mezclas de CTLs cada uno de los cuales se dirige a diferentes tipos de péptidos de la presente invención.

20 Los CTLs de la presente invención se pueden obtener al (1) poner en contacto *in vitro* células T positivas a CD8 con APCs o exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención, o (2) introducir en células T positivas a CD8 un vector que comprende un polinucleótido que codifica cada subunidad de un receptor de células T (TCR) capaz de unirse a un péptido de la presente invención presentado sobre la superficie celular a través de un antígeno HLA. Los exosomas y las APCs usados en el método de (1) anterior se pueden preparar mediante métodos descritos en las secciones "V. Exosomas" y "VI. Células que presentan antígeno (APCs)", respectivamente, y los detalles del método de (2) anterior se describirán en la sección "VIII. Receptor de células T (TCR)".

35 Los CTLs de la presente invención pueden estar destinados a la administración por sí mismos a pacientes que están sometidos a tratamiento y/o prevención (profilaxis), o en combinación con otros fármacos incluyendo un péptido o péptidos, una APC o APCs o un exosoma o exosomas de la presente invención con propósitos de efectos reguladores. Además, los CTLs de la presente invención pueden ser CTLs inducidos a partir de células T positivas a CD8 derivadas de pacientes que están sometidos a la administración de los CTLs. Los CTLs de la presente invención actúan específicamente sobre células diana que presentan los péptidos de la presente invención, por ejemplo, los mismos péptidos usados para inducir los CTLs de la presente invención. Las células diana pueden ser células que expresan endógenamente URLC10, tales como células cancerosas, o células transfectadas con el gen URLC10. Las células que presentan un péptido de la presente invención sobre su superficie celular debido a la estimulación por el péptido se pueden convertir en una diana de ataque por los CTLs de la presente invención. Las células elegidas como diana por los CTLs de la presente invención son preferiblemente células que son positivas para HLA-A11 (más preferiblemente HLA-A*1101).

50 En una realización preferida, los CTLs de la presente invención se dirigen específicamente a células que expresan tanto URLC10 como HLA-A11 (más preferiblemente HLA-A*1101). En la presente invención, las células elegidas como diana por los CTLs pueden ser células que tienen cualquiera de los alelos de HLA-A11 homocigóticamente o heterocigóticamente.

55 En la presente, que el CTL "se dirige a" células se refiere al reconocimiento por el CTL de células que presentan sobre su superficie celular un complejo de HLA y un péptido de la presente invención y la demostración de una actividad citotóxica contra las células. Además, "se dirige específicamente a" se refiere a que los CTLs demuestran una actividad citotóxica contra esas células, pero no muestran una actividad dañina para otras células. La expresión "reconocen células" usada en el contexto de los CTLs se refiere a la unión a un complejo de HLA y un péptido de la presente invención presentado sobre la superficie celular a través de su TCR, y la demostración de una actividad citotóxica específica contra la célula. Por lo tanto, los CTLs de la presente invención son preferiblemente CTLs que se pueden

unir a través de un TCR a un complejo formado entre un péptido de la presente invención y HLA-A11 (más preferiblemente HLA-A*1101) presentado sobre la superficie celular.

Por otra parte, los CTLs de la presente invención son CTLs inducidos mediante un método que comprende una etapa descrita en (a) o (b) posteriormente:

(a) poner en contacto *in vitro* células T positivas a CD8 con APCs o exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un péptido de la presente invención y HLA-A11; o

(b) introducir en células T positivas a CD8 un polinucleótido que codifica cada subunidad de un TCR capaz de unirse a un péptido de la presente invención presentado sobre la superficie celular mediante HLA-A11 (más preferiblemente HLA-A*1101).

VIII. Receptores de células T (TCRs)

La presente invención también emplea composiciones que comprenden un polinucleótido que codifica cada subunidad de un TCR capaz de unirse a un péptido de la presente invención presentado sobre la superficie celular mediante un antígeno HLA, y métodos de uso de las mismas. El polinucleótido confiere a las células T positivas a CD8 especificidad contra células cancerosas que expresan URLC10 a través de la expresión de un TCR capaz de unirse a un péptido de la presente invención presentado sobre la superficie celular mediante un antígeno HLA. Polinucleótidos que codifican una cadena o cadenas alfa y una cadena o cadenas beta se pueden identificar como las subunidades de TCR del CTL inducido por un péptido de la presente invención al usar métodos conocidos en la especialidad (documento WO2007/032255 y Morgan y cols., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Por ejemplo, los métodos de PCR se prefieren para el análisis de TCR. Sin querer limitarse a esto, los cebadores de PCR para el análisis pueden ser, por ejemplo, un grupo o grupos de cebadores para amplificación al combinar el cebador del lado 5' y el cebador o los cebadores del lado 3' posteriores:

Cebador del lado 5':

Cebador 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (SEQ ID NO: 32)

Cebadores del lado 3':

Específico de la región C de la cadena alfa de TCR

Cebador 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID NO: 33)

Específico de la región C1 de la cadena beta de TCR

Cebador 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatccttctcttgac-3') (SEQ ID NO: 34) o

Específico de la región C2 de la cadena beta de TCR

Cebador 3-TR-beta-C2 (5'-ctagcctctggaatccttctctt-3') (SEQ ID NO: 35)

Los TCRs formados al introducir los polinucleótidos identificados en células T positivas a CD8 pueden unirse con alta afinidad de unión a las células diana que presentan un péptido de la presente invención, y median en la destrucción eficaz de las células diana que presentan un péptido de la presente invención *in vivo* e *in vitro*.

Un polinucleótido que codifica cada subunidad de TCR se puede incorporar en un vector apropiado, por ejemplo, un vector retroviral. Estos vectores son muy conocidos en la especialidad. El polinucleótido o un vector que comprende el mismo en una forma expresable se puede introducir en una célula T positiva a CD8, por ejemplo, una célula T positiva a CD8 derivada de un paciente. Se divulgan composiciones listas para usar que permiten la producción rápida y fácil de células T modificadas que tienen propiedades superiores de destrucción de células cancerosas mediante la modificación rápida de las células T del propio paciente (o células T derivadas de otro sujeto).

En la presente, un TCR específico es un TCR que puede conferir una actividad citotóxica específica contra células diana al reconocer específicamente un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA presentado sobre la superficie de la célula diana cuando el TCR está presente sobre la superficie de una célula T positiva a CD8. El reconocimiento específico del complejo descrito anteriormente se puede confirmar mediante cualquier método conocido, y ejemplos preferibles del mismo incluyen análisis por tinción de multímeros de HLA usando moléculas de HLA y péptidos de la presente invención y métodos de ensayo ELISPOT. El reconocimiento mediado por TCR específico de una célula diana mediante una célula T introducida con el polinucleótido descrito anteriormente y la transducción de señales en la célula se pueden confirmar al llevar a cabo un ensayo ELISPOT. Cuando el TCR descrito

anteriormente está presente sobre la superficie de una célula T positiva a CD8, que el TCR pueda conferir una actividad citotóxica específica de la célula diana contra la célula T positiva a CD8 también se puede confirmar mediante métodos conocidos. Métodos preferibles incluyen, por ejemplo, medir la actividad citotóxica contra células diana mediante un método de ensayo de liberación de cromo o similares.

5 La presente invención proporciona, en el contexto de HLA-A11, CTLs preparados al transformar células T positivas a CD8 con un polinucleótido que codifica cada subunidad de TCR que se une a, por ejemplo, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13.

10 Los CTLs transformados son capaces de buscar un objetivo *in vivo* y se pueden propagar mediante un método de cultivo *in vitro* muy conocido (por ejemplo, Kawakami y cols., J Immunol., 142, 3452-61 (1989)). Los CTLs de la presente invención se pueden usar para formar una composición inmunogénica útil para el tratamiento o la prevención (profilaxis) de una enfermedad en un paciente que necesite el tratamiento o la prevención (profilaxis).

IX. Composiciones farmacéuticas

15 La presente invención proporciona además composiciones o composiciones farmacéuticas, que comprenden al menos un ingrediente activo seleccionado de los posteriores:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en una forma expresable;

(c) una APC de la presente invención;

20 (d) un exosoma de la presente invención; y

(e) un CTL de la presente invención.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender según sea necesario un vehículo o vehículos, un excipiente o excipientes o similares usados comúnmente en farmacia sin limitaciones particulares, además del ingrediente o los ingredientes activos descritos anteriormente. Un ejemplo de un vehículo que se puede usar en una composición farmacéutica de la presente invención incluye agua esterilizada, solución salina fisiológica, tampón de fosfato, un fluido de cultivo y similares. Por lo tanto, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas, que comprenden al menos un ingrediente activo seleccionado de (a) a (e) posteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable:

(a) un péptido de la presente invención;

30 (b) un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en una forma expresable;

(c) una APC de la presente invención;

(d) un exosoma de la presente invención; y

(e) un CTL de la presente invención.

35 Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender, según sea necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos, agentes solubilizantes, ajustadores del pH, inhibidores de la agregación y similares.

40 La expresión de URLC10 se regula al alza significativamente en células cancerosas en comparación con tejidos normales. Así, un péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido se puede usar para tratar y/o prevenir el cáncer y/o prevenir su recaída posoperatoria. Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para tratar y/o prevenir el cáncer y/o prevenir su recaída posoperatoria, que comprenden uno o más tipos de péptidos o polinucleótidos de la presente invención como un ingrediente activo. Alternativamente, se puede hacer que los péptidos de la presente invención estén presentados sobre la superficie de exosomas o APCs para el uso como composiciones farmacéuticas. Además, los CTLs de la presente invención que se dirigen a uno
45 cualquiera de los péptidos de la presente invención también se pueden usar como un ingrediente activo de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención

pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad farmacéuticamente eficaz del ingrediente activo descrito anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden usar como una vacuna. En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" (también llamada "composición inmunogénica") se refiere a una composición que tiene una función de inducir una respuesta inmunitaria que conduce a una acción antitumoral cuando se inocula en un animal. Así, una composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para inducir una respuesta inmunitaria que conduce a una acción antitumoral. La respuesta inmunitaria inducida por un péptido, un polipéptido, una APC, un CTL y una composición farmacéutica de la presente invención no está particularmente limitada con la condición de que sea una respuesta inmunitaria que conduzca a una acción antitumoral, y ejemplos incluyen la inducción de CTLs específicos de células cancerosas y la inducción de una actividad citotóxica específica para células cancerosas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir el cáncer y/o prevenir su recaída posoperatoria en sujetos o pacientes humanos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar preferiblemente para un sujeto positivo para HLA-A11. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar preferiblemente para tratar y/o prevenir cánceres que expresan URLC10 y HLA-A11, y/o prevenir su recaída posoperatoria.

Se divulga un método o procedimiento para fabricar una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer, en donde el método o procedimiento comprende una etapa de formular al menos un ingrediente activo seleccionado de los posteriores con un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en una forma expresable;

(c) una APC que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie;

(d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y

(e) un CTL de la presente invención.

En otro caso, se divulga un método o procedimiento para fabricar una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer, en donde el método o procedimiento comprende una etapa de mezclar un ingrediente activo seleccionado de los posteriores con un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en una forma expresable;

(c) una APC que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie;

(d) un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; y

(e) un CTL de la presente invención.

En la presente invención, los péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13 se identifican como péptidos epitópicos restringidos a HLA-A11 que pueden inducir una respuesta inmunitaria potente y específica. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden al menos un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13 son particularmente adecuados para la administración a un sujeto que tiene HLA-A11 (por ejemplo, HLA-A*1101) como un antígeno HLA. Lo mismo se aplica a composiciones farmacéuticas que comprenden un polinucleótido que codifica cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de la presente invención), una APC o un exosoma que presenta estos péptidos (es decir, las APCs o los exosomas de la presente invención) o un CTL que se dirige a estos péptidos (es decir, los CTLs de la presente invención). Esto es, las composiciones farmacéuticas que comprenden un ingrediente activo en asociación con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13 son adecuadas para la administración a sujetos que tienen HLA-A11 (es decir, sujetos positivos a HLA-A11). En una realización más preferida, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

Los cánceres que van a ser tratados y/o prevenidos por las composiciones farmacéuticas de la presente invención no están particularmente limitados con la condición de que sean cánceres que expresen URLC10, e incluyen cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, tumor de tejidos blandos y similares. Es preferible usar la composición farmacéutica de la presente invención en sujetos que tengan homocigóticamente o heterocigóticamente un alelo HLA-A11.

Además de los ingredientes activos descritos anteriormente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender los otros péptidos que tienen capacidad para inducir CTLs contra células cancerosas (por ejemplo, los otros péptidos inductores de CTL derivados de TAA), los otros polinucleótidos que codifican los otros péptidos, las otras células que presentan los otros péptidos, o similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender opcionalmente las otras sustancias terapéuticas como un ingrediente activo, con la condición de que no inhiban los efectos antitumorales de los ingredientes activos descritos anteriormente tales como péptidos de la presente invención. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender opcionalmente composiciones antiinflamatorias, analgésicos, agentes quimioterapéuticos y similares. Además de incluir las otras sustancias terapéuticas en la propia composición farmacéutica de la presente invención, también se puede administrar la composición farmacéutica de la presente invención secuencialmente o simultáneamente con una o más de otras composiciones farmacéuticas. La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención y las otras composiciones farmacéuticas dependen de, por ejemplo, el tipo de composición farmacéutica usado y la enfermedad que se trate, así como la planificación y las vías de administración.

Se entenderá que considerando el tipo de formulación, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir otros componentes convencionales en la especialidad, además de los ingredientes mencionados específicamente en la presente.

La presente invención también proporciona artículos de fabricación o estuches que comprenden una composición farmacéutica de la presente invención. Los artículos de fabricación o estuches de la presente invención pueden incluir un recipiente que contiene la composición farmacéutica de la presente invención. Un ejemplo de un recipiente apropiado incluye una botella, un vial o un tubo de ensayo, pero no se limita a estos. El recipiente puede estar formado por diversos materiales tales como vidrio o plástico. Una etiqueta puede estar unida al recipiente, y la enfermedad o el estado patológico para el que se debe usar la composición farmacéutica de la presente invención puede estar descrito en la etiqueta. La etiqueta también puede indicar directrices para la administración y similares.

Los artículos de fabricación o estuches de la presente invención pueden comprender además un segundo recipiente que contiene opcionalmente diluyentes farmacéuticamente aceptables, además del recipiente que contiene la composición farmacéutica de la presente invención. Los artículos de fabricación o estuches de la presente invención pueden comprender además los otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y la perspectiva del usuario, tales como los otros tampones, diluyentes, filtros, agujas para inyección, jeringas, prospectos con instrucciones de uso.

Según sea necesario, la composición farmacéutica de la presente invención se puede proporcionar en un envase o dispositivo distribuidor que puede contener una o más unidades de formas de dosificación que contienen ingredientes activos. El envase puede incluir, por ejemplo, una lámina metálica o una lámina de plástico tal como un blíster. Instrucciones para la administración pueden estar unidas al envase o dispositivo distribuidor.

(1) Composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido o péptidos como un ingrediente activo

La composición farmacéutica que comprende un péptido de la presente invención se puede formular mediante métodos de formulación convencionales según sea necesario. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender, según sea necesario, además del péptido de la presente invención, vehículos, excipientes y similares usados comúnmente en farmacia sin limitaciones particulares. Ejemplos de vehículos que se pueden usar en composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua esterilizada (por ejemplo, agua para inyección), solución salina fisiológica, tampón de fosfato, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, glicina al 0,3%, un fluido de cultivo, y similares. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender según sea necesario estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos, agentes solubilizantes, ajustadores del pH, inhibidores de la agregación, y similares. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden inducir inmunidad específica contra células cancerosas que expresan URLC10, y así se pueden aplicar con el propósito del tratamiento o la prevención (profilaxis) del cáncer.

Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar al disolver en vehículos hidrosolubles farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables tales como agua esterilizada (por ejemplo, agua para inyección), solución salina fisiológica, tampón de fosfato, solución salina tamponada con fosfato y solución salina tamponada con Tris y añadir, según sea necesario, estabilizantes, suspensiones, conservantes, tensioactivos, agentes

solubilizantes, ajustadores del pH, inhibidores de la agregación y similares, y a continuación esterilizar la solución de péptido. El método para esterilizar una solución de péptido no está particularmente limitado, y se lleva a cabo preferiblemente mediante esterilización por filtración. La esterilización por filtración se puede realizar usando, por ejemplo, un filtro de esterilización por filtración de 0,22 micrómetros o menos de diámetro de poro. La solución de péptido esterilizada por filtración se puede administrar a un sujeto, por ejemplo, como una inyección, sin limitarse a esto. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar como una formulación liofilizada al liofilizar la solución de péptido descrita anteriormente. La formulación liofilizada se puede preparar al cargar la solución de péptido preparada como se describe anteriormente en un recipiente apropiado tal como una ampolla, un vial o un recipiente de plástico, seguido por liofilización y encapsulación en el recipiente con un tapón de caucho esterilizado por lavado o similar después de la recuperación de la presión. La formulación liofilizada se puede administrar a un sujeto después de que se redisuelva en vehículos hidrosolubles farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables tales como agua esterilizada (por ejemplo, agua para inyección), solución salina fisiológica, tampón de fosfato, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris y similares antes de la administración. Ejemplos preferidos de composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen inyecciones de esta solución de péptido esterilizada por filtración, y las formulaciones liofilizadas que resultan de liofilizar la solución de péptido. La presente invención abarca además estuches que comprenden esta formulación liofilizada y una solución de redisolución. La presente invención también abarca estuches que comprenden un recipiente que contiene la formulación liofilizada, que es una composición farmacéutica de la presente invención, y un recipiente que contiene una solución de redisolución de la misma.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una combinación de dos o más tipos de los péptidos de la presente invención. La combinación de péptidos puede tomar una forma de cóctel de péptidos mixtos, o se pueden conjugar entre sí usando técnicas estándar. Por ejemplo, los péptidos se pueden conectar químicamente o expresar como secuencias de un solo polipéptido de fusión. Al administrar un péptido de la presente invención, el péptido es presentado sobre APCs por un antígeno HLA en una alta densidad, y a continuación, se inducen los CTLs que reaccionan específicamente con un complejo formado entre el péptido presentado y el antígeno HLA. Alternativamente, se extraen APCs (por ejemplo, DCs) de un sujeto, y posteriormente se estimulan con péptidos de la presente invención para obtener APCs que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención sobre su superficie celular. Estas APCs se readministran a un sujeto para inducir CTLs en el sujeto y, como resultado, se puede incrementar la agresividad hacia células que expresan URLC10.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender un adyuvante conocido para establecer eficazmente inmunidad celular. Un adyuvante se refiere a un compuesto que mejora la respuesta inmunitaria contra un antígeno que tiene actividad inmunológica cuando se administra junto (o sucesivamente) con el antígeno. Se pueden usar adyuvantes conocidos descritos en las bibliografías, por ejemplo, Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89. Ejemplos de un adyuvante adecuado incluyen sales de aluminio (fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, oxihidróxido de aluminio y similares), alumbre, toxina del cólera, toxina de Salmonella, adyuvante de Freund incompleto (IFA), adyuvante de Freund completo (CFA), ISCOMatrix, GM-CSF y otras citocinas inmunoestimulantes, un oligodesoxinucleótido que contiene el motivo CpG (CpG7909 y similares), emulsiones de aceite en agua, saponina o sus derivados (QS21 y similares), un lipopolisacárido tal como lípido A o sus derivados (MPL, RC529, GLA, E6020 y similares), lipopéptidos, lactoferrina, flagelina, ARN bicatenario o sus derivados (poli IC y similares), ADN bacteriano, imidazoquinolinas (Imiquimod, R848 y similares), ligando de lectina tipo C (6,6'-dibehenato de trehalosa (TDB) y similares), ligando CD1d (alfa-galactosilceramida y similares), emulsiones de escualeno (MF59, AS03, AF03 y similares), PLGA, y similares, sin limitarse a estos. El adyuvante puede estar contenido en otro recipiente separado de la composición farmacéutica que comprende un péptido de la presente invención en los estuches que comprenden la composición farmacéutica de la presente invención. En este caso, el adyuvante y la composición farmacéutica se pueden administrar a un sujeto sucesivamente, o mezclarse entre sí inmediatamente antes de la administración a un sujeto. Estos estuches que comprenden una composición farmacéutica que comprende un péptido de la presente invención y un adyuvante también son proporcionados por la presente invención. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención es una formulación liofilizada, el estuche puede comprender además una solución de redisolución.

Cuando se usa un adyuvante oleoso como un adyuvante, la composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar como una emulsión. Las emulsiones se pueden preparar, por ejemplo, al mezclar y agitar la solución de péptido preparada según se describe anteriormente y un adyuvante oleoso. La solución de péptido puede ser una que se ha redissuelto después de la liofilización. La emulsión puede ser cualquiera de la emulsión de tipo de agua en aceite o la emulsión de aceite en agua, y la emulsión de tipo de agua en aceite se prefiere para obtener un alto efecto mejorador de la respuesta inmunitaria. Preferiblemente, se puede usar IFA como un adyuvante oleoso, sin limitarse al mismo. La preparación de una emulsión se puede llevar a cabo inmediatamente antes de la administración a un sujeto y, en este caso, la composición farmacéutica de la presente invención se puede proporcionar como un estuche que comprende la solución de péptido de la presente invención y un adyuvante oleoso. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención es una formulación liofilizada, el estuche puede comprender además una solución de redisolución.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser una formulación liposómica dentro de la cual se encapsula un péptido de la presente invención, una formulación granular en la que un péptido está unido a cuentas con varios micrómetros de diámetro, o una formulación en la que un lípido está unido a un péptido.

En otra realización de la presente invención, el péptido de la presente invención también se puede administrar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos preferidos de sales incluyen sales con metales alcalinos (litio, potasio, sodio y similares), sales con metales alcalinotérreos (calcio, magnesio y similares), sales con otros metales (cobre, hierro, cinc, manganeso y similares), sales con bases orgánicas, sales con aminas, sales con ácidos orgánicos (ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico y similares) y sales con ácidos inorgánicos (ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y similares). La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" usada en la presente se refiere a una sal que retiene la eficacia biológica, fisiológica, farmacológica y farmacéutica y la propiedad del compuesto. Por lo tanto, composiciones farmacéuticas que comprenden una sal farmacéuticamente aceptable de un péptido de la presente invención también son abarcadas por la presente invención. Además, el "péptido de la presente invención" también abarca, además del péptido libre, sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir además un componente que ceba CTLs. Los lípidos se han identificado como sustancias capaces de cebar CTLs *in vivo* contra antígenos virales. Por ejemplo, residuos de ácido palmítico se pueden ligar a los grupos amino épsilon y alfa de un residuo de lisina y a continuación conectarse a un péptido de la presente invención. A continuación, el péptido lipídado se puede administrar bien directamente en una micela o partícula, bien incorporado en un liposoma, o bien emulsionado en un adyuvante. Como otro ejemplo de cebado lipídico de respuestas de CTL, se pueden usar lipoproteínas de *E. coli*, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS), para cebar CTLs cuando estén ligadas covalentemente a un péptido apropiado (véase, p. ej., Deres y cols., Nature 1989, 342: 561-4).

Ejemplos de métodos adecuados para administrar los péptidos o las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen inyecciones orales, epidérmicas, subcutáneas, intramusculares, intraóseas, peritoneales e intravenosas, así como administración sistémica o administración local a la vecindad de los sitios elegidos como diana, pero no se limitan a esto. Un método de administración preferido incluye la inyección subcutánea en la vecindad de nódulos linfáticos tales como la axila o la ingle. La administración se puede realizar mediante una sola administración o reforzarse mediante múltiples administraciones. Los péptidos de la presente invención se pueden administrar a un sujeto en una cantidad terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz para tratar el cáncer o en una cantidad terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz para inducir inmunidad (más específicamente CTLs) contra células cancerosas que expresan URLC10. La dosis de los péptidos de la presente invención se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad que se vaya a tratar, la edad y el peso del paciente, el método de administración y similares. Para cada uno de los péptidos de la presente invención, la dosis es habitualmente 0,001 mg - 1000 mg, por ejemplo, 0,01 mg - 100 mg, por ejemplo, 0,1 mg - 30 mg, por ejemplo, 0,1 mg - 10 mg, por ejemplo, 0,5 mg - 5 mg. El intervalo de dosificación puede ser de una vez de cada varios días a varios meses y, por ejemplo, la dosificación se puede realizar en un intervalo de una vez a la semana. Un experto puede seleccionar apropiadamente una dosis (dosificación) adecuada.

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable. En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la presente invención, un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable y un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender 0,001 mg - 1000 mg, preferiblemente 0,01 mg - 100 mg, más preferiblemente 0,1 mg - 30 mg, aún más preferiblemente 0,1 mg - 10 mg, por ejemplo, 0,5 mg - 5 mg de un péptido de la presente invención. Cuando una composición farmacéutica de la presente invención es una inyección, puede comprender un péptido de la presente invención en una concentración de 0,001 mg/ml - 1000 mg/ml, preferiblemente 0,01 mg/ml - 100 mg/ml, más preferiblemente 0,1 mg/ml - 30 mg/ml, aún más preferiblemente 0,1 mg/ml - 10 mg/ml, por ejemplo, 0,5 mg/ml - 5 mg/ml. En este caso, por ejemplo, de 0,1 a 5 ml, preferiblemente de 0,5 ml a 2 ml de la composición farmacéutica de la presente invención se pueden administrar a un sujeto mediante inyección.

Además, la presente invención proporciona métodos para tratar y/o prevenir el cáncer y/o prevenir su recaída posoperatoria, que comprenden administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la presente invención o una composición farmacéutica de la presente invención. Según se describe anteriormente, los péptidos de la presente invención se pueden administrar a un sujeto en una sola dosis habitualmente de 0,001 mg - 1000 mg, por ejemplo, 0,01 mg - 100 mg, por ejemplo, 0,1 mg - 30 mg, por ejemplo, 0,1 mg - 10 mg, o por ejemplo, 0,5 mg - 5 mg. En una realización preferida, los péptidos de la presente invención se administran a un sujeto junto con un adyuvante. Además, el intervalo de dosificación puede ser de una vez cada varios días a varios meses, preferiblemente de una vez cada varios días a cada mes, por ejemplo, una vez cada semana o una vez cada dos semanas.

(2) Composiciones farmacéuticas que contienen polinucleótidos como el ingrediente activo

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener polinucleótidos que codifican los péptidos de la presente invención en una forma expresable. En la presente, la expresión "en una forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando se introduce en una célula, se expresará como un péptido de la presente invención. En una realización ejemplificada, la secuencia del polinucleótido de la presente invención incluye elementos reguladores necesarios para la expresión del péptido de la presente invención. El polinucleótido o los polinucleótidos de la presente invención pueden estar equipados con una secuencia necesaria para alcanzar una inserción estable en el genoma de la célula diana (véase, p. ej., Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 para una descripción de vectores de casetes de recombinación homólogos). Véanse, p. ej., Wolff y cols., Science 1990, 247: 1465-8; las Patentes de EE. UU. N° 5.580.859, 5.589.466, 5.804.566, 5.739.118, 5.736.524, 5.679.647 y el documento WO98/04720. Ejemplos de tecnologías de aporte basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", aporte facilitado (bupivacaína, polímeros, mediado por péptidos), complejos lipídicos catiónicos y aporte mediado por partículas ("pistola génica") o mediado por presión (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N° 5.922.687).

Los péptidos de la presente invención también se pueden expresar mediante vectores virales o bacterianos. Ejemplos de vectores de expresión incluyen hospedadores virales atenuados, tales como viruela vacunoide o viruela aviar. Por ejemplo, como un vector para expresar el péptido de la presente invención, se puede usar virus de viruela vacunoide. Tras la introducción en un hospedador, el virus de viruela vacunoide recombinante expresa el péptido inmunogénico, y de ese modo provoca una respuesta inmunitaria. Vectores de viruela vacunoide y métodos útiles en protocolos de inmunización se describen, p. ej., en la Patente de EE.UU. N° 4.722.848. Otro vector es BCG (bacilo Calmette Guérin). Vectores de BCG se describen en Stover y cols., Nature 1991, 351: 456-60. Será evidente una amplia variedad de otros vectores útiles para administración terapéutica o inmunización, p. ej., vectores adenovirales y de virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores de Salmonella typhi, vectores de toxina del carbunco destoxificada, y similares. Véanse, p. ej., Shata y cols., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock y cols., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp y cols., In Vivo 2000, 14: 571-85.

El aporte de un polinucleótido de la presente invención a un paciente puede ser bien directo, en cuyo caso el paciente puede ser expuesto directamente a un vector que aloja el polinucleótido de la presente invención, o bien indirecto, en cuyo caso las células se transforman en primer lugar con el vector que aloja el polinucleótido de la presente invención *in vitro*, a continuación las células se trasplantan al paciente. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapias génicas *in vivo* y *ex vivo*.

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

De forma similar a la administración de péptidos, la administración de polinucleótidos se puede realizar mediante inyección oral, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraósea y/o peritoneal, y similares. La administración de polinucleótidos puede ser una administración sistémica o una administración local a la vecindad de los sitios elegidos. La administración se puede realizar mediante una sola administración o reforzada por múltiples administraciones. Los polinucleótidos de la presente invención se pueden administrar a un sujeto en una dosis terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz para inducir inmunidad (más específicamente CTLs) contra células cancerosas que expresan URLC10, o en una dosis terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz para tratar el cáncer. La dosis de un polinucleótido en un vehículo adecuado o la dosis de un polinucleótido en células transformadas con un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención se puede ajustar apropiadamente según la enfermedad que se vaya a tratar, la edad y el peso del paciente, el método de administración y similares, y esta puede ser habitualmente 0,001 mg - 1000 mg, por ejemplo, 0,01 mg - 100 mg, por ejemplo, 0,1 mg - 30 mg, por ejemplo, 0,1 mg - 10 mg, o por ejemplo, 0,5 mg - 5 mg. El intervalo de dosificación puede ser una vez de cada varios días a varios meses, y por ejemplo, la dosificación se puede realizar en un intervalo de una vez por semana. Un experto puede seleccionar apropiadamente una dosis (dosificación) adecuada.

X. Métodos para usar péptidos, exosomas, APCs y CTLs

Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para inducir APCs y CTLs. Los CTLs también se pueden inducir usando los exosomas y las APCs de la presente invención. Los péptidos, los polinucleótidos, los exosomas y las APCs se pueden usar en combinación con cualquier otro compuesto o compuestos con la condición de que no se inhiba su capacidad inductora de CTL.

(1) Métodos para inducir APCs

La presente invención proporciona métodos *in vitro* o *ex vivo* para inducir APCs que tienen capacidad inductora de CTL, usando un péptido o péptidos o un polinucleótido o polinucleótidos de la presente invención.

5 Los métodos de la presente invención comprenden una etapa de puesta en contacto de una APC con un péptido de la presente invención *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, un método *ex vivo* de puesta en contacto de APCs con el péptido puede comprender la etapa de puesta en contacto de APCs recogidas de un sujeto con un péptido de la presente invención.

10 Las APCs descritas anteriormente no se limitan a un tipo particular de célula, y se pueden usar células que se sabe que presentan un antígeno proteínico sobre su superficie celular para ser reconocidas por linfocitos, por ejemplo, DCs, células de Langerhans, macrófagos, células B, y células T activadas. Las DCs tienen la capacidad inductora de CTL más potente entre las APCs, y así es preferible usar DCs. Cualesquiera péptidos de la presente invención se pueden usar por sí mismos o en combinación con otros péptidos de la presente invención. Además, los péptidos de la presente invención se pueden usar en combinación con otros péptidos inductores de CTL (por ejemplo, otros péptidos inductores de CTL derivados de TAA).

Mientras tanto, cuando un péptido de la presente invención se administra a un sujeto, las APCs se ponen en contacto con el péptido *in vivo*, y, como resultado, APCs que tienen una alta capacidad inductora de CTL se inducen en el cuerpo del sujeto. De forma similar, cuando un polinucleótido de la presente invención se administra a un sujeto en una forma expresable, un péptido de la presente invención se expresa *in vivo*, el péptido expresado se pone en contacto con APCs *in vivo* y, como resultado, APCs que tienen una alta capacidad inductora de CTL se inducen en el cuerpo del sujeto.

25 A fin de inducir APCs que tienen capacidad inductora de CTL, la presente invención puede comprender una etapa de introducción de un polinucleótido de la presente invención en APCs. Por ejemplo, el método *ex vivo* puede comprender la etapa de introducir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en APCs recogidas de un sujeto.

30 La introducción de un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención se puede realizar según se describe en la sección "VI. Células que presentan antígeno (APCs)" anterior.

Así, la presente invención proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* para inducir APCs que tienen capacidad inductora de CTL, que comprende la etapa (a) o (b) posterior:

35 (a) poner en contacto APCs con un péptido de la presente invención; y

(b) introducir un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en APCs.

Las APCs usadas en los métodos descritos anteriormente se pueden derivar de un sujeto programado para la administración de las APCs inducidas, o se pueden derivar de un sujeto diferente. Cuando se usan APCs derivadas de un sujeto (donante) diferente del sujeto programado para la administración, el sujeto de la administración y el donante deben tener el tipo de HLA idéntico. En los métodos de la presente invención, el tipo de HLA es preferiblemente HLA-A11 (más preferiblemente HLA-A*1101) tanto en el sujeto de la administración como en el donante. Alternativamente, las APCs usadas en los métodos descritos anteriormente son preferiblemente APCs que expresan HLA-A11 (más preferiblemente HLA-A*1101). Las APCs se pueden preparar usando métodos conocidos a partir de PBMCs después de que las PBMCs se separen de sangre recogida de un donante mediante un método centrífugo de peso específico o similar.

En otra realización, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifica el péptido para inducir una APC o APCs que tienen capacidad inductora de CTL.

50 Alternativamente, la presente invención proporciona además péptidos de la presente invención o polinucleótidos que codifican los péptidos para el uso en la inducción de una APC o APCs que tienen capacidad inductora de CTL.

Las APCs inducidas por los métodos de la presente invención pueden inducir CTLs específicos para URLC10 (es decir, CTLs de la presente invención).

(2) Métodos para inducir CTLs

La presente invención también proporciona métodos *in vitro* para inducir CTLs usando péptidos, polinucleótidos, exosomas o APCs de la presente invención. La presente invención proporciona además métodos *in vitro* para inducir

CTLs usando uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido o polipéptidos que pueden formar un receptor de células T (TCR) (es decir, una subunidad TCR) capaz de reconocer un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA. Los métodos para inducir CTLs comprenden al menos una de las etapas seleccionadas de lo siguiente:

5 (a) poner en contacto células T positivas a CD8 con células presentadoras de antígeno que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención;

(b) poner en contacto células T positivas a CD8 con exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención; y

10 (c) introducir en células T positivas a CD8 uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido o polipéptidos que pueden formar un TCR capaz de reconocer un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA.

Cuando un péptido o péptidos, un polinucleótido o polinucleótidos, un exosoma o exosomas o una APC o APCs de la presente invención se administran a un sujeto, se inducen CTLs en el cuerpo del sujeto y se mejora la intensidad de la respuesta inmunitaria que se dirige a células cancerosas que expresan URLC10.

15 Las APCs que se van a cocultivar con las células T positivas a CD8 en la etapa (c) anterior también se pueden preparar al introducir en las APCs un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención según se describe anteriormente en la sección "VI. Células que presentan antígeno (APCs)". Sin embargo, las APCs que se van a usar en los métodos de la presente invención no se limitan a esto, y se pueden usar cualesquiera APCs que presenten sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención.

20 En los métodos de la presente invención, en lugar de estas APCs, también se pueden usar exosomas que presenten sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención. Esto es, los métodos de la presente invención pueden comprender una etapa de cocultivo con exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención. Estos exosomas se pueden preparar mediante los métodos descritos anteriormente en la sección "V. Exosomas".

25 Además, los CTLs también se pueden inducir al introducir en una célula T positiva a CD8 un vector que comprende un polinucleótido que codifica cada subunidad de un TCR capaz de unirse a un péptido de la presente invención presentado por un antígeno HLA sobre la superficie celular. Esta transformación se puede llevar a cabo como se describe anteriormente en la sección "VIII. Receptores de células T (TCRs)".

30 Según esto, la presente invención proporciona métodos *in vitro* para inducir CTLs, que comprenden una etapa seleccionada de lo siguiente:

35 (a) cocultivar células T positivas a CD8 con APCs que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención;

(b) cocultivar células T positivas a CD8 con exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención; y

40 (c) introducir en células T positivas a CD8 un vector que comprende un polinucleótido que codifica cada subunidad de un TCR capaz de unirse a un péptido de la presente invención presentado por un antígeno HLA sobre una superficie celular.

Las APCs o los exosomas y las células T positivas a CD8 usados en los métodos descritos anteriormente se pueden derivar de un sujeto programado para la administración de los CTLs inducidos, o se pueden derivar de un sujeto diferente. Cuando se usan las APCs o los exosomas y las células T positivas a CD8 derivados de un sujeto (donante) diferente del sujeto programado para la administración, el sujeto de la administración y el donante deben tener el tipo de HLA idéntico. Por ejemplo, cuando un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13 o uno de sus péptidos modificados se usa como péptidos de la presente invención, el tipo de HLA tanto en el sujeto de la administración como en el donante es preferiblemente HLA-A11 (más preferiblemente HLA-A*1101). Alternativamente, las APCs o los exosomas usados en los métodos descritos anteriormente son preferiblemente APCs o exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de HLA-A11 (más preferiblemente HLA-A*1101) y un péptido de la presente invención (un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13 o uno de sus péptidos modificados). En este caso, los CTLs inducidos muestran una actividad citotóxica específica contra células que presentan un complejo de HLA-A11 y un péptido de la presente invención (por ejemplo, células positivas a HLA-A11 que expresan URLC10).

En otra realización, la presente invención también proporciona composiciones o composiciones farmacéuticas para inducir CTLs, que comprenden al menos un ingrediente activo seleccionado de lo siguiente:

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

XI. Métodos para inducir una respuesta inmunitaria

Se describen métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra cánceres que expresan URLC10. Cánceres aplicables incluyen cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, tumor de tejidos blandos y similares, pero no se limitan a estos. Es preferible que el cáncer exprese al menos un HLA seleccionado de entre HLA-A11 y HLA-A03.

Se describen además métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra células cancerosas que expresan URLC10. Se identifica que URLC10 se sobreexpresa en diversos tipos de cánceres según se describe anteriormente. Así, se induce una respuesta inmunitaria contra células cancerosas que expresan URLC10, como resultado se inhibe la proliferación de las células cancerosas. Según esto, se describen además métodos para inhibir la proliferación de células cancerosas que expresan URLC10. Los métodos de la presente invención son adecuados, en particular, para inhibir la proliferación de células cancerosas que expresan URLC10 y al menos un HLA seleccionado de entre HLA-A11 y HLA-A03.

Los métodos pueden comprender una etapa de administración de una composición que comprende cualquiera de los péptidos de la presente invención o un polinucleótido o polinucleótidos que codifican el péptido o los péptidos. Los métodos también contemplan la administración de APCs o exosomas que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención. Los detalles se pueden referir a la sección "IX. Composiciones farmacéuticas", particularmente las porciones que describen el uso referido de las composiciones farmacéuticas de la presente invención como vacunas. Además, exosomas y APCs que se pueden usar en los métodos de la presente invención para inducir una respuesta inmunitaria se describen con detalle en "V. Exosomas", "VI. Células que presentan antígeno (APCs)" y en los puntos (1) y (2) de "X. Métodos para usar péptidos, exosomas, APCs y CTLs" descritos anteriormente.

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas o vacunas para inducir una respuesta inmunitaria contra cánceres que expresan URLC10, en donde la composición farmacéutica o vacuna comprende un ingrediente activo seleccionado de lo siguiente:

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

Alternativamente, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas o vacunas para inducir una respuesta inmunitaria contra células cancerosas que expresan URLC 10, en donde la composición farmacéutica o vacuna comprende un ingrediente activo seleccionado de los siguiente:

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

(d) un exosoma que presenta sobre su superficie un péptido de la presente invención; y

(e) un CTL de la presente invención.

5 Alternativamente, la presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas o vacunas para inhibir la proliferación de células cancerosas que expresan URLC10, en donde la composición farmacéutica o la vacuna comprende un ingrediente activo seleccionado de lo siguiente:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en una forma expresable;

(c) una APC que presenta sobre su superficie un péptido de la presente invención;

(d) un exosoma que presenta sobre su superficie un péptido de la presente invención; y

10 (e) un CTL de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, cánceres que expresan URLC10 se pueden tratar al administrar un péptido, un polipéptido, una APC, un exosoma y/o un CTL de la presente invención. Alternativamente, se puede inducir una respuesta inmunitaria contra cánceres que expresan URLC10 al administrar un péptido, un polipéptido, una APC, un exosoma y/o un CTL de la presente invención. Ejemplos de estos cánceres incluyen cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, tumor de tejidos blandos y similares, pero no se limitan a estos. Además, se puede inducir una respuesta inmunitaria contra células cancerosas que expresan URLC10 al administrar un péptido, un polipéptido, una APC, un exosoma y/o un CTL de la presente invención. Por lo tanto, antes de administrar una vacuna o composición farmacéutica que comprende un ingrediente activo descrito anteriormente, es preferible confirmar si el nivel de expresión de URLC10 en una zona enferma del sujeto que se va a tratar está aumentado o no.

25 Alternativamente, la presente invención proporciona además vacunas y composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un ingrediente activo seleccionado del grupo que consiste en (a) a (e) anteriores para la administración a un sujeto con cáncer que expresa URLC10. Se describe un método para identificar o seleccionar un sujeto que va a ser tratado con al menos un ingrediente activo seleccionado del grupo que consiste en (a) a (e) anteriores, en donde el método comprende las etapas posteriores:

(i) medir el nivel de expresión de URLC10 en una muestra biológica recogida de la zona enferma de un sujeto con cáncer;

30 (ii) identificar a un sujeto con cáncer que expresa URLC10 basándose en el nivel de expresión de URLC10 medido en (i); y

(iii) identificar o seleccionar al sujeto identificado en (ii) como un sujeto que puede ser tratado con al menos un ingrediente activo seleccionado del grupo que consiste en (a) a (e) anteriores.

35 Las muestras biológicas procedentes de un sujeto para medir el nivel de expresión de URLC10 en los métodos descritos anteriormente no están particularmente limitadas y, por ejemplo, se pueden usar preferiblemente muestras tisulares que contienen células cancerosas recogidas mediante biopsia o similares. El nivel de expresión de URLC10 en una muestra biológica se puede medir mediante métodos conocidos, y, por ejemplo, se pueden usar métodos que detecten productos de transcripción del gen URLC10 mediante sondas o métodos de PCR (por ejemplo, método de micromatrices de ADNc, método de transferencia Northern, método de RT-PCR o similares), métodos que detecten productos de traducción del gen URLC10 por anticuerpos o similares (por ejemplo, método de transferencia Western, método de inmunotinción o similares), y similares. Además, las muestras biológicas pueden ser muestras de sangre y, en este caso, se mide el nivel en sangre de un anticuerpo contra URLC10 o uno de sus fragmentos, y el nivel de expresión de URLC10 en una zona enferma se puede determinar basándose en el nivel en sangre. El nivel en sangre de un anticuerpo contra URLC10 se puede medir usando métodos conocidos y, por ejemplo, se pueden usar inmunoensayo enzimático (EIA), ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y similares usando la proteína de URLC10 o un péptido de la presente invención como un antígeno.

50 Normalmente, en tejidos y células que no expresen URLC10, casi no hay detección de productos de transcripción y productos de traducción de URLC10. Así, cuando se detecta un producto de transcripción o un producto de traducción de URLC10 en células cancerosas o una muestra tisular que contiene células cancerosas recogida de un sujeto, se

puede determinar que el cáncer del sujeto expresa URLC10. En muestras de sangre de un sujeto que no tiene cáncer que expresa URLC10, casi no existe detección de anticuerpos contra URLC10 o sus fragmentos. Así, cuando se detectan anticuerpos contra URLC10 o sus fragmentos en una muestra de sangre recogida de un sujeto, se puede determinar que el cáncer del sujeto expresa URLC10. También se puede determinar si un cáncer de un sujeto expresa URLC10 o no mediante una comparación con los resultados de medida del mismo tipo de material biológico recogido de una zona no cancerosa del sujeto o el mismo tipo de material biológico recogido de un sujeto que no tiene cáncer (muestra de control normal). Esto es, en comparación con el nivel del objetivo de medida en una muestra de control normal (nivel de control normal), cuando el nivel de la muestra biológica del sujeto de prueba es elevado, se valora que el cáncer del sujeto expresa URLC10. Por ejemplo, cuando la cantidad del objetivo de medida detectado se incrementa en al menos 10% o más en comparación con el nivel de control normal, se puede valorar que el cáncer del sujeto expresa URLC10. Es deseable que la cantidad del objetivo de medida detectada se incremente preferiblemente en 25% o más, y más preferiblemente 50% o más que el nivel de control normal. Además, la cantidad de un producto de transcripción o un producto de traducción de URLC10 detectada se puede evaluar al normalizar frente a la cantidad detectada de un gen constitutivo conocido tal como beta-actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o proteína P1 ribosómica.

Es preferible confirmar el tipo de HLA del sujeto antes de administrar al menos un ingrediente activo seleccionado del grupo que consiste en (a) a (e) anteriores. Por ejemplo, para los sujetos a los que se va a administrar un ingrediente activo en asociación con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 1, 9 y 13, es preferible seleccionar sujetos positivos a HLA-A11.

También se describen complejos de un péptido de la presente invención y HLA. Los complejos descritos anteriormente pueden ser monómeros o multímeros. Cuando un complejo es un multímero, el índice de polimerización no está particularmente limitado, y puede ser un multímero de cualquier índice de polimerización. Ejemplos incluyen un tetrámero, un pentámero, un hexámero y similares, pero no se limitan a estos. Los multímeros también abarcan dextrámeros (documento WO2002/072631) y estreptámeros (Knabel M y cols., Nat Med. junio 2002; 8(6): 631-7.). Los complejos de un péptido de la presente invención y HLA se pueden preparar según métodos conocidos (por ejemplo, Altman JD y cols., Science. 1996, 274(5284): 94-6; el documento WO2002/072631; el documento WO2009/003492; Knabel M y cols., Nat Med. junio 2002; 8(6): 631-7, y similares). Los complejos, por ejemplo, se pueden usar en la cuantificación de CTLs específicos para un péptido de la presente invención. Por ejemplo, una muestra de sangre se recoge de un sujeto al que se ha administrado una composición farmacéutica de la presente invención, y se preparan células negativas a CD4 después de la separación de PBMCs y se ponen en contacto con un complejo conjugado a colorante fluorescente de la presente invención. A continuación, el porcentaje de CTLs específicos para un péptido de la presente invención se puede medir mediante análisis por citometría de flujo. Por ejemplo, los efectos inductores de respuesta inmunitaria mediante una composición farmacéutica de la presente invención se pueden comprobar al medir los CTLs específicos contra un péptido de la presente invención antes, durante y/o después de la administración de la composición farmacéutica de la presente invención.

XII. Anticuerpos

La presente divulgación proporciona además anticuerpos que se unen al péptido de la presente invención. Anticuerpos preferibles se unen específicamente a un péptido de la presente invención, pero no se unen (o se unen débilmente) a uno que no es el péptido de la presente invención. En otra realización, este anticuerpo puede incluir un anticuerpo que reconoce un péptido en el contexto de moléculas de HLA, es decir, un anticuerpo que se une a un complejo de péptido-MHC. La especificidad de unión de un anticuerpo se puede confirmar mediante un ensayo de inhibición. Esto es, si la unión entre un anticuerpo que se va a analizar y un polipéptido de URLC10 de longitud completa se inhibe en presencia de un péptido de la presente invención, se muestra que este anticuerpo se une específicamente al péptido de la presente invención. Los anticuerpos contra péptidos de la presente invención se pueden usar en ensayos de diagnóstico y pronóstico de enfermedades, así como someter a selección para la administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención y la comprobación de las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

La presente divulgación también proporciona diversos ensayos inmunológicos para detectar y/o cuantificar péptidos de la presente invención o sus fragmentos. Estos ensayos inmunológicos incluyen radioinmunoensayo, inmunocromatografía, ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas (ELISA), ensayo de inmunofluorescencia con enzimas ligadas (ELIFA) y similares, sin limitarse a estos, y se realizan dentro del alcance de los diversos formatos de ensayo inmunológico bien conocidos en la especialidad.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden usar en métodos inmunológicos de obtención de imágenes que pueden detectar cánceres que expresan URLC10, y sus ejemplos incluyen obtención de imágenes escintigráfica radiactiva usando un anticuerpo marcado de la presente invención, sin limitarse a esto. Estos métodos de ensayo se usan clínicamente en la detección, la comprobación y el pronóstico de cánceres que expresan URLC10; y ejemplos de este cáncer incluyen cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, tumor de tejidos blandos y similares, sin limitarse a estos.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden usar en cualquier forma arbitraria tal como anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales, y pueden incluir además antiseros obtenidos al inmunizar a un animal tal como un conejo con un péptido de la presente invención, todas las clases de anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, así como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados generados a través de recombinación génica.

El péptido de la presente invención o uno de sus fragmentos usado como un antígeno para obtener anticuerpos se puede obtener mediante síntesis química o técnicas de manipulación genética basándose en las secuencias de aminoácidos divulgadas en la presente.

El péptido usado como un antígeno de inmunización puede ser un péptido de la presente invención o un fragmento de un péptido de la presente invención. Además, el péptido puede estar unido a o conjugado con un vehículo para incrementar la inmunogenicidad. La hemocianina de lapa californiana (KLH) es muy conocida como un vehículo. Métodos para unir KLH a un péptido también son muy conocidos en la especialidad.

Cualquier mamífero se puede inmunizar con un antígeno descrito anteriormente, y es preferible considerar la compatibilidad con la célula original usada en la fusión celular cuando se genere un anticuerpo monoclonal. Generalmente, se pueden usar animales del orden Rodentia, Lagomorpha o Primate. Animales del orden Rodentia incluyen, por ejemplo, ratones, ratas y hámsteres. Animales del orden Lagomorpha incluyen, por ejemplo, conejos. Animales del orden Primate incluyen, por ejemplo, monos Catarrhini (monos del viejo mundo) tales como monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*), monos Rhesus, papión y chimpancé.

Métodos para inmunizar animales con un antígeno son muy conocidos en la especialidad. La inyección intraperitoneal y la inyección subcutánea de un antígeno son métodos estándar para inmunizar mamíferos. Más específicamente, un antígeno se diluye y se suspende en una cantidad apropiada de solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, o similares. Según sea necesario, una solución de suspensión de antígeno se puede administrar a mamíferos después de mezclarse con una cantidad apropiada de un adyuvante estándar tal como adyuvante completo de Freund y emulsionarse. A continuación, es preferible administrar el antígeno mezclado con una cantidad apropiada de adyuvante incompleto de Freund varias veces cada de 4 a 21 días. Un vehículo apropiado se puede usar para la inmunización. Después de la inmunización anterior, el suero se puede examinar mediante un método estándar con respecto al incremento en la cantidad del anticuerpo deseado.

Anticuerpos policlonales contra un péptido de la presente invención se pueden preparar al recoger sangre de mamíferos que se han confirmado con un incremento en el nivel en suero del anticuerpo deseado después de la inmunización, y separar el suero de la sangre mediante cualquier método convencional. Un anticuerpo policlonal puede ser un suero que contiene anticuerpo policlonal, o una fracción que contiene anticuerpo policlonal se puede aislar del suero. Se puede preparar inmunoglobulina G o M a partir de fracciones que reconocen solamente un péptido de la presente invención, por ejemplo, al usar una columna de afinidad conjugada con el péptido de la presente invención, y a continuación purificar adicionalmente las fracciones usando una columna de proteína A o proteína G.

A fin de preparar anticuerpos monoclonales, tras confirmar un incremento en el nivel en suero del anticuerpo deseado después de la inmunización, células inmunitarias se recogen de los mamíferos y se someten a fusión celular. Las células inmunitarias usadas para la fusión celular se pueden obtener preferiblemente a partir del bazo. Para las otras células madre fusionadas con las células inmunitarias anteriores, por ejemplo, una célula de mieloma de mamífero, y más preferiblemente una célula de mieloma que ha adquirido una propiedad para la selección de fármacos de células de fusión.

Las células inmunitarias anteriores se pueden fusionar con células de mieloma al seguir métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein y cols. (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)).

Los hibridomas obtenidos mediante fusión celular se pueden seleccionar al cultivarlos en un medio de selección estándar tal como el medio HAT (un medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo celular se continúa típicamente en el medio HAT durante un período suficiente (por ejemplo, de varios días a varias semanas) para permitir la muerte de todas las otras células (células no fusionadas) además de los hibridomas deseados. A continuación, las células de hibridoma que producen el anticuerpo deseado se pueden cribar y clonar al realizar una dilución limitativa estándar.

Además de los métodos anteriores para inmunizar a un animal no humano con un antígeno para la preparación de un hibridoma, linfocitos humanos tales como linfocitos infectados con virus de EB se pueden inmunizar *in vitro* con un péptido, células que expresan el péptido o sus lisados. A continuación, los linfocitos inmunizados se pueden fusionar con células de mieloma derivadas de ser humano inmortalizadas tales como U266 para obtener hibridomas que producen un anticuerpo humano deseado capaz de unirse al péptido (JPS63-17688).

Posteriormente, el hibridoma obtenido se trasplanta a la cavidad abdominal de un ratón, y la ascitis se extrae. El anticuerpo monoclonal obtenido se puede purificar, por ejemplo, mediante precipitación de sulfato amónico, columna

de proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico en DEAE o una columna de afinidad conjugada con el péptido de la presente invención.

Alternativamente, células inmunitarias que producen anticuerpo tales como los linfocitos inmunizados se pueden immortalizar mediante un gen de cáncer y usarse para la preparación de anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos como tales también se pueden preparar mediante recombinación usando técnicas de manipulación genética (véase, p. ej., Borrebaeck y Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies* publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1990)). Por ejemplo, un ADN que codifica anticuerpo se puede clonar a partir de células inmunitarias tales como un hibridoma productor de anticuerpo o linfocitos inmunizados e insertarse en un vector adecuado, y a continuación esto se introduce en células hospedadoras para preparar un anticuerpo recombinante.

Además, los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser fragmentos de anticuerpo o anticuerpos modificados, con la condición de que se unan a los péptidos de la presente invención. Por ejemplo, es deseable que el fragmento de anticuerpo contenga un sitio o sitios de unión a antígeno de los anticuerpos. Específicamente, los fragmentos de anticuerpo pueden ser Fab, F(ab')₂, Fv, o un Fv(scFv) monocatenario en el que fragmentos Fv derivados de una cadena H y una cadena L están conectados con un conector adecuado (Huston y cols., *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5879-83 (1988)). Más específicamente, se pueden generar fragmentos de anticuerpo al tratar un anticuerpo con una enzima tal como papaína o pepsina. Alternativamente, un gen que codifica un fragmento de anticuerpo se puede construir, insertar en un vector de expresión y expresarse en una célula hospedadora apropiada (véanse, p. ej., Co y cols., *J Immunol* 152: 2968-76 (1994); Better y Horwitz, *Methods Enzymol* 178: 476-96 (1989); Pluckthun y Skerra, *Methods Enzymol* 178: 497-515 (1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121: 652-63 (1986); Rousseaux y cols., *Methods Enzymol* 121: 663-9 (1986); Bird y Walker, *Trends Biotechnol* 9: 132-7 (1991)).

Los anticuerpos se pueden modificar mediante conjugación con diversas moléculas tales como polietilenglicol (PEG). Se pueden obtener anticuerpos modificados al modificar químicamente los anticuerpos. Estos métodos de modificación son convencionales en la especialidad.

Alternativamente, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden obtener como anticuerpos quiméricos de una región variable derivada de anticuerpos no humanos y una región constante derivada de anticuerpos humanos, o como anticuerpos humanizados que comprenden una región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de anticuerpos no humanos y una región de marco (FR) derivada de anticuerpos humanos y una región constante. Estos anticuerpos se pueden preparar según técnicas conocidas. La humanización se puede llevar a cabo al sustituir una secuencia o secuencias de anticuerpo humano con una secuencia o secuencias de CDR de anticuerpos no humanos correspondientes (véase, p. ej., Verhoeven y cols., *Science* 239: 1534-6 (1988)). Así, estos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos en los que el sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por una secuencia correspondiente procedente de una especie no humana.

También se pueden usar anticuerpos humanos intactos que comprenden una región variable humana además de las regiones de marco y constante humanas. Estos anticuerpos se pueden generar usando diversas técnicas conocidas en la especialidad. Por ejemplo, métodos *in vitro* incluyen el uso de bibliotecas recombinantes de fragmentos de anticuerpos humanos presentados sobre bacteriófagos (por ejemplo, Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991)). De forma similar, también se pueden generar anticuerpos humanos al introducir locus de genes de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones, en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcialmente o completamente. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N° 6.150.584, 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 y 5.661.016.

Los anticuerpos obtenidos según se describe anteriormente se pueden purificar hasta homogeneidad. Por ejemplo, la separación y la purificación de anticuerpos se pueden realizar según métodos de separación y métodos de purificación usados para proteínas generales. Por ejemplo, un anticuerpo se puede separar y aislar al seleccionar y combinar apropiadamente el uso de cromatografías en columna tales como cromatografía de afinidad, un filtro, ultrafiltración, desalado, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y electroforesis de enfoque isoeléctrico (*Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero no se limitan a estos. Se pueden usar una columna de proteína A y una columna de proteína G como la columna de afinidad. Columnas de proteína A ejemplares que se van a usar incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharose F.F. (Farmacia).

Además de la cromatografía de afinidad, una cromatografía ejemplar incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía en fase inversa, cromatografía de adsorción y similares (*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Ed Daniel R. Marshak y cols., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Los procedimientos cromatográficos se pueden llevar a cabo mediante cromatografía en fase líquida tal como HPLC y FPLC.

La actividad de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente divulgación se puede medir, por ejemplo, al usar una medida de la absorbancia, un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), un inmunoensayo enzimático

(EIA), un radioinmunoensayo (RIA) y/o inmunofluorescencia (IF). En el caso de ELISA, un anticuerpo de la presente invención se inmoviliza sobre una placa, un péptido de la presente invención se aplica a la placa y a continuación se aplica una muestra que contiene el anticuerpo deseado, tal como el sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpo o anticuerpos purificados. Posteriormente, se aplica un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario y está marcado con una enzima tal como fosfatasa alcalina y la placa se incuba. A continuación, después del lavado, se aplica a la placa un sustrato enzimático tal como fosfato de p-nitrofenilo, y la actividad de unión a antígeno de la muestra se evalúa al medir la absorbancia. Para valorar la capacidad de unión de un anticuerpo, se pueden usar como un antígeno fragmentos de péptido tales como fragmentos C-terminales o N-terminales. Se puede usar BIAcore (Pharmacia) para evaluar la actividad de un anticuerpo de la presente invención.

Es posible detectar o medir un péptido de la presente invención usando los métodos anteriores, al exponer un anticuerpo de la presente divulgación a una muestra que se supone que contiene el péptido de la presente invención, y detectar o medir un complejo inmunitario formado entre el anticuerpo y el péptido.

Por ejemplo, un anticuerpo de la presente divulgación se puede usar para detectar un péptido de la presente invención presente en la muestra de sangre (por ejemplo, muestra de suero) de un sujeto. Alternativamente, un anticuerpo de la presente divulgación presente en la muestra de sangre (por ejemplo, muestra de suero) de un sujeto también se puede detectar usando un péptido de la presente invención. El resultado de la medida de un péptido de la presente invención o un anticuerpo de la presente divulgación en la muestra de sangre de un sujeto se puede utilizar para la selección de sujetos para la administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención o la comprobación de la eficacia de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Además, se ha presentado que los pacientes que tienen un anticuerpo contra un péptido administrado como vacuna pueden tener alta sensibilidad a la vacuna. Por lo tanto, el péptido de la presente invención se puede utilizar como un antígeno de inmunoensayo para seleccionar un paciente con alta sensibilidad cuando el péptido se administre como una vacuna usando un anticuerpo del paciente como un índice.

XIII. Vectores y células hospedadoras

La presente divulgación proporciona vectores que comprenden un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención y células hospedadoras introducidas con los vectores. Un vector de la presente divulgación se puede usar para mantener un polinucleótido de la presente invención en una célula hospedadora, para expresar un péptido de la presente invención en una célula hospedadora o para administrar un polinucleótido de la presente invención para terapia génica.

Cuando *E. coli* es una célula hospedadora y un vector se amplifica y se produce en una gran cantidad en *E. coli* (por ejemplo, JM109, DH5-alfa, HB101 o XL1-Blue), el vector necesita tener un "origen de replicación" para la amplificación en *E. coli* y un gen marcador para la selección de *E. coli* transformada (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos seleccionado mediante un fármaco tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol). Por ejemplo, se pueden usar los vectores de la serie M13, los vectores de la serie pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script y similares. Además, se pueden usar pGEM-T, pDIRECT y pT7 para la clonación, así como los vectores anteriores. Cuando se usa un vector en la producción de un péptido de la presente invención, se puede usar un vector de expresión. Por ejemplo, un vector de expresión para la expresión en *E. coli* necesita tener las características anteriores para la amplificación en *E. coli*. Cuando se usan *E. coli* tales como JM109, DH5-alfa, HB101 o XL1-Blue como una célula hospedadora, el vector necesita tener un promotor, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward y cols., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1989)), el promotor araB (Better y cols., Science 240: 1041-3 (1988)), el promotor T7 o similares, que pueden expresar eficazmente el gen deseado en *E. coli*. A este respecto, se pueden usar pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen), pEGFP y pET (en este caso, el hospedador es preferiblemente BL21 que expresa ARN polimerasa de T7), por ejemplo, en lugar de los vectores anteriores. Adicionalmente, el vector pueden contener una secuencia de señalización para la secreción de péptido. Una secuencia de señalización ejemplar que dirige el péptido que se va a secretar al periplasma de la *E. coli* es la secuencia de señalización pelB (Lei y cols., J Bacteriol 169: 4379 (1987)). Medios para introducir los vectores en las células hospedadoras diana incluyen, por ejemplo, el método del cloruro cálcico y el método de electroporación.

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

A fin de expresar el vector en células animales tales como células CHO, COS o NIH3T3, el vector necesita soportar un promotor necesario para la expresión en estas células, por ejemplo, el promotor SV40 (Mulligan y cols., Nature 277: 108 (1979)), el promotor MMLV-LTR, el promotor EF1-alfa (Mizushima y cols., Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990)), el promotor CMV y similares, y preferiblemente un gen marcador para seleccionar transformantes (por ejemplo, un

gen de resistencia a fármacos seleccionado por un fármaco (p. ej., neomicina, G418)). Ejemplos de vectores conocidos con estas características incluyen, por ejemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

En lo sucesivo, la presente invención se describe con más detalle con referencia a los Ejemplos. No obstante, aunque los siguientes materiales, método y Ejemplos pueden servir para ayudar a un experto normal en la especialidad a elaborar y usar ciertas realizaciones de la presente invención, solo están destinados a ilustrar aspectos de la presente invención y así no limitan de ningún modo el alcance de la presente invención. Un experto normal en la especialidad puede usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o las pruebas de la presente invención.

10 Ejemplos

[Ejemplo 1]

Materiales y métodos

Líneas celulares

15 C1R, una línea celular linfoblastoide B humana negativa a HLA-A y HLA-B, y COS7, una línea celular renal de mono verde africano, se adquirieron de ATCC.

Generación de células estimulantes con expresión estable de HLA-A*1101

Se usó C1R (C1R-A11) que expresa establemente HLA-A*1101 como una célula estimulante. Un ADNc que codifica el marco de lectura abierta de HLA-A*1101 se amplificó mediante PCR y se clonó en un vector de expresión. Las células C1R se transfectaron con el vector de expresión, y a continuación se seleccionaron usando G418 (Invitrogen) durante dos semanas. Las células seleccionadas por G418 se sembraron en pocillos que contenían medio de cultivo con G418 añadido en una placa de 96 pocillos, y se cultivaron adicionalmente durante 30 días. La expresión de HLA-A*1101 exógena en células C1R se verificó mediante análisis citométrico de flujo.

Selección de posibles péptidos derivados de URLC10

25 Péptidos 9meros y 10meros derivados de URLC10 que se unen a la molécula de HLA-A*1101 se predijeron usando el servidor de predicción de la unión "NetMHC3.2" (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus y cols., Tissue Antigens. noviembre 2003, 62(5): 378-84; Nielsen y cols., Protein Sci. mayo de 2003, 12(5): 1007-17; Bioinformatics junio de 2004 12: 20(9): 1388-97).

Síntesis de péptidos

30 Los péptidos se sintetizaron mediante Biosynthesis (Lewisville, Texas) según un método de síntesis en fase sólida estándar, y se purificaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase inversa. Los péptidos se analizaron con respecto a su pureza (> 90%) e identidad mediante HPLC analítica y espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en dimetilsulfóxido a 20 mg/ml y se almacenaron a -80°C.

Inducción de CTL *in vitro*

35 Se usaron células dendríticas (DCs) derivadas de monocitos como la célula presentadora de antígeno para inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra péptidos presentados sobre antígenos leucocitarios humanos (HLAs). Según se describe en las otras secciones, las DCs se generaban *in vitro* (Nakahara S y cols., Cancer Res 2003, 63(14): 4112-8). Específicamente, células mononucleares de sangre periférica aisladas de voluntarios sanos (positivas a HLA-A*1101) con la solución Ficoll-Paque plus (Pharmacia) se separaron al ligar a platos de cultivo tisular de plástico (Becton Dickinson) y se concentraron como una fracción de monocitos. La población concentrada en monocitos se cultivó en presencia de 1000 IU/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (R&D System) y 1000 IU/ml de interleucina (IL)-4 (R&D System) en un medio AIM-V (Invitrogen) que contiene 2% de suero autólogo (AS) termoinactivado. Después de siete días de cultivo, las DCs inducidas por citocina se impulsaron con 20 microgramos/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en un medio AIM-V a 37°C durante tres horas en presencia de 3 microgramos/ml de microglobulina beta 2. Las células generadas parecían expresar sobre su superficie celular moléculas asociadas a DC tales como CD80, CD83, CD86 y HLA clase II (datos no mostrados). Posteriormente, estas DCs impulsadas con péptido se inactivaron mediante irradiación de rayos X (20 Gy), y se mezclaron en una relación 1:20 con células T CD8⁺ autólogas obtenidas mediante selección positiva usando el CD8 Positive Isolation Kit (Dyna).
50 Estos productos de cultivo se sembraron en una placa de 48 pocillos (Corning). Cada pocillo se elaboró para contener 1,5 x 10⁴ DCs impulsadas con péptido, 3 x 10⁵ células T CD8⁺ y 10 ng/ml de IL-7 (R&D System) en 0,5 ml del medio

AIM-V/2%AS. Tres días más tarde, estos productos de cultivo se añadieron con una concentración final de 20 IU/ml de IL-2 (CHIRON). El día 7 y el día 14, las células T se estimularon adicionalmente con DCs autólogas impulsadas con péptido. Las DCs se prepararon cada vez mediante el mismo método que anteriormente. El día 21, después de la tercera estimulación con péptido, los CTLs se examinaron frente a C1R-A11 impulsada con péptido mediante un ensayo de inmunoabsorción por puntos con enzimas ligadas (ELISPOT) de interferón (IFN)-gamma humano (Tanaka H y cols., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y cols., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y cols., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506).

Procedimiento de propagación de CTL

Se propagaron CTLs en cultivo usando métodos similares a los divulgados por Riddell y cols. (Walter EA y cols., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR y cols., Nat Med 1996, 2(2): 216-23). Los CTLs se cocultivaron en un total de 25 ml de medio AIM-V que contenía 5% de AS (AIM-V/5%AS) y 40 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 con dos tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas tratadas con mitomicina C en 5×10^6 células/matraz. Un día después del comienzo del cultivo, se añadieron al cultivo 120 IU/ml de IL-2. Los días 5, 8 y 11, se añadió al cultivo un medio AIM-V/5%AS reciente que contenía 30 IU/ml de IL-2 (Tanaka H y cols., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y cols., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y cols., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506).

Establecimiento de clones de CTL

La dilución de CTLs se llevó a cabo para elaborar 0,3, 1 y 3 células/pocillo en placas de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos (Nalge Nunc International). Los CTLs se cocultivaron con dos tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas tratadas con mitomicina C en 1×10^4 células/pocillo en un total de 150 microlitros/pocillo de medio AIM-V/5%AS con 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 y 125 IU/ml de IL-2. Diez días más tarde, se añadió IL-2 al medio en 50 microlitros/pocillo para alcanzar una concentración final de 125 IU/ml. El día 14, se probó la actividad de CTL y los clones de CTL se propagaron usando el mismo método que se describe anteriormente (Uchida N y cols., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506).

Actividad de CTL específica

Para examinar la actividad de CTL específica, se realizaron un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma y un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) de IFN-gamma. Específicamente, se preparó C1R-A11 impulsada con péptido (1×10^4 células/pocillo) como la célula estimulante. Los CTLs inducidos, es decir líneas de CTL y clones de CTL, se usaron como la célula sensible. El ensayo ELISPOT de IFN-gamma y el ELISA de IFN-gamma se realizaron según el manual del fabricante.

Establecimiento de células diana que expresan forzosamente un gen diana y HLA-A*1101

Un ADNc que codifica el marco de lectura abierta de un gen diana o HLA-A*1101 se amplificó mediante PCR. El producto amplificado por PCR se clonó en un vector de expresión. Cualquiera o ambos del vector que expresa el gen diana y el vector que expresa HLA-A*1101 se transfectaron en COS7, que es una línea celular negativa para el gen diana y HLA, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Dos días después de la transfección, las células transfectadas se recogieron usando Versene (Invitrogen), y se usaron como la célula diana para el ensayo de actividad de CTL (5×10^4 células/pocillo).

Resultados

Predicción de péptidos que se unen a HLA-A*1101 derivados de URLC10

Las Tablas 1a y 1b muestran péptidos 9meros y péptidos 10meros derivados de URLC10 que se ha predicho que se unen a HLA-A*1101 en el orden descendente de afinidad de unión. Se seleccionó un total de 24 péptidos que tienen potencialmente una capacidad de unión a HLA-A*1101 y se investigó para determinar péptidos epitópicos.

[Tabla 1a]

Péptidos 9meros que se unen a HLA-A11 derivados de URLC10			
Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
98	RVWCHVCER	269	1
164	EPMPFFYLK	382	2
127	IAAVKIFPR	391	3
108	NTFECQNPR	531	4
64	LLLVALPR	789	5
131	KIFPRFFMV	857	6
144	SAGCAAMER	1492	7
7	RQAPAGGRR	8338	8
18	RGGRGSPYR	8884	9
167	PFFYLKCKK	9856	10
74	WTDANLTAR	10324	11

5

[Tabla 1b]

Péptidos 10meros que se unen a HLA-A11 derivados de URLC10			
Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
63	ALLVVALPR	78	12
132	IFPRFFMVAK	346	13
126	VIAAVKIFPR	361	14
143	CSAGCAAMER	538	15
149	AMERPKPEEK	543	16
183	GPPINSSVFK	1426	17
161	LLEPMPPFFY	1708	18
32	GARRLRRFQK	1877	19
108	NTFECQNPRR	2051	20
22	GSPYRPDPGR	2829	21
166	MPFFYLKCKK	3858	22
163	EEPMPFFYLK	4898	23
185	PINSSVFKEY	9286	24

La posición inicial indica el número de residuo de aminoácido desde el extremo N de KOC1. La constante de disociación [Kd (nM)] se deriva de "NetMHC 3.2".

10 Inducción de CTLs mediante los péptidos restringidos a HLA-A*1101 derivados de URLC10 predichos

Se generaron CTLs contra los péptidos derivados de URLC10 según el protocolo descrito en "Materiales y métodos". La actividad de CTL específica para el péptido se midió en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma (Fig. 1). En comparación con el control, los CTLs en el Pocillo nº 5 con URLC10-A11-9-98 (SEQ ID NO: 1) (a), el Pocillo nº 4 con URLC10-A11-9-18 (SEQ ID NO: 9) (b) y el Pocillo nº 3 con URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13) (c) mostraban una potente producción de IFN-gamma. Mientras tanto, a pesar de que los otros péptidos mostrados en las Tablas 1a y 1b tienen potencialmente una actividad de unión a HLA-A*1101, no se detectaba actividad de CTL específica como resultado de la estimulación por esos péptidos. Un ejemplo de datos negativos típicos es que la producción específica de IFN-gamma no se observaba a partir de CTLs estimulados con URLC10-A11-10-63 (SEQ ID NO: 12) (d). Como resultado, se seleccionaban tres tipos de péptidos derivados de URLC10 como péptidos capaces de inducir CTLs potentes.

Establecimiento de líneas y clones de CTL contra los péptidos restringidos a HLA-A*1101 derivados de URLC10

Se estableció una línea de CTL al propagar CTLs en el Pocillo nº 3 con URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13), que mostraba una actividad de CTL específica para el péptido en el ensayo ELISPOT de IFN-gamma. La actividad de CTL de esta línea de CTL se midió mediante ELISA de IFN-gamma (Fig. 2). Esta línea de CTL mostraba una potente producción de IFN-gamma contra células diana impulsadas con el péptido respectivo, en comparación con células diana que no se han impulsado con el péptido. Además, se estableció un clon de CTL a partir de la línea de CTL mediante dilución limitante según se describe en la sección de "Materiales y métodos" anterior, y la producción de IFN-gamma a partir del clon de CTL contra células C1R-A11 impulsadas con péptido se midió mediante ELISA de IFN-gamma. La producción potente de IFN-gamma se observó en el clon de CTL estimulado con URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13) (Fig. 3).

Actividad de CTL específica contra células diana que expresan URLC10 y HLA-A*1101

El clon de CTL establecido contra URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13) se investigó con respecto a su capacidad para reconocer células diana que expresan URLC10 y la molécula de HLA-A*1101. Se prepararon células COS7 transfectadas tanto con URLC10 de longitud completa como con el gen de HLA-A*1101 (un modelo específico de células diana que expresan URLC10 y el gen de HLA-A*1101) como la célula diana. Se prepararon células COS7 transfectadas bien con URLC10 de longitud completa o bien con HLA-A*1101 como el control. El clon de CTL estimulado con URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13) demostraba una potente actividad de CTL contra células COS7 que expresan tanto URLC10 como HLA-A*1101 (Fig. 4). Por otra parte, no se detectaba una actividad de CTL específica significativa contra las células de control. Estos datos probaban claramente que el péptido URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13) es un péptido generado a partir del procesamiento endógeno de URLC10, y se presenta sobre células diana con la molécula de HLA-A*1101 y es reconocido por CTLs. Estos resultados demostraban la posibilidad de que URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13) pueda ser adecuado como una vacuna para el cáncer para pacientes que tienen un cáncer que expresa URLC10.

Análisis de homología de péptidos antigénicos

CTLs estimulados con URLC10-A11-9-98 (SEQ ID NO: 1), URLC10-A11-9-18 (SEQ ID NO: 9) o URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13) demostraban una actividad de CTL específica significativa. Estos resultados se pueden deber al hecho de que las secuencias de URLC10-A11-9-98 (SEQ ID NO: 1), URLC10-A11-9-18 (SEQ ID NO: 9) y URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13) son homólogas a péptidos derivados de otras moléculas conocidas para sensibilizar el sistema inmunitario humano. A fin de excluir esta posibilidad, se realizó un análisis de homología al interrogar estas secuencias peptídicas usando el algoritmo BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). El resultado mostraba que no existía una secuencia que tuviera una homología significativa con las secuencias de URLC10-A11-9-98 (SEQ ID NO: 1), URLC10-A11-9-18 (SEQ ID NO: 9) y URLC10-A11-10-132 (SEQ ID NO: 13). Por lo tanto, para el conocimiento de los presentes inventores, casi no hay posibilidad de que estos péptidos puedan provocar una respuesta inmunitaria inintencionada contra otras moléculas no relacionadas. En conclusión, se identificaron nuevos péptidos epitópicos restringidos a HLA-A11 derivados de URLC10. Se demostró que los péptidos epitópicos derivados de URLC10 son aplicables para la inmunoterapia del cáncer.

[Ejemplo 2]Materiales y métodosLíneas celulares

C1R, una línea celular linfoblastoide B humana negativa a HLA-A y HLA-B, y COS7, una línea celular renal de mono verde africano, se adquirieron de ATCC.

Generación de células estimulantes con expresión estable de HLA-A*0301

Se usó C1R (C1R-A03) que expresa establemente HLA-A*0301 como una célula estimulante. Un ADNc que codifica el marco de lectura abierta de HLA-A*0301 se amplificó mediante PCR y se clonó en un vector de expresión. Las células C1R se transfectaron con el vector de expresión, y a continuación se seleccionaron usando G418 (Invitrogen) durante dos semanas. Las células seleccionadas por G418 se sembraron en pocillos que contenían medio de cultivo con G418 añadido en una placa de 96 pocillos, y se cultivaron adicionalmente durante 30 días. La expresión de HLA-A*0301 exógena en células C1R se verificó mediante análisis citométrico de flujo.

Selección de posibles péptidos derivados de URLC10

Péptidos 9meros y 10meros derivados de URLC10 que se unen a la molécula de HLA-A*0301 se predijeron usando el servidor de predicción de la unión "NetMHC3.2" (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus y cols., Tissue Antigens. noviembre 2003 Nov, 62(5): 378-84; Nielsen y cols., Protein Sci. mayo de 2003, 12(5): 1007-17; Bioinformatics junio de 2004 12: 20(9): 1388-97). Péptidos 11meros derivados de URLC10 que se unen a la molécula de HLA-A*0301 se predijeron usando el servidor de predicción de la unión "NetMHC3.4" (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus y cols., Tissue Antigens. noviembre 2003, 62(5): 378-84; Nielsen y cols., Protein Sci. mayo 2003, 12(5): 1007-17; Bioinformatics. 12 de junio de 2004, 20(9): 1388-97). Estos péptidos se sintetizaron mediante American Peptide Company (Sunnyvale, CA) según un método de síntesis en fase sólida estándar, y se purificaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase inversa. Los péptidos se analizaron con respecto a su pureza (> 90%) e identidad mediante HPLC analítica y espectrometría de masas, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en dimetilsulfóxido a 20 mg/ml y se almacenaron a -80°C.

Inducción de CTL *in vitro*

Se usaron células dendríticas (DCs) derivadas de monocitos como la célula presentadora de antígeno para inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra péptidos presentados sobre antígenos leucocitarios humanos (HLAs). Según se describe en las otras secciones, las DCs se generaban *in vitro* (Nakahara S y cols., Cancer Res 2003, 63(14): 4112-8). Específicamente, células mononucleares de sangre periférica aisladas de voluntarios sanos (positivas a HLA-A*0301) con la solución Ficoll-Paque plus (Pharmacia) se separaron al ligar a platos de cultivo tisular de plástico (Becton Dickinson) y se concentraron como una fracción de monocitos. La población concentrada en monocitos se cultivó en presencia de 1000 IU/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (R&D System) y 1000 IU/ml de interleucina (IL)-4 (R&D System) en un medio AIM-V (Invitrogen) que contiene 2% de suero autólogo (AS) termoinactivado. Después de siete días de cultivo, las DCs inducidas por citocina se impulsaron con 20 microgramos/ml de cada uno de los péptidos sintetizados en un medio AIM-V a 37°C durante tres horas en presencia de 3 microgramos/ml de microglobulina beta 2. Las células generadas parecían expresar sobre su superficie celular moléculas asociadas a DC tales como CD80, CD83, CD86 y HLA clase II (datos no mostrados). Posteriormente, estas DCs impulsadas con péptido se inactivaron mediante irradiación de rayos X (20 Gy), y se mezclaron en una relación 1:20 con células T CD8⁺ autólogas obtenidas mediante selección positiva usando el CD8 Positive Isolation Kit (Dyna). Estos productos de cultivo se sembraron en una placa de 48 pocillos (Corning). Cada pocillo se elaboró para contener 1,5 x 10⁴ DCs impulsadas con péptido, 3 x 10⁵ células T CD8⁺ cells y 10 ng/ml de IL-7 (R&D System) en 0,5 ml del medio AIM-V/2%AS. Tres días más tarde, estos productos de cultivo se añadieron con una concentración final de 20 IU/ml de IL-2 (CHIRON). El día 7 y el día 14, las células T se estimularon adicionalmente con DCs autólogas impulsadas con péptido. Las DCs se prepararon cada vez mediante el mismo método que anteriormente. El día 21, después de la tercera estimulación con péptido, los CTLs se examinaron frente a C1R-A03 impulsada con péptido mediante un ensayo de inmunoabsorción por puntos con enzimas ligadas (ELISPOT) de interferón (IFN)-gamma humano (Tanaka H y cols., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y cols., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y cols., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506).

Procedimiento de propagación de CTL

Se propagaron CTLs en cultivo usando métodos similares a los divulgados por Riddell y cols. (Walter EA y cols., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR y cols., Nat Med 1996, 2(2): 216-23). Los CTLs se cocultivaron en un total de 25 ml de medio AIM-V que contenía 5% de AS (AIM-V/5%AS) y 40 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 con dos tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas tratadas con mitomicina C en 5 x 10⁶ células/matraz. Un día después del comienzo del cultivo, se añadieron al cultivo 120 IU/ml de IL-2. Los días 5, 8 y 11, se añadió al cultivo un medio AIM-V/5%AS reciente que contenía 30 IU/ml de IL-2 (Tanaka H y cols., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y y cols., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N y cols., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506).

Establecimiento de clones de CTL

La dilución de CTLs se llevó a cabo para elaborar 1 y 10 células/pocillo en placas de microvaloración de fondo redondo de 96 pocillos (Nalge Nunc International). Los CTLs se cocultivaron con dos tipos de líneas celulares linfoblastoides B humanas tratadas con mitomicina C en 1 x 10⁴ células/pocillo en un total de 150 microlitros/pocillo de medio AIM-V que contenía 5% de AS (AIM-V/5%AS) con 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 y 125 IU/ml de IL-2. Diez días más tarde, se añadió IL-2 al medio en 50 microlitros/pocillo para alcanzar una concentración final de 125 IU/ml. El día 14, se probó la actividad de CTL y los clones de CTL se propagaron usando el mismo método que se describe anteriormente (Uchida N y cols., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T y cols., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T y cols., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506).

Actividad de CTL específica

Para examinar la actividad de CTL específica, se realizaron un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma y un ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas (ELISA) de IFN-gamma. Específicamente, se preparó C1R-A03 impulsada con péptido (1×10^4 células/pocillo) como la célula estimulante. Los CTLs inducidos, es decir líneas de CTL y clones de CTL, se usaron como la célula sensible. El ensayo ELISPOT de IFN-gamma y el ELISA de IFN-gamma se realizaron según el manual del fabricante.

Establecimiento de células diana que expresan forzosamente un gen diana y HLA-A*0301

Un ADNc que codifica el marco de lectura abierta de un gen diana o HLA-A*0301 se amplificó mediante PCR. El producto amplificado por PCR se clonó en un vector de expresión. Cualquiera o ambos del vector que expresa el gen diana y el vector que expresa HLA-A* 0301 se transfectaron en COS7, que es una línea celular negativa para el gen diana y HLA, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Dos días después de la transfección, las células transfectadas se recogieron usando Versene (Invitrogen), y se usaron como la célula diana para el ensayo de actividad de CTL (5×10^4 células/pocillo).

Resultados

Predicción de péptidos que se unen a HLA-A*0301 derivados de URLC10

Las Tablas 2a, 2b y 2c muestran péptidos 9meros, péptidos 10meros y péptidos 11meros derivados de URLC10 que se ha predicho que se unen a HLA-A*0301 en el orden descendente de afinidad de unión. Se seleccionó un total de 22 péptidos que tienen potencialmente una capacidad de unión a HLA-A*0301 y se investigó para determinar péptidos epitópicos.

[Tabla 2a]

Péptidos 9meros que se unen a HLA-A03 derivados de URLC10			
Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
64	LLLVALPR	399	5
98	RVWCHVCER	456	1
131	KIFPRFFMV	1257	6
170	YLCCKIRY	3954	25
7	RQAPAGGRR	4267	8
127	IAAVKIFPR	5768	3
18	RGGRGSPYR	6629	9

[Tabla 2b]

Péptidos 10meros que se unen a HLA-A03 derivados de URLC10			
Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
63	ALLVVALPR	114	12
132	IFPRFFMVAK	369	13
166	MPFFYLCCK	1042	22
126	VIAAVKIFPR	1081	14
149	AMERPKPEEK	1184	16
161	LLEEMPFFY	1752	18
32	GARRLRFFQK	1847	19
143	CSAGCAAMER	2167	15
131	KIFPRFFMVA	2463	26
204	GLWLAILLLL	3495	27

Péptidos 10meros que se unen a HLA-A03 derivados de URLC10			
Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
183	GPPINSSVFK	3956	17
58	TMALLALLV	4549	28
57	GTMALLALLL	5698	29
209	ILLLLASIAA	6128	30

[Tabla 2c]

Péptidos 11meros que se unen a HLA-A03 derivados de URLC10			
Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Kd (nM)	SEQ ID NO
131	KIFPRFFMV AK	75	31

- 5 La posición inicial indica el número de residuo de aminoácido desde el extremo N de URLC10. La constante de disociación [Kd (nM)] se deriva de "NetMHC 3.2" (péptidos 9meros y 10meros) o de "NetMHC 3.4" (péptido 11mero).

Inducción de CTLs mediante los péptidos restringidos a HLA-A*0301 derivados de URLC10 predichos

- Se generaron CTLs contra los péptidos derivados de URLC10 según el protocolo descrito en "Materiales y métodos". La actividad de CTL específica para el péptido se midió en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma (Fig. 5). En comparación con el control, el Pocillo nº 2 con URLC10-A03-9-64 (SEQ ID NO: 5) (a), el Pocillo nº 5 con URLC10-A03-9-98 (SEQ ID NO: 1) (b), el Pocillo nº 3 con URLC10-A03-9-131 (SEQ ID NO: 6) (c), el Pocillo nº 1 con URLC10-A03-9-127 (SEQ ID NO: 3) (d), el Pocillo nº 6 con URLC10-A03-10-63 (SEQ ID NO: 12) (e), el Pocillo nº 3 con URLC10-A03-10-166 (SEQ ID NO: 22) (f), el Pocillo nº 5 con URLC10-A03-10-126 (SEQ ID NO: 14) (g), el Pocillo nº 1 con URLC10-A03-10-149 (SEQ ID NO: 16) (h), el Pocillo nº 1 con URLC10-A03-10-161 (SEQ ID NO: 18) (i), el Pocillo nº 1 con URLC10-A03-10-143 (SEQ ID NO: 15) (j), el Pocillo nº 2 con URLC10-A03-10-204 (SEQ ID NO: 27) (k), el Pocillo nº 2 con URLC10-A03-10-183 (SEQ ID NO: 17) (l), el Pocillo nº 1 con URLC10-A03-10-209 (SEQ ID NO: 30) (m) y el Pocillo nº 5 con URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) (n) mostraban una potente producción de IFN-gamma. Mientras tanto, a pesar de que los otros péptidos mostrados en la Tabla 2a, la Tabla 2b y la Tabla 2c tienen potencialmente una actividad de unión a HLA-A*0301, no se detectaba actividad de CTL específica como resultado de la estimulación por esos péptidos. Un ejemplo de datos negativos típicos es que la producción específica de IFN-gamma no se observaba a partir de CTLs estimulados con URLC10-A03-9-7 (SEQ ID NO: 8) (o). Como resultado, se seleccionaban catorce tipos de péptidos derivados de URLC10 como péptidos capaces de inducir CTLs potentes.

Establecimiento de líneas y clones de CTL contra los péptidos restringidos a HLA-A*0301 derivados de URLC10

- Se establecieron líneas de CTL al propagar CTLs en el Pocillo nº 3 con URLC10-A03-10-166 (SEQ ID NO: 22) y el Pocillo nº 5 con URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31), que han demostrado actividades de CTL específicas de péptido en el ensayo ELISPOT de IFN-gamma. La actividad de CTL de estas líneas de CTL se midió mediante ELISA de IFN-gamma (Fig. 6). Estas líneas de CTL mostraban una potente producción de IFN-gamma contra células diana impulsadas con los péptidos respectivos, en comparación con células diana que no se han impulsado con los péptidos. Además, se establecieron clones de CTL a partir de las líneas de CTL mediante dilución limitante según se describe en la sección de "Materiales y métodos" anterior, y la producción de IFN-gamma a partir de los clones de CTL contra células C1R-A03 impulsadas con el péptido respectivo se midió mediante ELISA de IFN-gamma. La producción potente de IFN-gamma se observó en los clones de CTL estimulados con URLC10-A03-10-166 (SEQ ID NO: 22) o URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) (Fig. 7).

Actividad de CTL específica contra células diana que expresan URLC10 y HLA-A*0301

- El clon de CTL establecido contra URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) se investigó con respecto a su capacidad para reconocer células diana que expresan URLC10 y la molécula de HLA-A*0301. Se prepararon células COS7 transfectadas tanto con URLC10 de longitud completa como con el gen de HLA-A*0301 (un modelo específico de células diana que expresan URLC10 y el gen de HLA-A*0301) como la célula diana. Se prepararon células COS7 transfectadas bien con URLC10 de longitud completa o bien con HLA-A*0301 como el control. El clon de CTL estimulado con URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) demostraba una potente actividad de CTL contra células COS7 que expresan tanto URLC10 como HLA-A*0301 (Fig. 8). Por otra parte, no se detectaba una actividad de CTL específica significativa contra las células de control. Estos datos probaban claramente que el péptido URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) es un péptido generado a partir del procesamiento endógeno de URLC10, y se presenta

sobre células diana con la molécula de HLA-A*0301 y es reconocido por CTLs. Estos resultados demostraban la posibilidad de que URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) pueda ser adecuado como una vacuna para el cáncer para pacientes que tienen un cáncer que expresa URLC10.

Análisis de homología de péptidos antigénicos

5 CTLs estimulados con URLC10-A03-9-64 (SEQ ID NO: 5), URLC10-A03-9-98 (SEQ ID NO: 1), URLC10-A03-9-131 (SEQ ID NO: 6), URLC10-A03-9-127 (SEQ ID NO: 3), URLC10-A03-10-63 (SEQ ID NO: 12), URLC10-A03-10-166 (SEQ ID NO: 22), URLC10-A03-10-126 (SEQ ID NO: 14), URLC10-A03-10-149 (SEQ ID NO: 16), URLC10-A03-10-161 (SEQ ID NO: 18), URLC10-A03-10-143 (SEQ ID NO: 15), URLC10-A03-10-204 (SEQ ID NO: 27), URLC10-A03-10-183 (SEQ ID NO: 17), URLC10-A03-10-209 (SEQ ID NO: 30) o URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) demostraban
10 una actividad de CTL específica significativa. Estos resultados se pueden deber al hecho de que las secuencias de URLC10-A03-9-64 (SEQ ID NO: 5), URLC10-A03-9-98 (SEQ ID NO: 1), URLC10-A03-9-131 (SEQ ID NO: 6), URLC10-A03-9-127 (SEQ ID NO: 3), URLC10-A03-10-63 (SEQ ID NO: 12), URLC10-A03-10-166 (SEQ ID NO: 22), URLC10-A03-10-126 (SEQ ID NO: 14), URLC10-A03-10-149 (SEQ ID NO: 16), URLC10-A03-10-161 (SEQ ID NO: 18), URLC10-A03-10-143 (SEQ ID NO: 15), URLC10-A03-10-204 (SEQ ID NO: 27), URLC10-A03-10-183 (SEQ ID NO: 17), URLC10-A03-10-209 (SEQ ID NO: 30) y URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31) son homólogas a péptidos
15 derivados de otras moléculas conocidas para sensibilizar el sistema inmunitario humano. A fin de excluir esta posibilidad, se realizó un análisis de homología al interrogar estas secuencias peptídicas usando el algoritmo BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). El resultado mostraba que no existía una secuencia que tuviera una homología significativa con las secuencias de URLC10-A03-9-64 (SEQ ID NO: 5), URLC10-A03-9-98 (SEQ ID NO: 1), URLC10-A03-9-131 (SEQ ID NO: 6), URLC10-A03-9-127 (SEQ ID NO: 3), URLC10-A03-10-63 (SEQ ID NO: 12), URLC10-A03-10-166 (SEQ ID NO: 22), URLC10-A03-10-126 (SEQ ID NO: 14), URLC10-A03-10-149 (SEQ ID NO: 16), URLC10-A03-10-161 (SEQ ID NO: 18), URLC10-A03-10-143 (SEQ ID NO: 15), URLC10-A03-10-204 (SEQ ID NO: 27), URLC10-A03-10-183 (SEQ ID NO: 17), URLC10-A03-10-209 (SEQ ID NO: 30), y URLC10-A03-11-131 (SEQ ID NO: 31). Por lo tanto, para el conocimiento de los presentes inventores, casi no hay posibilidad de que estos péptidos
20 puedan provocar una respuesta inmunitaria inintencionada contra otras moléculas no relacionadas. En conclusión, se identificaron nuevos péptidos epitópicos restringidos a HLA-A03 derivados de URLC10. Se demostró que los péptidos epitópicos derivados de URLC10 son aplicables para la inmunoterapia del cáncer.

[Ejemplo 3]

Preparación de formulaciones en emulsión

30 Un péptido se disolvió en un disolvente para inyección o una solución salina fisiológica estéril para llegar a de 1,0 mg/ml a 10,0 mg/ml, y se recogió en una jeringa. Esta estaba conectada a través de un conector a una jeringa cargada con IFA en una cantidad equivalente a un disolvente para inyección o una solución salina fisiológica estéril, y se mezclaron al empujar alternativamente los émbolos de las dos jeringas conectadas. Después de varios minutos de
35 mezclado, la finalización de la emulsión se valoró mediante el método de prueba de la gota. El método de prueba de la gota se puede realizar al dejar caer una gota de la muestra mezclada sobre agua. La emulsión se valora como completa cuando la muestra caída sobre agua no se difunde inmediatamente en agua; y la emulsión se valora como incompleta cuando la muestra caída sobre agua se difunde inmediatamente en agua. Cuando la emulsión se valora como incompleta, se lleva a cabo mezclado adicional para completar la emulsión. La emulsión completa se puede administrar a un paciente con cáncer mediante inyección subcutánea. El paciente con cáncer sometido a la
40 administración se puede seleccionar de pacientes afectados por cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, tumor de tejidos blandos, o similares.

Preparación de formulaciones liofilizadas

45 Un péptido se disolvió en un disolvente para inyección para llegar a de 1,0 mg/ml a 10,0 mg/ml, y se esterilizó mediante filtración. Esto se cargó en un vial esterilizado, y se tapó a medias con un tapón de caucho esterilizado. Después de que este vial se liofilizara, se tapó completamente y se selló con una tapa de aluminio para producir una formulación liofilizada. Cuando estaba en uso, un disolvente para inyección o solución salina fisiológica estéril se inyectó en el vial para redissolver el polvo liofilizado. La solución redissuelta en el vial se recogió usando una jeringa y la jeringa se conectó
50 a través de un conector con una jeringa cargada con un IFA en una cantidad equivalente a la solución redissuelta recogida. La solución redissuelta y el IFA se mezclaron empujando alternativamente los émbolos de las dos jeringas conectadas. Después de varios minutos de mezclado, se valoró la finalización de la emulsión mediante el método de prueba de la gota. La emulsión completada se puede administrar a un paciente con cáncer mediante inyección subcutánea. El paciente con cáncer sometido a la administración se puede seleccionar de pacientes afectados por
55 cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer

gástrico, cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, tumor de tejidos blandos, o similares.

Aplicabilidad industrial

5 La presente invención proporciona nuevos péptidos epitópicos restringidos a HLA-A11 y restringidos a HLA-A03
derivados de URLC10 que inducen una respuesta inmunitaria antitumoral potente y específica y así tienen aplicabilidad
para una amplia variedad de tipos de cáncer. Los péptidos, las composiciones, las APCs y los CTLs en la presente
invención se pueden usar como una vacuna peptídica para un cáncer que exprese URLC10, por ejemplo, cáncer de
vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico,
10 cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de
cabeza y cuello y tumor de tejidos blandos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

15 <120> PÉPTIDOS DE URLC10 Y VACUNAS QUE INCLUYEN LOS MISMOS

<130> ONC-A1503P

<150> JP 2014-158925

20 <151> 2014-08-04

<160> 38

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> un péptido derivado de URLC10

<400> 1

40 Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg
1 5

<210> 2

45 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> un péptido derivado de URLC10

55 <400> 2

Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys
1 5

<210> 3

<211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> un péptido derivado de URLC10
 <400> 3
 Ile Ala Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg
 1 5
 15 <210> 4
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> un péptido derivado de URLC10
 <400> 4
 Asn Thr Phe Glu Cys Gln Asn Pro Arg
 1 5
 30 <210> 5
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> un péptido derivado de URLC10
 <400> 5
 45 Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg
 1 5
 <210> 6
 50 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> un péptido derivado de URLC10
 60 <400> 6
 Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> un péptido derivado de URLC10
 <400> 7
 15 **Ser Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg**
 1 5
 <210> 8
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> un péptido derivado de URLC10
 30 <400> 8
Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg
 1 5
 <210> 9
 35 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de URLC10
 45 <400> 9
Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg
 1 5
 50 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> un péptido derivado de URLC10
 <400> 10

Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys
 1 5
 <210> 11
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> un péptido derivado de URLC10
 15 <400> 11
Trp Thr Asp Ala Asn Leu Thr Ala Arg
 1 5
 <210> 12
 20 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> un péptido derivado de URLC10
 30 <400> 12
Ala Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg
 1 5 10
 35 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> un péptido derivado de URLC10
 <400> 13
Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys
 1 5 10
 50 <210> 14
 <211> 10
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> un péptido derivado de URLC10

<400> 14

Val Ile Ala Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg
1 5 10

5 <210> 15

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> un péptido derivado de URLC10

<400> 15

Cys Ser Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg
1 5 10

20 <210> 16

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> un péptido derivado de URLC10

<400> 16

Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys
1 5 10

35 <210> 17

<211> 10

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> un péptido derivado de URLC10

<400> 17

50 Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys
1 5 10

<210> 18

55 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> un péptido derivado de URLC10

<400> 18

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

<210> 19

$\langle 211 \rangle$ 10

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 $\langle 220 \rangle$

<223> un péptido derivado de URLC10

<400> 19

20 Gly Ala Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys
1 5 10

<210> 20

25 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30
<220>

<223> un péptido derivado de URLC10

35 <400> 20

Asn Thr Phe Glu Cys Gln Asn Pro Arg Arg
1 5 10

<210> 21

40 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> un péptido derivado de URLC10

50
<400> 21

Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg
1 5 10

55 <210> 22

$\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> un péptido derivado de URLC10

5 <400> 22

Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys
1 5 10

<210> 23

10 <211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> un péptido derivado de URLC10

20 <400> 23

Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys
1 5 10

25 <210> 24

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> un péptido derivado de URLC10

<400> 24

Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys Glu Tyr
1 5 10

40 <210> 25

<211> 9

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> un péptido derivado de URLC10

<400> 25

Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile Arg Tyr
55 1 5

<210> 26

<211> 10

60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> un péptido derivado de URLC10

<400> 26

Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala
 1 5 10

10 <210> 27

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> un péptido derivado de URLC10

<400> 27

Gly Leu Trp Leu Ala Ile Leu Leu Leu Leu
 1 5 10

25 <210> 28

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> un péptido derivado de URLC10

<400> 28

40 **Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu Leu Leu Val**
 1 5 10

<210> 29

45 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> un péptido derivado de URLC10

55 <400> 29

Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10

60 <210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> un péptido derivado de URLC10

<400> 30

10 **Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala**
1 5 10

<210> 31

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> un péptido derivado de URLC10

25 <400> 31

Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys
1 5 10

<210> 32

30 <211> 22

<212> DNA

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

40 <400> 32

gtctaccagg cattcgcttc at 22

45 <210> 33

<211> 24

<212> DNA

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> un cebador de PCR para el análisis por TCR

<400> 33

tcagctggac cacagccgca gcgt 24

60 <210> 34

<211> 21

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> un cebador de PCR para el análisis por TCR
 <400> 34
 10 tcagaaatcc ttctcttga c 21
 <210> 35
 15 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> un cebador de PCR para el análisis por TCR
 25 <400> 35
 ctagcctctg gaatccttgc tctt 24
 <210> 36
 30 <211> 765
 <212> DNA
 35 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 40 <222> (57)..(728)
 <400> 36

```

acaaggcggg actcagaacc ggcgttcagg gccgccagcg gccgcgaggc cctgag atg      59
                                     Met
                                     1

agg ctc caa aga ccc cga cag gcc ccg gcg ggt ggg agg cgc gcg ccc      107
Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg Ala Pro
                    5                      10                      15

cgg ggc ggg cgg ggc tcc ccc tac cgg cca gac ccg ggg aga ggc gcg      155
Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg Gly Ala
                    20                      25                      30

cgg agg ctg cga agg ttc cag aag ggc ggg gag ggg gcg ccg cgc gct      203
Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala
                    35                      40                      45

gac cct ccc tgg gca ccg ctg ggg acg atg gcg ctg ctc gcc ttg ctg      251
Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu Leu
                    50                      55                      60                      65

ctg gtc gtg gcc cta ccg cgg gtg tgg aca gac gcc aac ctg act gcg      299
Leu Val Val Ala Leu Pro Arg Val Trp Thr Asp Ala Asn Leu Thr Ala
                    70                      75                      80

aga caa cga gat cca gag gac tcc cag cga acg gac gag ggt gac aat      347
Arg Gln Arg Asp Pro Glu Asp Ser Gln Arg Thr Asp Glu Gly Asp Asn
                    85                      90                      95

aga gtg tgg tgt cat gtt tgt gag aga gaa aac act ttc gag tgc cag      395
Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg Glu Asn Thr Phe Glu Cys Gln
                    100                      105                      110

aac cca agg agg tgc aaa tgg aca gag cca tac tgc gtt ata gcg gcc      443
Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr Cys Val Ile Ala Ala
                    115                      120                      125

gtg aaa ata ttt cca cgt ttt ttc atg gtt gcg aag cag tgc tcc gct      491
Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys Gln Cys Ser Ala
                    130                      135                      140                      145

ggt tgt gca gcg atg gag aga ccc aag cca gag gag aag cgg ttt ctc      539
Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys Arg Phe Leu
                    150                      155                      160

ctg gaa gag ccc atg ccc ttc ttt tac ctc aag tgt tgt aaa att cgc      587
Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile Arg
                    165                      170                      175

tac tgc aat tta gag ggg cca cct atc aac tca tca gtg ttc aaa gaa      635
Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys Glu
                    180                      185                      190

tat gct ggg agc atg ggt gag agc tgt ggt ggg ctg tgg ctg gcc atc      683
Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly Leu Trp Leu Ala Ile
                    195                      200                      205

ctc ctg ctg ctg gcc tcc att gca gcc ggc ctc agc ctg tct tga      728
Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ser
                    210                      215                      220

gccacggggac tgccacagac tgagccttcc ggagcat      765

```

5 <210> 37

<211> 223

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 37

ES 2 856 834 T3

Met Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg Ala
1 5 10 15

Pro Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg Gly
20 25 30

Ala Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu Gly Ala Pro Arg
35 40 45

Ala Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu
50 55 60

Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg Val Trp Thr Asp Ala Asn Leu Thr
65 70 75 80

Ala Arg Gln Arg Asp Pro Glu Asp Ser Gln Arg Thr Asp Glu Gly Asp
85 90 95

Asn Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg Glu Asn Thr Phe Glu Cys
100 105 110

Gln Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr Cys Val Ile Ala
115 120 125

Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys Gln Cys Ser
130 135 140

Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys Arg Phe
145 150 155 160

Leu Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile
165 170 175

Arg Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys
180 185 190

Glu Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly Leu Trp Leu Ala
195 200 205

Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ser
210 215 220

5 <210> 38

<211> 4

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> un péptido conector

<400> 38

Asn Lys Arg Lys
1

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado de menos de 15 aminoácidos que tiene capacidad inductora de células T citotóxicas (CTL), en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de (a) o (b) posterior:
 - 5 (a) la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13, 1 y 9; o
 - (b) la secuencia de aminoácidos en la que uno, dos, tres o cuatro aminoácidos están sustituidos en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13, 1 y 9, en donde las una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido se seleccionan del grupo que consiste en (i) a (iv) posteriormente:
 - 10 (i) el segundo aminoácido desde el extremo N se sustituye por treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o tirosina;
 - (ii) el tercer aminoácido desde el extremo N se sustituye por leucina, fenilalanina, tirosina, isoleucina o alanina;
 - (iii) el séptimo aminoácido desde el extremo N se sustituye por leucina, isoleucina, tirosina, valina o fenilalanina; y
 - 15 (iv) el aminoácido C-terminal se sustituye por lisina o arginina.
2. El péptido según la reivindicación 1, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13, 1 y 9.
- 20 3. Un polinucleótido aislado que codifica el péptido según la reivindicación 1 o 2.
4. Una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en (a) a (e) posteriormente:
 - 25 (a) uno o más tipos de péptidos según la reivindicación 1 o 2;
 - (b) uno o más tipos de polinucleótidos que codifican el péptido o los péptidos según la reivindicación 1 o 2 en una forma expresable;
 - (c) una célula presentadora de antígeno (APC) que presenta sobre su superficie un complejo del péptido según la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA;
 - 30 (d) un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo del péptido según la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA; y
 - (e) un CTL que se dirige al péptido según la reivindicación 1 o 2.
5. La composición según la reivindicación 4, en donde la composición es una composición para el uso en la inducción de un CTL o CTLs, en donde el ingrediente es al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en (a) a (d) posteriormente:
 - 35 (a) uno o más tipos de péptidos según la reivindicación 1 o 2;
 - (b) uno o más tipos de polinucleótidos que codifican el péptido o los péptidos según la reivindicación 1 o 2 en una forma expresable;
 - 40 (c) una célula presentadora de antígeno (APC) que presenta sobre su superficie celular un complejo del péptido según la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA; y
 - (d) un exosoma que presenta sobre su superficie celular un complejo del péptido según la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA.
 - 45
6. La composición según la reivindicación 4, que es una composición farmacéutica.
7. La composición según la reivindicación 6, en donde la composición es una composición para el uso en el tratamiento del cáncer, la prevención (profilaxis) del cáncer y/o la prevención (profilaxis) de la recaída posoperatoria del cáncer.
- 50 8. La composición para el uso según la reivindicación 7, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, osteosarcoma, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello y tumor de tejidos blandos
- 55 9. La composición para el uso según la reivindicación 7 u 8, en donde la composición se formula para la administración a un sujeto positivo para HLA-A11.
10. Un método *in vitro* o *ex vivo* para inducir una APC o APCs que tienen capacidad inductora de CTL, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
 - 60 (a) poner en contacto una APC o APCs con el péptido según la reivindicación 1 o 2 *in vitro* o *ex vivo*; y
 - (b) introducir un polinucleótido que codifica el péptido según la reivindicación 1 o 2 en una APC o APCs.
11. Un método *in vitro* para inducir un CTL o CTLs, en donde el método comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:
- 65

- (a) cocultivar una célula o células T positivas a CD8 con una APC o APCs que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido según la reivindicación 1 o 2;
- 5 (b) cocultivar una célula o células T positivas a CD8 con un exosoma o exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido según la reivindicación 1 o 2; y
- (c) introducir en una célula o células T positivas a CD8 un polinucleótido que codifica cada subunidad de un receptor de células T (TCR) capaz de unirse al péptido según la reivindicación 1 o 2 presentado por un antígeno HLA sobre una superficie celular.
- 10 12. Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido según la reivindicación 1 o 2, que es inducida mediante el método según la reivindicación 10.
13. Un CTL aislado que se dirige al péptido según la reivindicación 1 o 2, que es inducido por el método según la reivindicación 11.
- 15 14. Una composición para el uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra el cáncer, en donde la composición comprende al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en (a) a (e) posteriormente:
- (a) uno o más tipos de péptidos según la reivindicación 1 o 2;
- 20 (b) uno o más tipos de polinucleótidos que codifican el péptido o los péptidos según la reivindicación 1 o 2 en una forma expresable;
- (c) una célula presentadora de antígeno (APC) que presenta sobre su superficie celular un complejo del péptido según la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA;
- (d) un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo del péptido según la reivindicación 1 o 2 y un antígeno HLA; y
- 25 (e) un CTL que se dirige al péptido según la reivindicación 1 o 2.

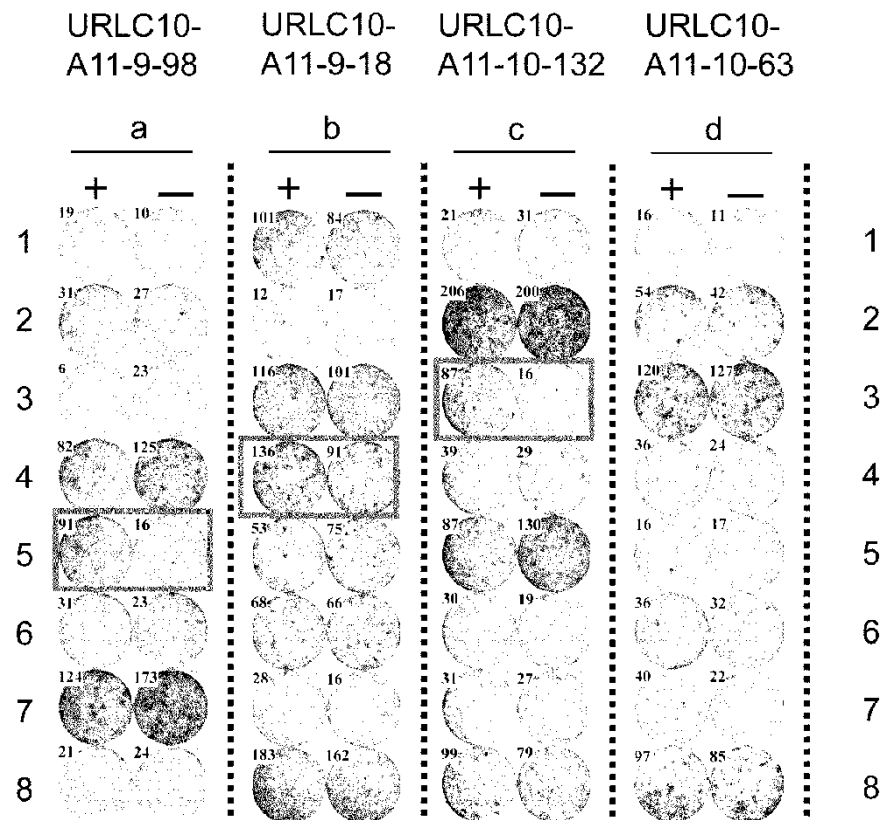


FIG. 1

URLC10-A11-10-132 #3

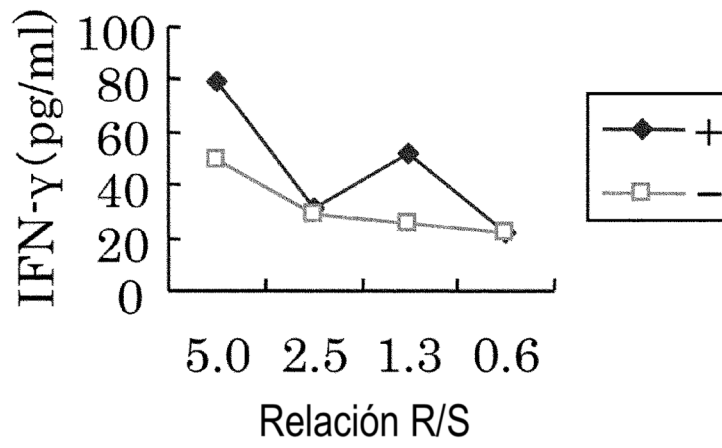


FIG. 2

URLC10-A11-10-132 #3

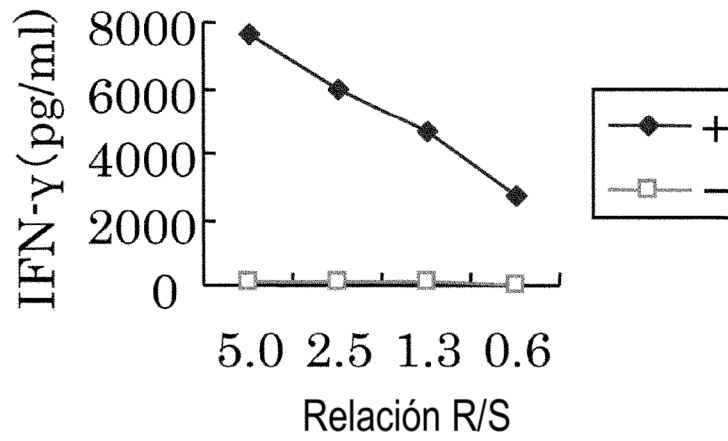


FIG. 3

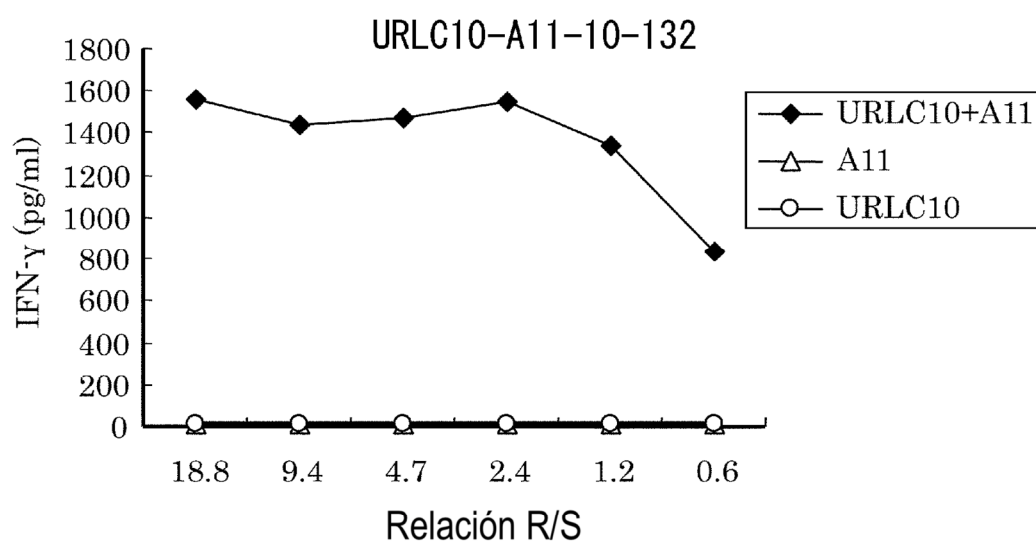


FIG. 4

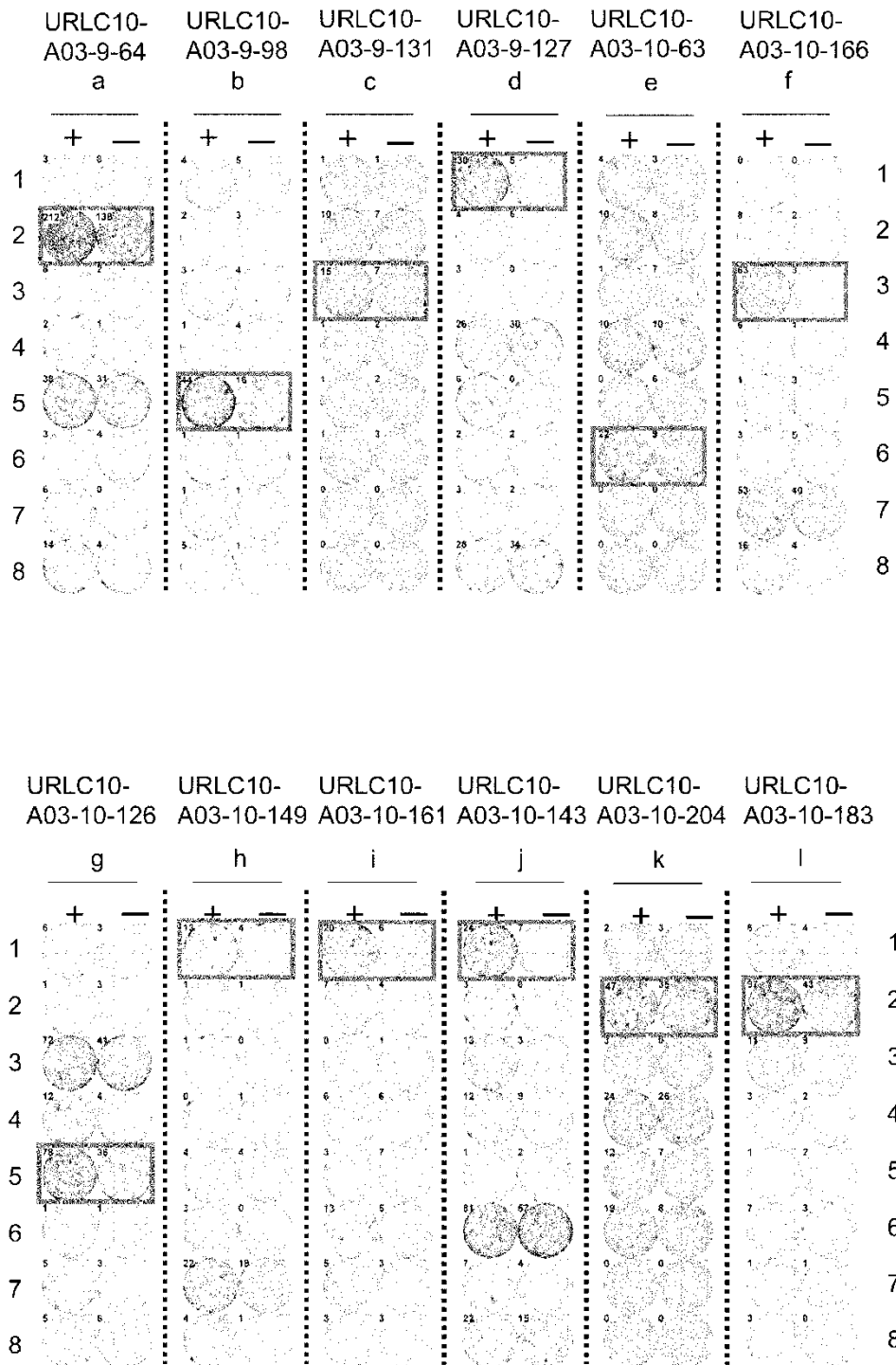


FIG. 5-1

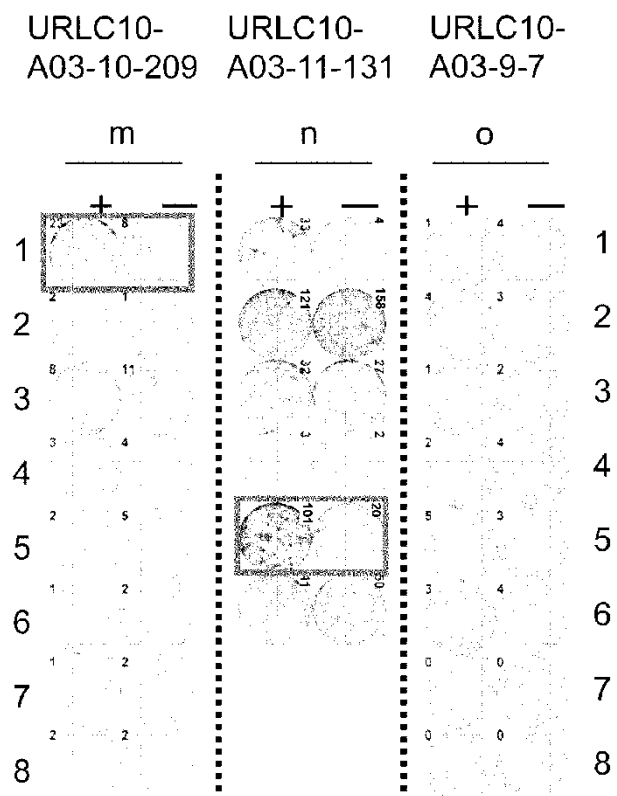
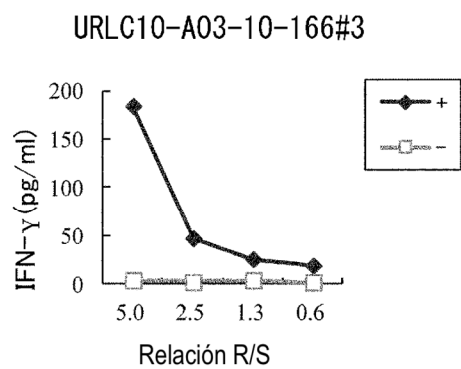


FIG. 5-2

a



b

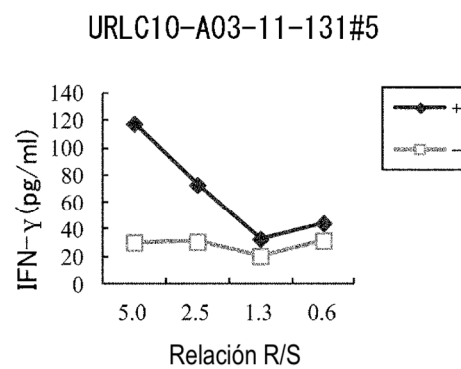
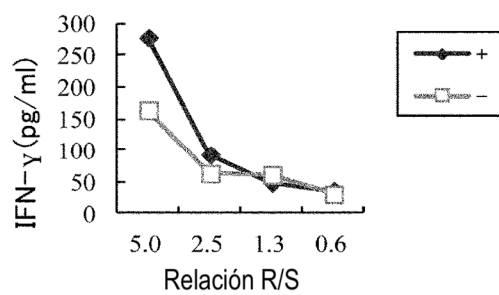


FIG. 6

a

URLC10-A03-10-166 #3



b

URLC10-A03-11-131 #5

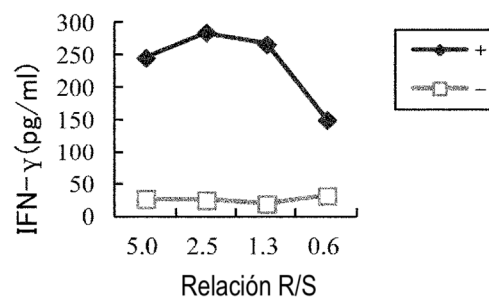


FIG. 7

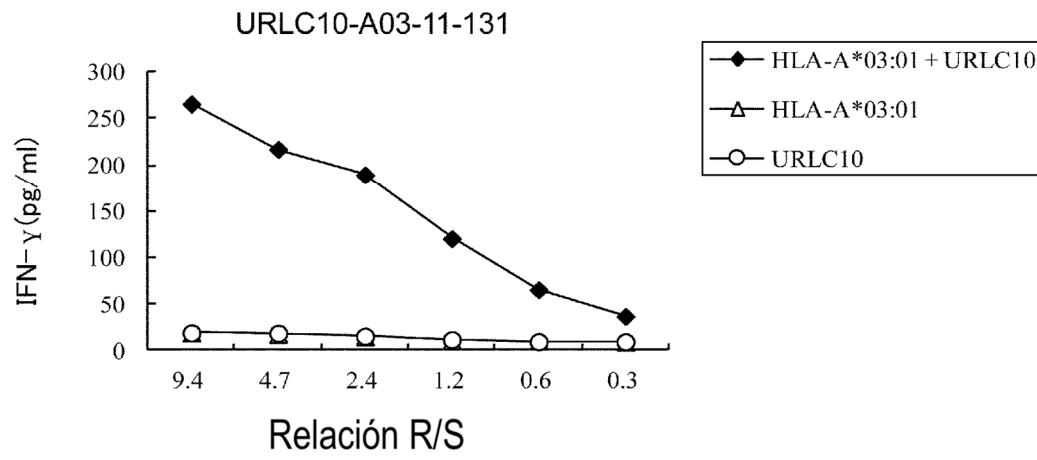


FIG. 8