



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-050897- -00000-0000

Fecha: 2011-04-26 15:30:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

SOLICITUD



PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N°

11-50897

54. TÍTULO PÉPTIDO-EPÍTOPE RAB6KIFL/KIF20A Y VACUNAS QUE
CONTIENEN EL MISMO.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 15/09

71. SOLICITANTE ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

DOMICILIO Kawasaki-shi, Kanagawa, Japón.

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

27-05-2011



No. 11-050897-00000-0000

Fecha: 2011-04-26 15:30:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.**

Dirección: 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku,
Kawasaki-shi, Kanagawa, 2130012, Japón.

Nacionalidad o domicilio: Kawasaki-shi,
Kanagawa, Japón.

Lugar de Constitución: Japón.

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: **DILIA MARÍA RODRÍGUEZ**
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **VER HOJA ANEXA**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/JP2009/005382 Fecha 15 de octubre de 2009

Publicación Internacional No. WO 2010/047062 A1 Fecha 29 de abril de 2010

6 **TÍTULO (54)** PÉPTIDO-EPÍTOPE RAB6KIFL/KIF20A Y VACUNAS QUE CONTIENEN EL MISMO.

7 **Clasificación Internacional (51)** C12N 15/09

8 **Prioridad**

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

(32) Fecha

22 de octubre de 2008

(31) Número de Solicitud

61/197,106

9 **Comprobante de pago No.** 11-35999 // 11-26852 // 11-36187

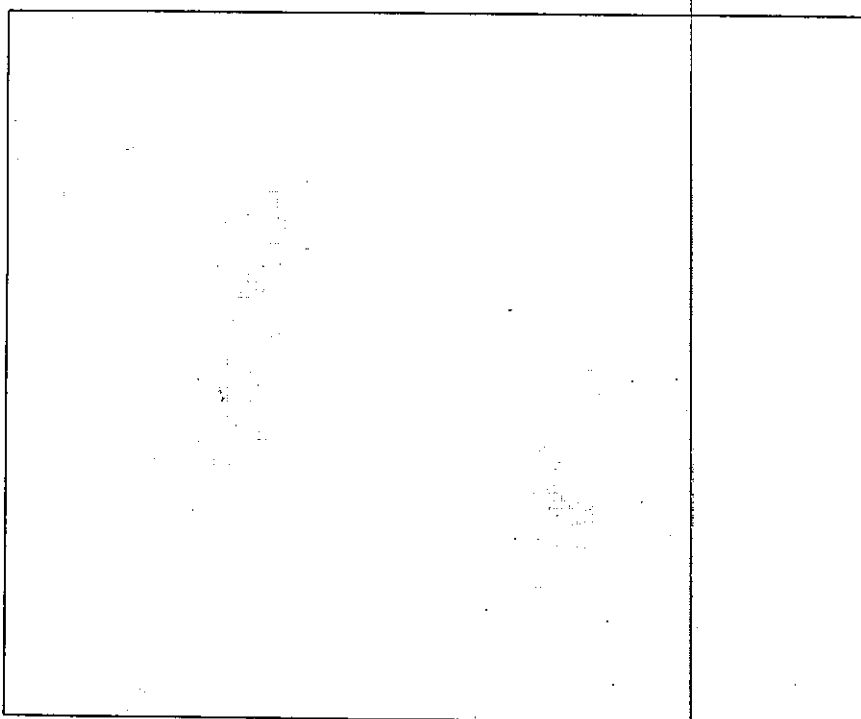
Fecha 15 de abril de 2011 // 25 de marzo de 2011

10

ANEXOS

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0035999

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Abril 15 de 2011 - 18:03:59

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	431342063	15/04/2011	108.185.000.00

*** Conceptos Pagados ***

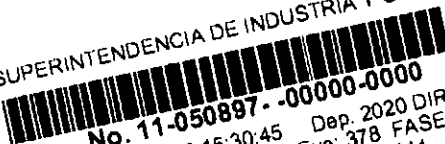
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR. UNIDITARIO	VR. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-050897-00000-0000

Fecha: 2011-04-26 15:30:45
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve. 378 FASE NACIONAL I
Folios: 114

3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 15 de 2011 - 18:06:29

D-2884

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0026852

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Marzo 25 de 2011 - 07:06:52

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325077546	23/03/2011	95.510.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1611 TASA ANUAL A#OS 4 a 8 PARA MANTENIMIENTO DE PATENTE DE	301.000.00	301.000.00
				\$301.000.00

SON: **TRESCIENTOS UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-050897-00000-0000
Fecha: 2011-04-28 15:30:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Trb. 11 PATENTE IYII Evg: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Consultador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 25 de 2011 - 07:07:19

p-2889

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0036187

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Abril 15 de 2011 - 18:03:59

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	431342063	15/04/2011	108.185.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	50.000.00	50.000.00
				<u>\$50.000.00</u>

SON: **CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-050897- -00000-0000

Fecha: 2011-04-26 15:30:45 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Follos: 114

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910185 Call Center: (571) 6513240

Abril 15 de 2011 - 18:06:35

5

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkmodel.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de
ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en 2-1,
Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012,
Japón.

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia descentralizada, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Kensuke Tomita

President and CEO

legal representative(s) of **ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.**

an organization existing under the laws of
JAPAN

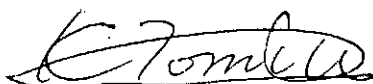
and in present execution of its business activity, domiciled 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012, Japan.

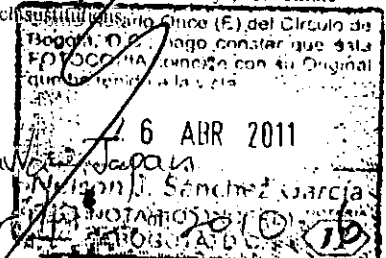
do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitution.

Granted and signed at

on this 30 day of


Firma / signature



CERTIFICADO NOTARIAL

(Cuando el solicitante es SOCIEDAD)
(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los _____ días del mes de _____
de _____, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)
mayor de edad y domiciliado en _____
_____ firmó de su puño
y letra el documento que antecede.
2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.
3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de _____
de la persona jurídica ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
4. La citada persona jurídica con sede en 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012, Japón., está legalmente constituida, que tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social
5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.
6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
de _____, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)
mayor de edad y domiciliado en _____
_____ firmó en su presencia
el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia 1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acrediten tales circunstancias.

**LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA
O POR APOSTILLA**

NOTARIAL CERTIFICATE

(When the applicant is a CORPORATION)

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This 17th day of May, 2010
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. Kensuke Tomita
(name of the person who signs the power of attorney)
of legal age and domiciled
in 2-16-20, Takaidonishi, Suginami-ku Tokyo, Japan
_____ set his hand on the foregoing document.
2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.
3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity of President and CEO
of the juridical ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
4. The mentioned juridical person with place of 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012, Japan., is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.
5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her representation is legal and that he/she is empowered to grant this power of attorney.
6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents which for such purpose were exhibited to me.

Notary Public

ICHIRO SHINJO

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is an INDIVIDUALS)

On this _____ day of _____
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. _____
(name of the person who signs the Power of Attorney)
of legal age and domiciled at _____
_____ signed in his presence the foregoing document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation, 2) that the corporate purposes are actually being accomplished, 3) that the person or persons who grant this power of attorney are empowered to do it. The Consul will certify also that the documents evidencing these circumstances were exhibited to him.

LEGALIZATION BY THE COLOMBIAN CONSUL OR BY APOSTILLE.

この委任状の署名者 オンコセラピー・サイエンス株式会社 代表取締役社長

富田 憲 介 は、本職の面前でこの署名を自認した。

よって、これを認証する。

平成22年 5 月 17 日、本公証人役場において
東京都中央区銀座2丁目2番6号 銀座公証役場

東京法務局所属

公 証 人

Notary

ICHIRO SHINJO

新 井 一 郎

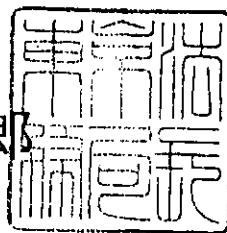
証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、
真実のものであることを証明する。

平成22年 5 月 17 日

東京法務局長

山 舗 弥 一 郎



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN

This public document

2. has been signed by ICHIRO SHINJO

3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of ICHIRO SHINJO, Notary

Certified

5. at Tokyo

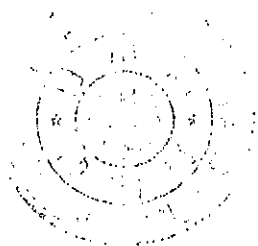
6. May 17, 2010

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. 10-Nº 024949

9. Seal/stamp:

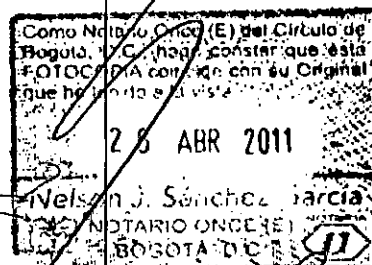
10. Signature



K. Oyabe

Kazutoyo OYABE

For the Minister for Foreign Affairs



Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento legalizado mediante la **APOSTILLA** No. **024949** de 17 de mayo de 2010 expedida en Japón correspondiente a un documento de poder otorgado por la sociedad **ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.**, domiciliada en Kanagawa, Japón y una certificación notarial, ambos en inglés con idéntico texto en español (razón por la cual no se hace su traducción).

Poder

Yo, el suscrito Kensuke Tomita, presidente y director ejecutivo representante legal de ONCOTHERAY SCIENCE, INC., una sociedad existente bajo las leyes de Japón

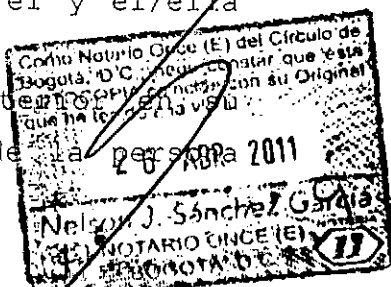
(Nota del traductor: El resto del documento se encuentra con idéntico texto en la parte izquierda del documento en idioma español, razón por la cual no se hace su traducción).

Documento de poder firmado el 30 de abril de 2010 en Kanagawa, Japón

Certificado notarial:

Este día 28 de octubre de 2009, el suscrito notario CERTIFICA que:

1. Kensuke Tomita mayor de edad y domiciliado en 2-16-20 Takaidonishi, Suginami-ku, Tokio, Japón firmó el documento anterior.
2. El otorgante es conocido personalmente por él y él/ella tiene capacidad legal para ejecutar el documento.
3. El otorgante ha ejecutado el documento anterior con su capacidad de Presidente y Director Ejecutivo de la jurídica ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.



(Nota del traductor: El resto del documento se encuentra con idéntico texto en la parte izquierda del documento en idioma español, razón por la cual no se hace su traducción).

Documento legalizado mediante firma y sello por Ichiro Shinjo, Notario Público

APOSTILLA

(Convención de la Haya de 5 de octubre de 1961)

1. País: JAPÓN

Este documento público

2. Ha sido firmado por ICHIRO SHINJO

3. actuando en su capacidad de Notario de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio

4. lleva el sello/estampilla de ICHIRO SHINJO, Notario

Certificado

5. en Tokio

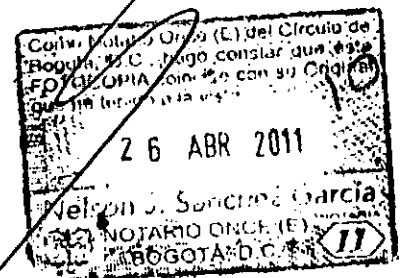
6. el 17 de mayo de 2010

7. por el Ministerio de Asuntos Exteriores

8. No. 024949

9. Sello/estampilla: (sello de Ministerio de Asuntos Exteriores de Japón

10. Firma: (firmado) Kazutoyo OYABE, por el Ministro de Asuntos Exteriores



PÉPTIDO-EPÍTOPE RAB6KIFL/KIF20A Y

VACUNAS QUE CONTIENEN EL MISMO

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona con el campo de las ciencias biológicas, más específicamente con el campo de la terapia del cáncer. En particular, la presente invención se relaciona con oligopéptidos novedosos y con el uso de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Se ha demostrado que los CTL positivos para CD8 reconocen péptidos-epítopes derivados de los antígenos tumor- asociados (TAAs) encontrados en la molécula clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y luego exterminan las
15 células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia de antígenos de melanoma (MAGE) como el primer ejemplo de los TAA, se han descubierto muchos otros TAA, principalmente a través de procedimientos inmunológicos (NPL 1: Boon T, *Int J Cancer*, 8 de mayo 1993, 54(2): 177-80; NPL 2: Boon T & van der Bruggen P, *J*
20 *Exp Med*, 1 de marzo de 1996, 183(3): 725-9). Algunos de los TAA están actualmente bajo desarrollo clínico como blancos inmunoterapéuticos.

 La identificación de nuevos TAA, capaces de inducir respuestas inmunes anti-tumorales potentes y específicas,
25 garantiza el desarrollo adicional y la aplicación clínica de estrategias de vacunación con péptidos para diversos cánceres (NPL 3: Harris CC, *J Natl Cancer Inst*, 16 de octubre de 1996, 88(20): 1442-55; NPL 4: Butterfield LH et al., *Cancer Res*, 1 de

julio de 1999, 59(13): 3134-42; NPL 5: Vissers JL et al., *Cancer Res*, 1 de noviembre de 1999, 59(21): 5554-9; NPL 6: van der Burg SH et al., *J Immunol*, 1 de mayo de 1996, 156(9): 3308-14; NPL 7: Tanaka F et al., *Cancer Res*, 15 de octubre de 1997, 57(20): 4465-8; NPL 8: Fujie T et al., *Int J Cancer*, 18 de enero de 1999, 80(2): 169-72; NPL 9: Kikuchi M et al., *Int J Cancer*, 5 de mayo de 1999, 81(3): 459-66; NPL 10: Oiso M et al., *Int J Cancer*, 5 de mayo de 1999, 81(3): 387-94). Hasta la fecha, se han registrado diversos informes de ensayos clínicos que utilizan estos péptidos derivados de antígenos tumor-asociados. Desafortunadamente, hasta el momento sólo se ha observado un índice de respuesta objetiva baja en estos ensayos de vacunas contra cáncer (NPL 11: Belli F et al., *J Clin Oncol*, 15 de octubre de 2002, 20(20): 4169-80; NPL 12: Coulie PG et al., *Immunol Rev*, Oct de 2002, 188: 33-42; NPL 13: Rosenberg SA et al., *Nat Med*, septiembre de 2004, 10(9): 909-15).

Recientemente, se puede esperar una secuencia peptídica de unión a una HLA clase I usando algoritmos (NPL 14: *Journal of Immunological Methods*, (1995), Vol. 185, págs. 181-190, NPL 15: *J. Immunol.*, (1994), Vol. 152, págs. 163-175, NPL 16: *Protein Science*, (2000), Vol.9, págs. 1838-1846). Sin embargo, es difícil decir que el péptido-epítipo esperado se pueda procesar naturalmente en las células blanco y expresar sobre la superficie de la célula blanco con la molécula HLA. Además, el algoritmo, por ejemplo BIMAS (http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) (NPL 17: Parker KC, et al., (1994) *J Immunol.*; 152(1): 163-75.; NPL 18: Kuzushima K, et al., (2001) *Blood*; 98(6): 1872-81.)) puede sugerir al péptido de unión

a la molécula HLA, aunque el péptido sugerido no es tan riguroso (NPL 19: Bachinsky MM, et al., *Cancer Immun.*, 22 de marzo de 2005; 5:6.). De esta forma, la selección de TAA aún plantea muchos desafíos y dificultades.

5 El cáncer de páncreas tiene un pronóstico pobre, con una tasa de supervivencia global de 5 años del 5% aproximadamente (1). Una resección quirúrgica continúa siendo la única opción para una supervivencia a largo plazo, aunque los pacientes con cáncer de páncreas resecable son una minoría (9-22%) (NPL 20: Sener S F, et al., *J Am Coll Surg* 1999; 189: 1-7., NPL 21: Eloubeidi M A, et al., *Am J Surg* 2006; 192: 322-9., NPL 22: Goonetilleke K S, et al., *Int J Surg* 2007; 5: 147-51.). Sin embargo, aún en estos pacientes el índice de supervivencia de 5 años continúa siendo del 20% aproximadamente a pesar de la
15 cirugía con fines curativos (NPL 23: Smeenk H G, et al., *Langenbecks Arch Surg* 2005; 390: 94-103., NPL 24: Yeo C J, et al., *Ann Surg* 1995; 221: 721-31.). Hasta el 80% de los pacientes presentan una enfermedad avanzada localmente o metastásica, y su supervivencia media varía entre 6 y 9 meses (NPL 25: Lockhart A
20 C, et al., *Gastroenterology* 2005; 128: 1642-54.). En consecuencia, el desarrollo de modalidades terapéuticas novedosas constituye un tema de gran importancia y la inmunoterapia puede constituir un tratamiento potencial para el cáncer de páncreas.

RAB6KIFL (KIF20A) fue identificado primero por cumplir
25 un rol en la dinámica del Aparato de Golgi por interacción directa con la GTPasa pequeña Rab6 (NPL 26: Echard A, et al., *Science* 1998; 279: 580-5.). RAB6KIFL pertenece a la superfamilia de las quinesinas de proteínas motoras, que cumplen funciones

críticas en el tránsito de moléculas y organelos (NPL 26: Echard A, et al., *Science* 1998; 279: 580-5., NPL 27: Hirokawa N, et al., *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 60-73., NPL 28: Allan VJ, y Schroer TA., *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 476-82.). Recientemente,

5 Taniuchi K et al. reportaron que RAB6KIFL se sobreexpresaba en los tejidos de cáncer de páncreas (NPL 29: Taniuchi K, et al., *Cancer Res* 2005; 65: 105-12.). Encontraron evidencia de un rol crítico para RAB6KIFL en la carcinogénesis de páncreas.

A través del análisis del perfil de expresión génica

10 usando un microordenamiento de ADNc de todo el genoma que contiene 23,040 genes, permitió mostrar recientemente que RAB6KIFL (KIF20A) se sobrerregularán en diversos cánceres tales . como cáncer de vejiga (PTL 1: WO2006/085684), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) (PTL 2: WO2007/013665) y cáncer de

15 próstata hormona refractario (HRPC) (PTL 3: WO2008/102906), cuyas divulgaciones se incorporan en la presente a modo de referencia. Además, también se identificaron algunos péptidos-epítopes de los productos del gen *KIF20A* (PTL 4: WO2008/102557).

20 **[Listado de las citas]**

[Bibliografía de patentes]

[NPL 1] WO2006/085684

[NPL 2] WO2007/013335

[NPL 3] WO2008/102906

25 [NPL 4] WO2008/102557

[Bibliografía que no es de 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
- [NPL 3] Harris CC, *J Natl Cancer Inst*, 16 de octubre de 1996, 88(20): 1442-55
- 5 [NPL 4] Butterfield LH et al., *Cancer Res*, 1 de julio de 1999, 59(13): 3134-42
- [NPL 5] Vissers JL et al., *Cancer Res*, 1 de noviembre de 1999, 59(21): 5554-9
- [NPL 6] van der Burg SH et al., *J Immunol*, 1 de mayo de 1996, 156(9): 3308-14
- 10 [NPL 7] Tanaka F et al., *Cancer Res*, 15 de octubre de 1997, 57(20): 4465-8
- [NPL 8] Fujie T et al., *Int J Cancer*, 18 de enero de 1999, 80(2): 169-72
- 15 [NPL 9] Kikuchi M et al., *Int J Cancer*, 5 de mayo de 1999, 81(3): 459-66
- [NPL 10] Oiso M et al., *Int J Cancer*, 5 de mayo de 1999, 81(3): 387-94
- [NPL 11] Belli F et al., *J Clin Oncol*, 15 de octubre de 2002, 20(20): 4169-80
- 20 [NPL 12] Coulie PG et al., *Immunol Rev*, octubre de 2002, 188: 33-42
- [NPL 13] Rosenberg SA et al., *Nat Med*, septiembre de 2004, 10(9): 909-15
- 25 [NPL 14] *Journal of Immunological Methods*, (1995), Vol. 185, págs. 181-190
- [NPL 15] *J. Immunol.*, (1994), Vol.152, págs. 163-175
- [NPL 16] *Protein Science*, (2000), Vol.9, págs. 1838-1846

- [NPL 17] Parker KC, et al., (1994) *J Immunol.* 152(1): 163-75.
- [NPL 18] Kuzushima K, et al., (2001) *Blood.*; 98(6): 1872-81.
- [NPL 19] Bachinsky MM, et al., *Cancer Immun.*, 22 de marzo de 2005; 5: 6.
- 5 [NPL 20] Sener S F, et al., *J Am Coll Surg*, 1999; 189: 1-7.
- [NPL 21] Eloubeidi M A, et al., *Am J Surg*, 2006; 192: 322-9.
- [NPL 22] Goonetilleke K S, et al., *Int J Surg*, 2007; 5: 147-51.
- [NPL 23] Smeenk H G, et al., *Langenbecks Arch Surg*, 2005; 390: 94-103.
- 10 [NPL 24] Yeo C J, et al., *Ann Surg*, 1995; 221: 721-31.
- [NPL 25] Lockhart A C, et al., *Gastroenterology*, 2005; 128: 1642-54.
- [NPL 26] Echard A, et al., *Science*, 1998; 279: 580-5.
- [NPL 27] Hirokawa N, et al., *Curr Opin Cell Biol*, 1998; 10: 60-
15 73.
- [NPL 28] Allan VJ, y Schroer TA., *Curr Opin Cell Biol*, 1999; 11: 476-82.
- [NPL 29] Taniuchi K, et al., *Cancer Res*, 2005; 65: 105-12.

20

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de nuevos blancos de inmunoterapia. Dado que los TAA a menudo no presentan inmunogenicidad, el descubrimiento de los blancos apropiados es de extrema importancia. En particular,
25 la invención está dirigida a RAB6KIFL (SEQ ID NO: 2) codificada por el gen de GenBank, N° Acceso AF153329 o CR598555, también indicado por NM_005733 (SEQ ID NO: 1)), dado que RAB6KIFL se ha identificado como sobrerregulado en diversos cánceres tales como,

cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). La presente
5 invención provee productos del gen *RAB6KIFL* que contienen péptidos-epítopes que generan una respuesta CTL sorprendentemente fuerte que es específica de las moléculas correspondientes. Se estimularon células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) obtenidas de un donante saludable usando los péptidos de la
10 presente invención. La presente invención provee además CTL establecidos que reconocen específicamente células blanco positivas para HLA-A2 (A*0201) estimuladas con pulsos de los respectivos péptidos y péptidos-epítopes restringidos a HLA-A2 (A*0201) que pueden inducir respuestas inmunes potentes y
15 específicas contra *RAB6KIFL* expresado sobre el tumor. Estos resultados demuestran que *RAB6KIFL* es fuertemente inmunogénico y que los epítopes de los mismos constituyen blancos efectivos para una inmunoterapia de tumores.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención
20 comprende proporcionar oligopéptidos que presentan inducibilidad por CTL así como una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID N°: 3, 4 y 5. Además, en otra modalidad de la presente invención, se pueden sustituir, suprimir, insertar y/o agregar uno, dos o varios aminoácidos, siempre que los
25 oligopéptidos modificados resultantes retengan la inducibilidad por CTL de los péptidos originales.

Cuando se administran a un sujeto, los oligopéptidos de la presente se presentan sobre la superficie de células que

expresan antígenos y luego inducen CTL dirigidos contra los respectivos péptidos. Por ello, un objetivo de la presente invención, comprende proporcionar células presentadoras de antígenos y exosomas que presentan cualquiera de los péptidos de la presente, así como métodos para inducir células presentadoras de antígenos.

Una respuesta inmune anti-tumoral es inducida por la administración de los oligopéptidos RAB6KIFL de la presente o los polinucleótidos que codifican para los oligopéptidos, así como exosomas y células presentadoras de antígenos que presentan los oligopéptidos RAB6KIFL. Por ello, aún otro objetivo de la presente invención comprende proporcionar agentes farmacéuticos o una composición farmacéutica que contenga a los oligopéptidos o polinucleótidos que codifican para los mismos, así como los exosomas y las células presentadoras de antígenos, como sus ingredientes activos. Los agentes farmacéuticos o las composiciones farmacéuticas de la presente invención son de utilidad como vacunas.

Además, otro objetivo de la presente invención comprende proporcionar métodos para el tratamiento y/o profilaxis (es decir, prevención) de cánceres (tumores) y/o la prevención de una recurrencia postoperatoria de los mismos, así como los métodos para inducir CTL, los métodos para inducir inmunidad anti-tumoral, estos métodos incluyen el paso de administrar los oligopéptidos RAB6KIFL, polinucleótidos que codifican para los oligopéptidos RAB6KIFL, exosomas o las células presentadoras de antígenos que presentan los polipéptidos RAB6KIFL o los agentes farmacéuticos de la presente invención. Además, los CTL de la

presente invención también son de utilidad como vacunas contra
cáncer. Los ejemplos de cánceres blanco incluyen, aunque en un
sentido no limitativo, cáncer de vejiga, cáncer de mama,
carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de
5 células no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, cáncer de
próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas
(SCLC).

Se comprenderá que tanto el sumario de la presente
invención y la siguiente descripción detallada son de las
10 modalidades ilustrativas, y no son restrictivos de la invención u
otras modalidades alternativas de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Diversos aspectos y aplicaciones de la presente
15 invención resultarán evidentes para el experto al considerar la
breve descripción de las figuras y la descripción detallada de la
presente invención y de sus modalidades preferidas:

La figura 1, representa la expresión marcada y
frecuentemente mejorada del ARNm de *RAB6KIFL* en tejidos de cáncer
20 de páncreas basado en un análisis de microordenamientos de ADNc.
A representa un listado de genes sobrerregulados en células de
cáncer de páncreas. Estos genes estaban sobreexpresados en
células cancerosas en comparación con sus contrapartes normales.
La expresión del ARNm *RAB6KIFL* en células de cáncer de páncreas
25 era marcadamente mayor en los 6 pacientes con cáncer de páncreas.
B representa la proporción de expresión relativa del gen *RAB6KIFL*
en tejidos normales basado en un análisis de microordenamientos
de ADNc. El gen *RAB6KIFL* solamente se expresaba escasamente en

testículos y timo. C representa el nivel de expresión del gen *RAB6KIFL* que también era mayor en muchos cánceres de pulmón y vejiga, así como en cáncer de páncreas, basado en el análisis de microordenamientos de ADNc anterior.

5 La figura 2, representa los análisis del ARNm *RAB6KIFL* expresado en tejidos normales humanos, líneas de células de cáncer y tejidos de cáncer. A representa la expresión del ARNm *RAB6KIFL* investigado en diversos tejidos normales usando análisis por RT-PCR. El ARNm de *RAB6KIFL* solamente se expresaba
10 escasamente en testículos. B representa el análisis por RT-PCR de la expresión de *RAB6KIFL* en diversas líneas de células cancerosas. C representa el análisis por RT-PCR de la expresión de *RAB6KIFL* en tejidos de tumores de páncreas (T) y sus contrapartes normales (N). La expresión del gen *RAB6KIFL* se
15 detectó en 5 de 8 tejidos de cáncer de páncreas. Por el contrario, se detectó poca expresión en sus contrapartes normales.

La figura 3, representa la sobreexpresión específica del cáncer de páncreas de la proteína *RAB6KIFL* detectada mediante
20 análisis de transferencia Western. A representa que la proteína *RAB6KIFL* no era detectada en ocho tejidos normales, en tanto los testículos mostraron una banda tenue de movilidad similar a la observada en lisados celulares de PANC1. B representa que, en dos pacientes con cáncer de páncreas, se detectó la proteína
25 *RAB6KIFL* en los tejidos cancerosos (T) aunque no en los tejidos normales adyacentes (N). También se condujo una transferencia anti-beta-actina para monitorear cargas iguales de proteína.

La figura 4, representa los análisis

inmunohistoquímicos de la proteína RAB6KIFL en cáncer de páncreas (A) y diversos tejidos normales (B). A representa una fuerte tinción de RAB6KIFL observada fundamentalmente en el citoplasma y los núcleos de las células cancerosas en 6 de 9 casos, en tanto se observó una tinción muy débil en las células acinosas y del epitelio de ductos normales de los tejidos de páncreas adyacentes normales. Se observó una tinción fuerte similar en los focos metastásicos del peritoneo. Se detectó poca tinción en la pancreatitis formadora de tumores. B representa que no se tiñó RAB6KIFL en cerebro, pulmón, hígado, riñón, estómago, intestino delgado, colon, bazo, músculo esquelético, piel y timo. Se observó una posible tinción débil en testículos. Las señales de tinción positiva se representan en color marrón. Las barras a escala representan 100 micrómetros.

La figura 5, representa la identificación de epítopes CTL de ratón restringidos a HLA-A2 de la RAB6KIFL humana usando Tgm HLA-A2.1 (HHD). A representa que los Tgm HLA-A2.1 (HHD) fueron inmunizados con 5×10^5 BM-DC singénicas estimuladas con pulsos de los doce juegos de la mezcla de tres tipos de péptidos seleccionados entre 36 péptidos candidato *in vivo* los días 7 y 14. El día 21, se estimularon células de bazo CD4- aisladas de ratones inmunizados con BM-DC estimuladas con pulsos de cada péptido durante 6 días. El IFN-gamma producido por CTL se detectó mediante un ensayo ELISPOT. Se mostró que los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 (SEQ ID N°: 3), RAB6KIFL-A2-9-809 (SEQ ID N°: 4) y RAB6KIFL-A2-10-284 (SEQ ID N°: 5) inducían CTL reactivos a los péptidos. Estos ensayos se condujeron dos veces con resultados similares. B representa la tinción inmunohistoquímica con mAb

anti-CD4 o anti-CD8 en especímenes de tejido de Tgm HLA-A2 (HHD) inmunizados con el péptido RAB6KIFL-A2-9-809. Los especímenes se resecaron y analizaron después de aplicar dos vacunas.

La figura 6, representa la inducción de CTL humanos
 5 específicos de RAB6KIFL de las PBMC de donantes saludables positivos para HLA-A2. A representa que los CTL reactivos para el péptido RAB6KIFL eran generados por las PBMC de donantes saludables positivos para HLA-A2. Después de tres estimulaciones con DC derivadas de monocitos autólogos estimuladas con pulsos de
 10 péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 (SEQ ID N°: 3), RAB6KIFL-A2-9-809 (SEQ ID N°: 4) y RAB6KIFL-A2-10-284 (SEQ ID N°: 5), se detectó la citotoxicidad de los CTL contra células T2 (deficientes en HLA-A2⁺, TAP), estimulada con pulsos con cada péptido o células T2 no estimulados con pulsos de péptido, mediante un ensayo de
 15 liberación de ⁵¹Cr estándar. Estos CTL exhibieron citotoxicidad para células T2 estimuladas con pulsos del péptido RAB6KIFL-A2-9-12 (izquierda), RAB6KIFL-A2-9-809 (medio) y RAB6KIFL-A2-10-284 (derecha), aunque no para células T2 irrelevantes no estimulados con pulsos del péptido y péptido de VIH. B representa que estos
 20 CTL exhibieron citotoxicidad para la línea celular humana de cáncer de páncreas RAB6KIFL⁺ HLA-A2 (A*0201)⁺, PANC1, y para la línea celular de cáncer de colon CaCo-2, aunque no para la línea celular humana de cáncer de páncreas RAB6KIFL⁺ HLA-A2 (A*0201)⁻, PK8. C representa que la citotoxicidad de estos CTL era
 25 específica de RAB6KIF. Estos CTL exterminaron células SKHep1/RAB6KIFL, una línea celular humana de cáncer de hígado RAB6KIFL^{baja} HLA-A2⁺, SKHep1, transfectadas con el gen RAB6KIFL humano, aunque no exterminaron las células SKHep1/Falso. D

representa la inhibición de la citotoxicidad por un mAb anti-HLA-clase I. Después de incubar las células blanco PANC1 con los mAb anti-HLA-clase I (W6/32, IgG_{2a}) o los mAb anti-HLA-DR (H-DR-1, IgG_{2a}) respectivamente durante 1 hora, se agregaron los CTL generados a partir de los PBMC de donantes saludables por estimulación con el péptido RAB6KIFL-A2-9-12 (arriba), RAB6KIFL-A2-9-809 (medio) y RAB6KIFL-A2-10-284 (abajo). Los productos de IFN-gamma eran marcadamente inhibidos por W6/32, aunque no por H-DR-1.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente de aquellos que se describen en la presente para la práctica o evaluación de las modalidades de la presente invención, a continuación se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Sin embargo, antes de describir los materiales y métodos de la presente, se deberá tener en cuenta que la presente invención no se limita a los tamaños, formas, dimensiones, materiales, metodologías, protocolos, etc., particulares, que se describen en la presente, ya que pueden variar de acuerdo con una experimentación y optimización de rutina. También se debe tener en cuenta que la terminología usada en la descripción solamente sirve a los fines de describir las versiones o modalidades particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que solamente es limitada por las reivindicaciones adjuntas.

25

La exposición de cada publicación, patente o solicitud de patente mencionada en esta especificación se incorpora

21

específicamente y por completo en la presente a modo de referencia. Sin embargo, ninguna mención en la presente debe considerarse como un reconocimiento de que la invención no puede anteponer dicha exposición en virtud de una invención anterior.

5 En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos solamente se ofrecen para efectos ilustrativos y no en un sentido limitativo.

10 I. Definiciones

Las palabras "uno", "una", "el" y "la" según se usan en la presente significan "al menos uno" a menos que específicamente se indique lo contrario.

15 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácidos es un residuo modificado, o un residuo no natural, tal como un mimético químico artificial de un aminoácido natural
20 correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales.

El término "oligopéptido" a veces se usa en la presente especificación para hacer referencia a los péptidos de la presente invención que son de 20 residuos o menos, típicamente 15 residuos o menos de longitud y habitualmente consiste de entre
25 aproximadamente 8 y aproximadamente 11 residuos, a menudo 9 ó 10 residuos.

El término "aminoácido" según se usa en la presente se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos

de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los que están codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que son modificados después de la traducción en las células (por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina). La frase "análogo de aminoácido" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica (un enlace de carbono alfa a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) como un aminoácido natural aunque tienen un grupo R modificado o estructuras modificadas (por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metilsulfonio de metionina). La frase "mimético de aminoácido" se refiere a compuestos químicos que tienen estructuras diferentes aunque funciones similares a los aminoácidos en general.

En la presente los aminoácidos se designan de acuerdo con los símbolos de tres letras comúnmente conocidos o los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de IUPAC-IUB.

Los términos "gen", "polinucleótidos", "nucleótidos" y "ácidos nucleicos" se usan indistintamente en la presente a menos que específicamente se indique lo contrario y son similares a los aminoácidos designados por sus códigos de una sola letra aceptados comúnmente.

A menos que se defina de otra manera, el término "cáncer" se refiere a cánceres que sobreexpresan al gen RAB6KIFL. Los ejemplos de cánceres que sobreexpresan RAB6KIFL incluyen, aunque en un sentido no limitativo, cáncer de vejiga, cáncer de

mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC).

5 A menos que se defina de otra manera, el término "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" se usan indistintamente en la presente y, a menos que específicamente se indique lo contrario, se refieren a un subgrupo de linfocitos T capaces de reconocer células no propias (por ejemplo, células
10 tumoraes, células infectadas con virus) y de inducir la muerte de dichas células.

 A menos que se los defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente tienen el mismo significado que le dan los especialistas en la técnica a
15 los que concierne esta invención.

II. Péptidos

 Para demostrar que los péptidos derivados de RAB6KIFL funcionan como un antígeno reconocido por linfocitos T
20 citotóxicos (CTL), se analizaron los péptidos derivados de RAB6KIFL (SEQ ID N°: 2) para determinar si eran epítopes de antígenos restringidos por HLA-A2 (A*0201) que son los alelos más comunes de HLA (Date Y et al., *Tissue Antigens*, 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., *J Immunol*, 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., *J*
25 *Immunol*, 152: 3913-24, 1994). Los candidatos de péptidos de unión a HLA-A2 derivados de RAB6KIFL se identificaron usando la información sobre sus afinidades de unión a HLA-A2. Después de la estimulación *in vitro* de las células T por las células

27

dendríticas (DC) cargadas con estos péptidos, los CTL se establecieron exitosamente usando cada uno de los péptidos, en particular los siguientes péptidos:

- 5 RAB6KIFL-A2-9-12 (SEQ ID N°: 3),
RAB6KIFL-A2-9-809 (SEQ ID N°: 4), y
RAB6KIFL-A2-10-284 (SEQ ID N°: 5).

Estos CTL establecidos muestran una potente actividad CTL específica contra células blanco estimuladas con pulsos con los respectivos péptidos. Los resultados en la presente demuestran que RAB6KIFL es un antígeno reconocido por CTL y que los péptidos pueden ser péptidos-epítopes de RAB6KIFL restringidos por HLA-A2 (A*0201).

Dado que el gen *RAB6KIFL* está sobreexpresado en la mayoría de los tejidos cancerosos, tales como, cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), constituye un buen blanco para una inmunoterapia. Por consiguiente, la presente invención provee oligopéptidos tales como nonapéptidos (péptidos que consisten de nueve residuo de aminoácidos) y decapeptidos (péptidos que consisten de diez residuos de aminoácidos) correspondientes a epítopes de RAB6KIFL reconocidos por CTL. Los ejemplos particularmente preferidos de oligopéptidos de la presente invención incluyen los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N°: 3, 4 y 5.

En general, los programas de software disponibles ahora en Internet, tales como los que se describen en Parker KC et al.,

J Immunol, 1 de enero de 1994, 152(1): 163-75, se pueden usar para calcular las afinidades de unión entre diversos péptidos y antígenos HLA *in silico*. La afinidad de unión con los antígenos HLA se puede medir como se describe, por ejemplo, en Parker KC et al., *J Immunol*, 1 de enero de 1994, 152(1): 163-75; y Kuzushima K et al., *Blood*, 2001, 98(6): 1872-81. Los métodos para determinar la afinidad de unión se describen, por ejemplo, en; *Journal of Immunological Methods*, 1995, 185: 181-190.; *Protein Science*, 2000, 9: 1838-1846. Por consiguiente, la presente invención abarca los péptidos de RAB6KIFL que se unen a los antígenos HLA según se determinó utilizando estos programas.

Además, estos péptidos de la presente invención pueden estar flanqueados con residuos de aminoácidos adicionales siempre que el péptido retenga su inducibilidad de CTL. Estos péptidos con inducibilidad de CTL son, por ejemplo, de menos que 40 aminoácidos aproximadamente, a menudo menos que 20 aminoácidos aproximadamente, habitualmente menos que 15 aminoácidos aproximadamente. La secuencia de aminoácidos que flanquea a los péptidos que consisten de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID N°: 3, 4 y 5 no está limitada y puede estar compuesta por cualquier tipo de aminoácidos siempre que no perjudique la inducibilidad de CTL del péptido original. Por consiguiente, la presente invención también provee péptidos que presentan inducibilidad de CTL, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID N°: 3, 4 y 5.

En general, la modificación de uno, dos o varios aminoácidos en una proteína no afectará la función de la misma o

en algunos casos aún puede mejorar la función deseada de la proteína original. De hecho, se conocen péptidos modificados (es decir, los péptidos compuestos de una secuencia de aminoácidos en la cual se ha modificado (es decir, sustituido, suprimido, 5 agregado y/o insertado) uno, dos o varios residuos de aminoácidos en comparación con una secuencia de referencia original) que han retenido la actividad biológica del péptido original (Mark et al., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 1984, 81: 5662-6; Zoller y Smith, *Nucleic Acids Res*, 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., 10 *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 1982, 79: 6409-13). Por lo tanto, en una modalidad, los oligopéptidos de la presente invención pueden tener tanto inducibilidad CTL como una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID N°: 3, 4 y 5, en la cual se han agregado, insertado, suprimido y/o sustituido uno, dos o 15 varios aminoácidos.

Aquellos expertos en la técnica reconocen que las adiciones o sustituciones individuales a una secuencia de aminoácidos que altera un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos tienden a dar por resultado en la conservación de 20 las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original. Como tales, se conocen convencionalmente como "sustituciones conservadoras" o "modificaciones conservadoras", en donde la alteración de una proteína da por resultado una proteína modificada que tiene propiedades y funciones análogas de la 25 proteína original. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los ejemplos de características de cadenas laterales de aminoácidos que resultan deseables para

conservar incluyen, por ejemplo, aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrofílicos (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
 5 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 un ácido carboxílico y una amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene una base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene un
 10 grupo aromático (H, F, Y, W). Además, los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son aceptados en la técnica como sustituciones conservadoras entre sí:

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

También se considera que estos péptidos modificados
 25 conservadoramente son péptidos de la presente invención. Sin embargo, los péptidos de la presente invención no se restringen a los mismos y pueden incluir modificaciones no conservadoras, siempre que el péptido retenga la inducibilidad de CTL del péptido original. Además, los péptidos modificados no deberían

31

excluir los péptidos inducibles de CTL de variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de RAB6KIFL.

Para retener la inducibilidad de CTL requerida se puede modificar (agregar o sustituir) una pequeña cantidad (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, 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos a modificar puede ser del 20% o menos, por ejemplo, 15% o menos, por ejemplo 10% o 1 a 5%.

Cuando se usa en el contexto de una inmunoterapia, los péptidos de la presente invención deberían presentarse sobre la superficie de una célula o exosoma, preferentemente como un complejo con un antígeno HLA. Por ello, resulta preferible seleccionar péptidos que no sólo induzcan los CTL sino que también posean una gran afinidad de unión al antígeno HLA. Para tal fin, los péptidos se pueden modificar por sustitución, inserción, supresión y/o adición de los residuos de aminoácidos para obtener un péptido modificado con una mayor afinidad de unión. Además de los péptidos que se expresan naturalmente, dado que ya se conoce la regularidad de las secuencias de péptidos expresadas por unión a los antígenos HLA (*J Immunol* 1994, 152: 3913; *Immunogenetics* 1995, 41: 178; *J Immunol* 1994, 155: 4307), se pueden introducir modificaciones basadas en dicha regularidad en los péptidos inmunogénicos de la invención. Por ejemplo, los péptidos que poseen una gran afinidad de unión por HLA-A2 (A*0201) tienen su segundo aminoácido del término N sustituido con leucina o metionina, y comprenden los péptidos cuyo aminoácido en el término C está sustituido con valina o leucina.

32

Por consiguiente, los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N°: 3, 4 ó 5, en donde el segundo aminoácido del término N está sustituido con leucina o metionina y/o en donde el término C está sustituido con valina o leucina, 5 están comprendidos por la presente invención. Las sustituciones no sólo se pueden introducir por los aminoácidos terminales sino también en la posición de un reconocimiento potencial TCR de los péptidos. Diversos estudios han demostrado que las sustituciones de aminoácidos en un péptido pueden ser iguales o mejores que el 10 original, por ejemplo CAP1, p53 (264-272), Her-2/neu (369-377) o gp100 (209-217) (Zaremba et al., *Cancer Res.*, 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al., *J Immunol.*, 1 de febrero (2002); 168(3): 1338-47., S. O. Dionne et al., (*Cancer Immunol Immunother.*, (2003) 52: 199-206 y S. O. Dionne et al., *Cancer Immunology, Immunotherapy* (2004) 53, 307-314).

La presente invención también contempla la adición de aminoácidos a las secuencias expuestas aquí. Por ejemplo, también se pueden agregar uno, dos o varios aminoácidos a los términos N y/o C de los péptidos de la presente. Tales péptidos 20 modificados que tienen una gran afinidad de unión por el antígeno HLA y que retienen la inducibilidad de CTL también están incluidos en la presente invención.

Sin embargo, cuando la secuencia peptídica es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína 25 endógena o exógena que tiene una función diferente, es posible la inducción de efectos secundarios tales como trastornos autoinmunes y/o síntomas alérgicos contra sustancias específicas. Por ello, es preferible conducir primero búsquedas de homología

33

usando bases de datos disponibles para evitar situaciones en las cuales la secuencia del péptido coincida con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando a partir de las búsquedas de homología resulta evidente que no existe un péptido con tan poco como 1 ó 2 diferencias de aminoácidos en comparación con el péptido de interés, dicho péptido de interés puede modificarse con el fin de incrementar su afinidad de unión con los antígenos HLA y/o incrementar su inducibilidad de CTL sin perjuicio alguno de tales efectos secundarios.

10 Aunque se espera que los péptidos que tienen gran afinidad de unión a los antígenos HLA descritos previamente sean muy efectivos, los péptidos candidato, que se seleccionan de acuerdo con la presencia de una gran afinidad de unión como un indicador, se examinan además por la presencia de inducibilidad de CTL. En la presente, la frase "inducibilidad de CTL" indica la capacidad del péptido para inducir linfocitos citotóxicos (CTL) cuando se presentan sobre células presentadoras de antígenos. Además, la "inducibilidad de CTL" incluye la capacidad del péptido para inducir activación de CTL, la proliferación de CTL, para promover la lisis por CTL de las células blanco y para incrementar la producción de CTL IFN-gamma.

La confirmación de la inducibilidad de CTL se lleva a cabo por inducción de las células presentadoras de antígenos que llevan antígenos MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DC)) o, más específicamente, DC derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana y después estimulación con los péptidos, mezclado con células positivas para CD8 y posteriormente medición del IFN-gamma

34

producido y liberado por los CTL contra las células blanco. Como
 sistema de reacción, se pueden usar animales transgénicos
 producidos para expresar un antígeno HLA humano (por ejemplo, los
 que se describen en BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C,
 5 Low L, Primus J, Diamond DJ, *Hum Immunol*, agosto de 2000, 61(8):
 764-79, artículos relacionados, libros, *Linkout Induction of CTL
 response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1
 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H)
 response*). Por ejemplo, las células blanco se pueden marcar
 10 radioactivamente con ^{51}Cr y semejantes, y la actividad citotóxica
 se puede calcular a partir de la radioactividad liberada de las
 células blanco. Como alternativa, la inducibilidad de CTL puede
 evaluarse midiendo el IFN-gamma producido y liberado por los CTL
 en la presencia de células presentadoras de antígenos (APC) que
 15 llevan péptidos inmovilizados, y visualizando la zona de
 inhibición sobre el medio usando anticuerpos monoclonales anti-
 IFN-gamma.

Por resultado de examinar la inducibilidad de CTL de
 los péptidos como se describió previamente, se descubrió que
 20 aquellos péptidos que tienen una gran afinidad de unión a un
 antígeno HLA no presentan necesariamente una gran inducibilidad
 de CTL. Sin embargo, entre aquellos péptidos identificados y
 evaluados, se encontró que los nonapéptidos o decapeptidos
 seleccionados entre péptidos que tienen una secuencia de
 25 aminoácidos indicada por las SEQ ID N°: 3, 4 y 5, exhiben una
 inducibilidad de CTL particularmente alta, así como una gran
 afinidad de unión a un antígeno HLA. Por consiguiente, estos
 péptidos se ejemplifican como las modalidades preferidas de la

35

presente invención.

Además de las modificaciones descritas previamente, los péptidos de la presente invención también se pueden enlazar a otras sustancias, siempre que el péptido enlazado resultante
5 retenga la inducibilidad de CTL requerida del péptido original. Los ejemplos de sustancias adecuadas incluyen, aunque en un sentido no limitativo: péptidos, lípidos, azúcares y cadenas de azúcares, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como
10 glicosilación, oxidación de cadenas laterales o fosforilación, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica del péptido original. Estos tipos de modificaciones pueden efectuarse para conferir funciones adicionales (por ejemplo, una función de direccionamiento y una función de
15 distribución o administración) o para estabilizar al polipéptido.

Por ejemplo, para incrementar la estabilidad *in vivo* de un polipéptido, es conocida en la técnica la introducción de D-aminoácidos, miméticos de aminoácidos o aminoácidos no naturales; este concepto también se puede adaptar a los polipéptidos de la
20 presente. La estabilidad de un polipéptido puede evaluarse de numerosas maneras. Por ejemplo, se pueden usar peptidasas y diversos medios biológicos, tales como plasma y suero humanos, para evaluar la estabilidad (véase, por ejemplo, Verhoef et al., *Eur J Drug Metab Pharmacokin*, 1986, 11: 291-302).

25 Además, los péptidos de la presente invención se pueden enlazar a otros péptidos por medio de espaciadores o enlazadores. Los ejemplos de otros péptidos incluyen, aunque en un sentido no limitativo, péptidos inducibles de CTL derivados de otros TAA.

36

Como alternativa, se pueden enlazar dos o más péptidos de la presente invención por medio de espaciadores o enlazadores. Los péptidos enlazados por medio de espaciadores o enlazadores pueden ser iguales o diferentes entre sí. Los espaciadores o enlazadores no están específicamente limitados, aunque preferentemente son péptidos, más preferentemente péptidos que tienen uno o más sitios de escisión capaces de ser escindidos por enzimas, tales como peptidasas, proteasas y proteasomas. Los ejemplos de enlazadores o espaciadores incluyen, aunque en un sentido no limitativo: AAY (P. M. Daftarian et al., *J Trans Med*, 2007, 5: 26), AAA, NKRK (R. P. M. Sutmuller et al., *J Immunol.*, 2000, 165: 7308-7315) o uno a varios residuos de lisina (S. Ota et al., *Can Res.*, 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., *J Immunol.* 2002, 168: 5709-5715). Los péptidos de la presente invención abarcan aquellos péptidos que están enlazados a otros péptidos por medio de espaciadores o enlazadores.

Aquí, los péptidos de la presente invención también se pueden describir como "péptido(s) RAB6KIFL", "polipéptido(s) RAB6KIFL" u "oligopéptido RAB6KIFL".

III. Preparación de los péptidos RAB6KIFL

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar usando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar mediante síntesis, usando tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar individual o como polipéptidos más largos compuestos de dos o más péptidos. A continuación, los péptidos se pueden aislar, es decir, purificar

37

o aislar para estar sustancialmente libres de otras proteínas de células huésped naturales y fragmentos de las mismas, o cualquier otra sustancia química.

Un péptido de la presente invención se puede obtener mediante síntesis química en base a la secuencia de aminoácidos seleccionada. Los ejemplos de métodos de síntesis de péptidos convencionales que pueden adaptarse a la síntesis incluyen, aunque en un sentido no limitativo:

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

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

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

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

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

(vi) WO99/67288; y

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

Como alternativa, los péptidos de la presente se pueden obtener adaptando cualquier método de ingeniería genética conocido para producir péptidos (por ejemplo, Morrison J, *J Bacteriology*, 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, *Methods in Enzymology* (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62). Por ejemplo, primero se prepara un vector adecuado que contenga un polinucleótido codificante del péptido de interés en una forma

que se pueda expresar (por ejemplo, 3' con respecto a una secuencia reguladora correspondiente a una secuencia promotora) y se transforma en una célula huésped adecuada. Luego se cultiva la célula huésped para producir el péptido de interés. El
5 péptido también se puede producir *in vitro* adoptando un sistema de traducción *in vitro*.

IV. Polinucleótidos

La presente invención también provee un polinucleótido
10 que codifica cualquiera de los péptidos de la presente invención mencionados previamente. Estos incluyen polinucleótidos derivados del gen *RAB6KIFL/KIF20A* natural (GenBank, N° Acceso NM_005733 (SEQ ID N°: 1)) así como aquellos que presentan una secuencia de nucleótidos modificada conservadoramente del mismo.
15 En la presente, la frase "secuencia de nucleótidos modificada conservadoramente" se refiere a secuencias que codifican para secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos idénticos desde el punto de vista funcional
20 pueden codificar para cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican para el aminoácido alanina. Por consiguiente, en cualquier posición donde una alanina se especifica por un codón, el codón puede cambiarse por cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar
25 el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones imperceptibles" que son una especie de variación modificada en forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente que codifica para un péptido también

describe cualquier variación imperceptible posible del ácido nucleico. Un experto comprenderá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que comúnmente es el único codón para metionina, y TGG, que comúnmente es el único codón para triptófano) puede ser modificado para obtener una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación imperceptible de un ácido nucleico que codifica para un péptido está descrita implícitamente en cada secuencia expuesta.

El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto por ADN, ARN y derivados de los mismos. Un ADN está compuesto convenientemente por bases tales como A, T, C y G y en el ARN, T es reemplazada por U.

El polinucleótido de la presente invención puede codificar para múltiples péptidos de la presente invención con o sin secuencias de aminoácidos interpuestas entre ellos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos interpuesta puede proporcionar un sitio de escisión (por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de enzimas) del polinucleótido o de los péptidos traducidos. Además, el polinucleótido puede incluir cualquier secuencia adicional además de la secuencia codificante que codifica para el péptido de la presente invención. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido recombinante que incluye las secuencias reguladoras requeridas para la expresión del péptido o puede ser un vector de expresión (plásmido) con genes marcadores y semejantes. En general, estos polinucleótidos recombinantes se pueden preparar mediante la manipulación de polinucleótidos por medio de técnicas de recombinación convencionales usando, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

50

Se pueden usar técnicas recombinantes y de síntesis química para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, se puede producir un polinucleótido insertándolo en un vector apropiado, que se podrá expresar cuando
5 es transfectado en una célula competente. Como alternativa, se puede amplificar un polinucleótido usando técnicas de PCR o expresión en huéspedes adecuados (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press; Plainview, Nueva York). Como alternativa, se
10 puede sintetizar un polinucleótido usando las técnicas en fase sólida, que se describen en Beaucage SL & Iyer RP, *Tetrahedron*, 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., *EMBO J*, 1984, 3: 801-5.

Los vectores que contienen al polinucleótido de la presente invención y las células huésped que contienen los
15 vectores también están incluidos en la presente invención.

u1

V. Exosomas

La presente invención provee además vesículas intracelulares denominadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de esta invención y antígenos HLA sobre su superficie. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, usando los métodos detallados en las publicaciones de Kohyo de la Solicitud de Patente de Japón N° Hei 11-510507 y WO99/03499, y se pueden preparar usando las APC obtenidas de pacientes sometidos a tratamiento y/o prevención. Los exosomas de esta invención se pueden inocular como vacunas, de una manera similar a los péptidos de esta invención.

El tipo de antígeno HLA comprendido en los complejos debe coincidir con el del sujeto que requiere tratamiento y/o prevención. El uso del tipo HLA-A2 de gran expresión entre la población japonesa y caucásica resulta favorable para obtener resultados efectivos, y también son de utilidad los subtipos tales como HLA-A2 (A*0201) y HLA-A2 (A*0206). Típicamente, en la práctica clínica, se investiga por adelantado el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento, lo cual permite una selección apropiada de péptidos que tienen niveles altos de afinidad de unión a este antígeno, o que presentan inducibilidad de CTL por presentación de antígenos. Además, con el fin de obtener péptidos que representan gran afinidad de unión e inducibilidad de CTL, la sustitución o adición de 1, 2 o varios aminoácidos puede efectuarse en base a la secuencia de aminoácidos del péptido RAB6KIFL parcial natural.

Cuando se usa el antígeno HLA-A2 (A*0201) para el exosoma de la presente invención, es de utilidad un péptido con

42

la secuencia peptídica seleccionada de las SEQ ID N°: 3, 4 y 5.

VI. Células presentadoras de antígenos (APC)

La presente invención también provee APC aisladas que
5 presentan complejos formados entre antígenos HLA y los péptidos
de esta invención sobre su superficie. Las APC que se obtienen
por contacto de los péptidos de esta invención, o por
introducción de los polinucleótidos que codifican para los
péptidos de esta invención en una forma que se pueda expresar,
10 pueden derivarse de pacientes sometidos a tratamiento y/o
prevención, y pueden administrarse como vacunas por si mismas o
en combinación con otras drogas incluyendo los péptidos de esta
invención, exosomas o células T citotóxicas.

Las APC no se limitan a un tipo particular de células e
15 incluyen células dendríticas (DC), células de Langerhans,
macrófagos, células B y células T activadas, conocidas por
presentar antígenos proteináceos sobre su superficie celular para
ser reconocidas por linfocitos. Dado que la DC es una APC
representativa que tiene la acción inductora de CTL más fuerte
20 entre las APC, las DC son de utilidad como las APC de la presente
invención.

Por ejemplo, se puede obtener una APC por inducción de
DC de monocitos de sangre periférica y posterior contacto
(estimulación) de las mismas con los péptidos de esta invención
25 *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Cuando los péptidos de esta
invención son administrados a los sujetos, las APC que presentan
los péptidos de esta invención son inducidas en el cuerpo del
sujeto. La frase "APC inductora" incluye el contacto

u3

(estimulación) de una célula con los péptidos de esta invención, o de los nucleótidos que codifican para los péptidos de esta invención, para presentar los complejos formados entre los antígenos HLA y los péptidos de esta invención sobre la superficie de la célula. Como alternativa, después de introducir los péptidos de esta invención a las APC para permitir que las APC presenten los péptidos, dichas APC pueden administrarse al sujeto como una vacuna. Por ejemplo, la administración ex vivo puede incluir los pasos de:

10 a: recolectar las APC de un primer sujeto;

 b: poner las APC del paso a en contacto con el péptido;

y

 c: administrar las APC cargadas con el péptido a un segundo sujeto.

15 El primer sujeto y el segundo sujeto pueden ser un mismo individuo o pueden ser individuos diferentes. Como alternativa, de acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de los péptidos de esta invención en la elaboración de una composición farmacéutica inductora de células presentadoras de antígenos. Además, la presente invención provee un método o un proceso para elaborar una composición farmacéutica para inducir células presentadoras de antígenos, en donde dicho método incluye el paso de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, la presente invención provee un método o un proceso para elaborar una composición farmacéutica para el tratamiento de cánceres incluyendo cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células

uu

no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), en donde el método incluye el paso de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente
5 aceptable. Además, la presente invención también provee los péptidos de la presente invención para inducir células presentadoras de antígenos. Las APC obtenidas con el paso b pueden administrarse al sujeto como una vacuna. Como alternativa, la presente invención provee los péptidos para el
10 tratamiento de cánceres incluyendo cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC).

15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, las APC de la presente invención tienen un nivel alto de inducibilidad de CTL. En el término "nivel alto de inducibilidad de CTL", el nivel alto es con relación al nivel que se logra cuando las APC no tienen contacto con un péptido o con péptidos
20 que no inducen a los CTL. Dichas APC que tienen un nivel alto de inducibilidad de CTL se pueden preparar mediante un método que incluye el paso de transferir genes que contienen polinucleótidos que codifican para los péptidos de esta invención a las APC *in vitro*. Los genes introducidos se pueden encontrar en la forma de
25 ADN o ARN. Los ejemplos de métodos de introducción incluyen, sin limitaciones particulares, los diversos métodos empleados convencionalmente en este campo, tales como métodos de lipofección, electroporación y fosfato de calcio. Más

us

específicamente, se puede conducir como se describe en *Cancer Res* 1996, 56: 5672-7; *J Immunol* 1998, 161: 5607-13; *J Exp Med* 1996, 184: 465-72; traducción del japonés publicada de la publicación Internacional N° 2000-509281. Al transferir el gen a las APC, el
5 gen es sometido a transcripción, traducción y semejantes en la célula, y luego la proteína obtenida es procesada por MHC Clase I o Clase II, y avanza por una vía de presentación para presentar los péptidos.

En una modalidad preferida, las APC de la presente
10 invención presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un oligopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N°: 3, 4 y 5. Preferentemente, las APC de la presente invención llevan un antígeno HLA-A2, en particular HLA-A2 (A*0201), sobre su
15 superficie. Como alternativa, el oligopéptido que formará el complejo con un antígeno HLA puede ser un oligopéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N°: 3, 4, y 5, en donde se sustituye, inserta, suprime y/o
20 agrega uno, dos o varios aminoácidos, por ejemplo, se puede sustituir el segundo aminoácido desde el término N con leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal puede sustituirse con valina o leucina.

16

VII. Células T citotóxicas (CTL)

Una célula T citotóxica inducida contra cualquiera de los péptidos de la presente invención refuerza la respuesta inmune dirigida contra un endotelio asociado con tumores *in vivo* y por consiguiente se puede usar como una vacuna, de una manera similar a los péptidos *per se*. Por consiguiente, la presente invención también provee células T citotóxicas aisladas que son inducidas o activadas específicamente por cualquiera de los péptidos de la presente.

Dichas células T citotóxicas se pueden obtener mediante (1) administración a un sujeto y posterior recolección de células T citotóxicas del sujeto o (2) contacto (estimulación) de las APC derivadas del sujeto y células positivas para CD8, o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con los péptidos de la presente invención y posterior aislamiento de las células T citotóxicas.

Las células T citotóxicas, que fueron inducidas por estimulación a partir de las APC que presentan los péptidos de esta invención, pueden derivarse de pacientes sometidos a tratamiento y/o prevención y pueden administrarse por si mismas o en combinación con otras drogas, incluyendo los péptidos de esta invención o exosomas para los fines de efectos reguladores. Las células T citotóxicas obtenidas actúan específicamente contra las células blanco que presentan los péptidos de esta invención o, por ejemplo, los mismos péptidos que se usaron para la inducción. En otras palabras, las células T citotóxicas pueden reconocer (es decir, unirse) al complejo formado entre un antígeno HLA y el péptido de la presente invención sobre una superficie de la

u7

célula blanco con el receptor de células T, y atacar luego la célula blanco para inducir la muerte de la célula blanco. Las células blanco pueden ser células que expresan RAB6KIFL endógenamente o células que son transfectadas con el gen
5 RAB6KIFL; y las células que presentan un péptido de esta invención sobre la superficie celular debido a estimulación por el péptido también sirven como blancos de un ataque de CTL activados. En la modalidad preferida, las células blanco llevan el antígeno HLA-A2, en particular HLA-A2 (A*020), sobre su
10 superficie.

VIII. Receptor de células T (TCR)

La presente invención también provee una composición compuesta por una secuencia de ácido nucleico que codifica para
15 los polipéptidos capaces de formar una subunidad de un receptor de células T (TCR), y los métodos de uso de la misma. Las cadenas alfa y beta TCR tienen la capacidad de formar un TCR que confiere especificidad a las células T contra células tumorales que expresan RAB6KIFL. Con el uso de los métodos conocidos en la
20 técnica, se puede aislar y usar la secuencia de ácido nucleico de las cadenas alfa y beta de TCR correspondientes a los TCR expresados en los CTL inducidos con uno o más péptidos de esta invención para construir vectores adecuados que permitan una transferencia de genes con gran eficacia en linfocitos primarios
25 humanos (WO2007/032255 y Morgan RA, et al., *J Immunol*, 171, 3287 (2003)). Por ejemplo, estos vectores son vectores retrovirales. Ventajosamente, la invención provee una composición comercial que permite una modificación rápida de las células T propias del

18

paciente (o las de otro mamífero) para producir rápida y sencillamente células T modificadas que presentan excelentes propiedades de exterminar células cancerosas.

Además, la presente invención provee CTL que se
5 preparan por transducción con los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de las subunidades TCR que se unen al péptido RAB6KIFL, por ejemplo las SEQ ID N°: 3, 4 y 5 en el contexto de HLA-A2 (A*0201). Los CTL transducidos tienen la capacidad de asentarse en células cancerosas *in vivo*, y se pueden expandir
10 mediante métodos de cultivo *in vitro* bien conocidos (por ejemplo, Kawakami et al., *J Immunol.*, 142, 3452-3461 (1989)). Las células T de la invención se pueden usar para formar una composición inmunogénica de utilidad en el tratamiento o la prevención de cáncer en un paciente que necesita terapia o protección
15 (WO2006/031221).

IX. Agentes farmacéuticos o composiciones

Los términos "prevención" y "profilaxis" se utilizan indistintamente en la presente para hacer referencia a cualquier
20 actividad que reduzca la carga de mortalidad o morbilidad debida a la enfermedad. La prevención y profilaxis pueden tener lugar "a niveles de prevención primarios, secundarios y terciarios". En tanto la prevención y profilaxis primarias evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles de prevención y
25 profilaxis secundarios y terciarios abarcan actividades destinadas a la prevención y profilaxis del avance de una enfermedad y de la emergencia de síntomas, así como a la reducción del impacto negativo de una enfermedad ya establecida

49

al restablecer la función y reducir las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Como alternativa, la prevención y profilaxis pueden incluir un amplio rango de terapias profilácticas destinadas a aliviar la severidad del trastorno particular, por ejemplo reducir la proliferación y metástasis de tumores.

El tratamiento y/o la profilaxis de cáncer y/o la prevención de una recurrencia post-operatoria del mismo incluyen cualquiera de los siguientes pasos, tales como la remoción quirúrgica de células cancerosas, la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la involución o regresión de un tumor, la inducción de remisión y supresión de la aparición de cáncer, la regresión de tumores y la reducción o inhibición de metástasis. El tratamiento y/o la profilaxis efectiva del cáncer disminuyen la mortalidad y mejora la prognosis de los individuos que sufren de cáncer, disminuye los niveles de marcadores tumorales en la sangre, y alivia los síntomas detectables que acompañan al cáncer. Por ejemplo, la reducción o mejora de los síntomas constituye tratarlos efectivamente y/o una profilaxis, que incluye 10%, 20%, 30% o más reducción, o estabilizar la enfermedad.

Dado que la expresión de RAB6KIFL está sobrerregulada en diversos cánceres en comparación con un tejido normal, los péptidos de esta invención o los polinucleótidos que codifican estos péptidos pueden utilizarse para el tratamiento y/o para la profilaxis de cáncer, y/o para prevenir una recurrencia post-operatoria del mismo. Por consiguiente, la presente invención provee un agente o una composición farmacéutica para tratar y/o

para prevenir cáncer, y/o para prevenir la recurrencia post-operatoria del mismo, que incluye uno o más de los péptidos de esta invención, o polinucleótidos que codifican para los péptidos, como un ingrediente activo. Como alternativa, los
5 péptidos de la presente se pueden expresar sobre la superficie de cualquiera de los exosomas o células precedentes, tales como las APC para su uso como agentes farmacéuticos o en una composición farmacéutica. Además, las células T citotóxicas mencionadas previamente que buscan como blanco a cualquiera de los péptidos
10 de la presente invención también se pueden usar como ingrediente activo en los agentes farmacéuticos o la composición farmacéutica de la presente. En el contexto de la presente invención, la frase "direccionamiento de un péptido" se refiere al reconocimiento (es decir, la unión a) un complejo formado entre
15 un antígeno HLA y un péptido sobre la superficie de la célula blanco con el receptor de células T y posterior ataque de la célula blanco para inducir la muerte de dicha célula blanco.

En otra modalidad, la presente invención también provee el uso de un ingrediente activo seleccionado entre:

- 20 (a) un péptido de la presente invención,
(b) un ácido nucleico que codifica dicho péptido expuesto en la presente en una forma expresable,
(c) una APC de la presente invención, y
(d) células T citotóxicas de la presente invención
25 en la elaboración de una composición o agente farmacéutico para el tratamiento de cáncer.

Como alternativa, la presente invención provee además

un ingrediente activo seleccionado entre:

(a) un péptido de la presente invención,

(b) un ácido nucleico que codifica dicho péptido
expuesto en la presente en una forma expresable,

5 (c) una APC de la presente invención, y

(d) células T citotóxicas de la presente invención

para su uso en el tratamiento de cáncer.

Como alternativa, la presente invención provee además
10 un método o un proceso para elaborar una composición o agente
farmacéutico para el tratamiento de cáncer, en donde dicho método
o proceso incluye el paso de formular un vehículo
farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable con un ingrediente
activo seleccionado entre:

15 (a) un péptido de la presente invención,

(b) un ácido nucleico que codifica dicho péptido
expuesto en la presente en una forma expresable,

(c) una APC de la presente invención, y

(d) células T citotóxicas de la presente invención

20 como ingredientes activos.

En otra modalidad, la presente invención también provee
un método o un proceso para elaborar una composición o agente
farmacéutico para el tratamiento de cáncer, en donde el método o
25 proceso incluye el paso de mezclar un ingrediente activo con un
vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, en donde
el ingrediente activo se selecciona entre:

(a) un péptido de la presente invención,

52

(b) un ácido nucleico que codifica para ese péptido expuesto en la presente en una forma expresable,

(c) una APC de la presente invención, y

(d) células T citotóxicas de la presente invención.

5

Como alternativa, la composición farmacéutica o el agente farmacéutico de la presente invención se puede usar para cualquiera o ambos de la profilaxis de cáncer y la prevención de una recurrencia post-operatoria del mismo.

10 Los agentes o las composiciones farmacéuticas de la presente son de utilidad como una vacuna. En el contexto de la presente invención, la frase "vacuna" (también denominada composición inmunogénica) se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad anti-tumoral luego de su inoculación
15 en animales.

Los agentes o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir cánceres, y/o en la prevención de la recurrencia post-operatoria de los mismos en sujetos o pacientes incluyendo seres humanos y
20 cualquier otro mamífero incluyendo, aunque en un sentido no limitativo, ratones, ratas, cobayos, conejos, gatos, perros, ovejas, cabras, cerdos, ganado, caballos, monos, mandriles y chimpancés, en particular un animal de importancia comercial o un animal doméstico.

25 De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que los oligopéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N°: 3, 4 y 5 son péptidos-epítopes restringidos a HLA-A2 (A*0201), que pueden inducir una respuesta

53

inmune potente y específica. Por ello, los agentes farmacéuticos o las composiciones de la presente que incluyen cualquiera de estos oligopéptidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N°: 3, 4 ó 5 son particularmente adecuados para su 5 administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A2 (A*0201). Lo mismo se aplica a los agentes farmacéuticos o las composiciones que incluyen polinucleótidos que codifican para cualquiera de estos oligopéptidos.

Los cánceres que serán tratados con los agentes 10 farmacéuticos o las composiciones de la presente invención no están limitados e incluyen todos los tipos cánceres en donde está implicado el *RAB6KIFL*, incluyendo por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de 15 páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). En particular, los agentes farmacéuticos o las composiciones de la presente invención se aplican preferentemente al cáncer de páncreas.

Los agentes farmacéuticos o las composiciones de la 20 presente pueden contener además de los ingredientes activos mencionados precedentemente, otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTL contra células cancerosas, otros polinucleótidos que codifican para los otros péptidos, otras células que presentan a los otros péptidos o semejantes. En la 25 presente, se ejemplifican los otros péptidos que tienen la capacidad de inducir CTL contra células cancerosas mediante antígenos específicos del cáncer (por ejemplo, TAA identificados), aunque no se limitan a los mismos.

54

Si fuera necesario, los agentes farmacéuticos o las composiciones de la presente invención pueden incluir opcionalmente otras sustancias terapéuticas como un ingrediente activo, siempre que la sustancia no inhiba el efecto antitumoral del ingrediente activo, por ejemplo, cualquiera de los péptidos de la presente. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir agentes o composiciones anti-inflamatorias, analgésicos, sustancias quimioterapéuticas y semejantes. Además de incluir otras sustancias terapéuticas en el propio medicamento, los medicamentos de la presente invención también pueden administrarse sucesivamente o concurrentemente con uno o más de otros agentes farmacéuticos o las composiciones. Las cantidades de medicamento y el agente farmacéutico o las composiciones dependen, por ejemplo, del tipo de agente o composición farmacológica utilizados, la enfermedad que se tratará y los programas y las rutas de administración.

Se comprenderá que además de los ingredientes particularmente mencionados en la presente, los agentes farmacéuticos o las composiciones de esta invención pueden incluir otros agentes o composiciones convencionales de la técnica relacionados con el tipo de formulación en cuestión.

En una modalidad de la presente invención, los agentes farmacéuticos o las composiciones de la presente se pueden incluir en artículos de manufactura y los kits que contengan los materiales de utilidad para el tratamiento de las condiciones patológicas de la enfermedad a tratar, por ejemplo, cáncer. El artículo de manufactura puede incluir un recipiente con cualquiera de los agentes farmacéuticos o las composiciones de la

SS

presente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden ser de diversos materiales, tal como vidrio o plástico. La etiqueta sobre el recipiente debería indicar el agente o las composiciones
5 utilizados para tratar o prevenir una o más condiciones de la enfermedad. La etiqueta también puede indicar instrucciones para la administración, etc.

Además del recipiente descrito previamente, un kit que incluye un agente farmacéutico o las composiciones de la presente
10 invención pueden incluir opcionalmente un segundo recipiente que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y
15 prospectos con instrucciones para su uso.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar, si se deseara, como un envase o dispositivo dosificador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contenga el ingrediente activo. El paquete puede incluir, por ejemplo,
20 una lámina de metal o de plástico, tal como un blíster. El paquete o dispositivo distribuidor puede suministrarse con instrucciones para la administración.

(1) *Agentes farmacéuticos o las composiciones que contienen los péptidos como ingrediente activo*

Los péptidos de esta invención pueden administrarse directamente como un agente farmacéutico o las composiciones farmacéuticas o, si fuera necesario, que ha sido formulado mediante métodos de formulación convencionales. En este último caso, además de los péptidos de esta invención, se pueden incluir los vehículos, excipientes y semejantes que comúnmente se usan para drogas, según fuera apropiado, sin limitaciones particulares. Los ejemplos de estos vehículos son agua esterilizada, solución salina fisiológica, solución amortiguadora de fosfato, líquido de cultivo y semejantes. Además, los agentes farmacéuticos o las composiciones pueden contener, según sea necesario, estabilizadores, suspensiones, conservadores, agentes tensioactivos y semejantes. Los agentes farmacéuticos o las composiciones de esta invención se pueden usar para fines anticáncer.

Los péptidos de esta invención se pueden preparar como una combinación, compuestos de dos o más de los péptidos de la invención, para inducir el CTL *in vivo*. La combinación de péptidos puede tomar la forma de un cóctel o se pueden conjugar entre sí usando técnicas estándar. Por ejemplo, los péptidos se pueden enlazar químicamente o se pueden expresar como una sola secuencia polipeptídica de fusión. Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes. Al administrar los péptidos de esta invención, estos péptidos son presentados a una gran densidad por los antígenos HLA sobre las APC, luego se inducen los CTL que reaccionan específicamente con el complejo

5X

formado entre el péptido expresado y el antígeno HLA. Como alternativa, las APC que presentan cualquiera de los péptidos de esta invención sobre su superficie celular se obtienen removiendo las APC (por ejemplo, las DC) de los sujetos, que son estimulados por los péptidos de esta invención, los CTL son inducidos en los sujetos por readministración de estas APC (por ejemplo, las DC) a los sujetos, y por resultado de ello, se puede incrementar la agresividad hacia las células cancerosas, tales como cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC).

Los agentes farmacéuticos o las composiciones para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que incluyen un péptido de esta invención como el ingrediente activo, también pueden incluir un adyuvante conocido por establecer eficazmente la inmunidad celular. Como alternativa, pueden administrarse con otros ingredientes activos y se pueden administrar por formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a un compuesto que mejora la respuesta inmune contra la proteína cuando se administra junto (o sucesivamente) con la proteína que tiene actividad inmunológica. Los adyuvantes contemplados en la presente incluyen los que se describen en la bibliografía (*Clin Microbiol Rev*, 1994, 7: 277-89). Los ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen, aunque en un sentido no limitativo, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alúmina, toxina del cólera, toxina de *salmonella* y semejantes, aunque no se limitan a los mismos.

58

Además, se pueden usar convenientemente formulaciones de liposomas, formulaciones de gránulos en las cuales el péptido está unido a esferas de unos cuantos micrómetros de diámetro y formulaciones en las cuales hay un lípido unido al péptido.

5 En algunas modalidades, los agentes farmacéuticos o las composiciones de la invención pueden incluir además un componente capaz de cebar a los CTL. Se han identificado lípidos como agentes o composiciones capaces de cebar los CTL *in vivo* contra antígenos virales. Por ejemplo, se pueden unir residuos de ácido
10 palmitico a los grupos épsilon y alfa-amino de un residuo lisina y enlazar luego a un péptido de la invención. El péptido tratado con el lípido luego puede ser administrado, ya sea directamente en una micela o partícula, incorporado en un liposoma o emulsionado en un adyuvante. Como otro ejemplo de cebado con
15 lípidos de las respuestas de los CTL, se pueden usar lipoproteínas de *E. coli*, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinliseric-serina (P3CSS) para cebar los CTL cuando se unen covalentemente a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres et al., *Nature* 1989, 342: 561-4).

20 El método de administración puede ser por vía oral, mediante inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa o semejantes, y puede ser una administración sistémica o una administración local próxima a los sitios de interés. La administración puede efectuarse mediante una sola administración
25 o reforzada con múltiples administraciones. La dosis de los péptidos de esta invención se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con la enfermedad a tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración y semejantes, y comúnmente

59

(2) *Agentes farmacéuticos o las composiciones que contienen polinucleótidos como ingrediente activo*

Los agentes farmacéuticos o las composiciones de la invención también pueden contener ácidos nucleicos que codifican para los péptidos expuestos en la presente en una forma expresable. En la presente, la frase "en una forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando es introducido en una célula, se expresará *in vivo* como un polipéptido capaz de inducir inmunidad anti-tumoral. En una modalidad ejemplificada, la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido de interés incluye los elementos reguladores necesarios para la expresión del polinucleótido. El o los polinucleótidos pueden equiparse como para lograr una inserción estable en el genoma de la célula blanco (véase, por ejemplo, Thomas KR & Capecchi MR, *Cell*, 1987, 51: 503-12 por una descripción de vectores con casetes de recombinación homóloga). Véase, por ejemplo, Wolff et al., *Science*, 1990, 247: 1465-8; Patentes de los EE.UU. N°: 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y WO 98/04720. Los ejemplos de tecnologías de distribución basados en ADN incluyen distribución de "ADN puro", facilitada (bupivacaína, polímeros, mediada por péptido), complejos de lípidos catiónicos y distribución mediada por partículas ("pistola de genes") o distribución mediada por presión (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 5,922,687).

Los péptidos de la presente invención también se pueden expresar mediante vectores virales o bacterianos. Los ejemplos de vectores de expresión incluyen huéspedes virales atenuados, tales como el virus de *vaccinia* o el virus de viruela (*Fowlpox*).

Este enfoque comprende el uso del virus de *vaccinia*, por ejemplo, como un vector para expresar las secuencias de nucleótidos que codifican para el péptido. Luego de su introducción en un huésped, el virus de *vaccinia* recombinante expresa el péptido
5 inmunogénico y de esa manera genera una respuesta inmune. Los vectores de *vaccinia* y los métodos de utilidad en los protocolos de inmunización se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N°: 4.722.848. Los ejemplos de otro vector incluyen BCG (Bacilo de Calmette Guerin). Los vectores BCG se describen en
10 Stover et al., *Nature*, 1991, 351: 456-60. Resultará evidente que existe una amplia variedad de otros vectores que son de utilidad para la administración o inmunización terapéutica, por ejemplo, vectores de virus adeno y adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores de *Salmonella typhi*, vectores de la toxina de antrax
15 destoxificada y lo semejante. Véase, por ejemplo, Shata et al., *Mol Med Today*, 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., *J Leukoc Biol*, 2000, 68: 793-806; Hipp et al., *In vivo*, 2000, 14: 571-85.

La distribución de un polinucleótido en un sujeto puede ser ya sea directa, en cuyo caso el sujeto es expuesto
20 directamente a un vector que contiene un polinucleótido, o indirecta, en cuyo caso, primero se transforman células con el polinucleótido de interés *in vitro*, luego las células se transplantan en el sujeto. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapias genéticas *in vivo* y *ex vivo*.

25 Por revisiones generales de los métodos de terapias génicas, véase Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488-505; Wu y Wu, *Biotherapy*, 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1993, 33: 573-96; Mulligan, *Science*, 1993,

260: 926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem*, 1993, 62: 191-217; *Trends in Biotechnology*, 1993, 11(5): 155-215). Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que también se pueden usar en la presente invención se describen en las eds. de Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; y Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990.

El método de administración puede ser por vía oral, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa o semejantes, y puede ser de utilidad una administración sistémica o una administración local próxima a los sitios de interés. La administración puede efectuarse mediante una sola administración o reforzada con múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el vehículo adecuado o las células transformadas con el polinucleótido que codifica para los péptidos de esta invención se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con la enfermedad a tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración y semejantes, y comúnmente comprende entre 0.001 mg y 1000 mg, por ejemplo, entre 0.001 mg y 1000 mg, por ejemplo, entre 0.1 mg y 10 mg, y puede administrarse una vez cada por unos cuantos días hasta una vez por unos pocos meses. El experto en la técnica puede seleccionar apropiadamente la dosis adecuada.

X. Métodos usando los péptidos, exosomas, APC y CTL

Los péptidos de la presente invención y los polinucleótidos que codifican para estos péptidos se pueden usar

63

para inducir APC y CTL. Los exosomas y las APC de la presente invención también se pueden usar para inducir CTL. Los péptidos, polinucleótidos, exosomas y las APC se pueden usar en combinación con cualquier otro compuesto siempre que los compuestos no
5 inhiban su inducibilidad de CTL. Por consiguiente, se puede usar cualquiera de los agentes farmacéuticos o las composiciones de la presente invención mencionados precedentemente para inducir las CTL, y además de ello, los que incluyen los péptidos y los polinucleótidos también se pueden usar para inducir APC como se
10 describirá a continuación.

(1) Método de inducción de células presentadoras de antígenos (APC)

La presente invención provee métodos para inducir las
15 APC usando los péptidos de esta invención o los polinucleótidos que codifican para los péptidos. La inducción de las APC puede efectuarse como se describió previamente en la sección "VI. Células presentadoras de antígenos". Esta invención también provee un método para inducir las APC que tienen un nivel alto de
20 inducibilidad de CTL, cuya inducción también se mencionó bajo la sección "VI. Células presentadoras de antígenos", *supra*.

Preferentemente, los métodos para inducir APC incluyen al menos un paso seleccionado entre:

- a: poner las APC en contacto con los péptidos de la
25 presente invención, y
- b: introducir los polipéptidos de la presente invención en una forma expresable en las APC.

Estos métodos para inducir las APC preferentemente se *bu*

conducen *in vitro* o *ex vivo*. Cuando los métodos se realizan *in vitro* o *ex vivo*, las APC a inducir se pueden obtener de un sujeto a tratar o de otros cuyos antígenos HLA son los mismos que los del sujeto. En una modalidad preferida, las APC inducidas con
5 los métodos de la presente portan el antígeno HLA-A2, en particular HLA-A2 (A*0201) sobre su superficie.

(2) Método de inducción de CTL

Además, la presente invención provee métodos para
10 inducir CTL usando los péptidos de esta invención, los polinucleótidos que codifican para los péptidos o exosomas o APC presentadoras de los péptidos.

La presente invención también provee métodos para inducir CTL usando un polinucleótido que codifica para un
15 polipéptido capaz de formar una subunidad del receptor de célula T (TCR) que reconoce (es decir, se une a) un complejo de los péptidos de la presente invención y antígenos HLA sobre una superficie celular. Preferentemente, los métodos para inducir CTL incluyen al menos un paso seleccionado entre:

20 a: poner una célula T positiva para CD8 en contacto con una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención, y

b: introducir un polinucleótido que codifica para un
25 polipéptido capaz de formar una subunidad TCR que reconoce un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA en una célula T positiva para CD8.

Cuando los péptidos de esta invención son administrados

65

a un sujeto, la CTL es inducida en el cuerpo del sujeto, y aumenta la fuerza de la respuesta inmune dirigida al endotelio asociado con el tumor. Como alternativa, los péptidos y los polinucleótidos que codifican para los péptidos pueden emplearse en un método terapéutico *ex vivo*, en el cual las APC derivadas del sujeto y las células positivas para CD8, o leucocitos mononucleares de sangre periférica se ponen en contacto (se estimulan) con los péptidos de esta invención *in vitro* y después de inducir las CTL, las células CTL activadas se devuelven al sujeto. Por ejemplo, el método puede incluir los pasos de:

- a: recolectar APC del sujeto,
- b: poner las APC del paso a en contacto con el péptido;
- c: mezclar las APC del paso b con células T CD⁸⁺ y co-cultivarlas para inducir CTL, y
- d: recolectar células T CD⁸⁺ del co-cultivo del paso c.

Como alternativa, de acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de los péptidos de esta invención en la elaboración de una composición farmacéutica inductora de CTL. Además, la presente invención provee un método o proceso para elaborar un agente o una composición farmacéutica inductora de CTL, en donde el método comprende el paso de mezclar o formular el péptido de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la presente invención también provee el péptido de la presente invención para inducir CTL.

Las células T CD⁸⁺ que tienen actividad citotóxica

66

obtenidas en el paso d pueden administrarse al sujeto como una vacuna. Las APC a mezclar con las células T CD8⁺ en el paso c anterior también se pueden preparar transfiriendo los genes que codifican para los péptidos de la presente en las APC según se
5 detalló previamente en la sección "VI. Células presentadoras de antígenos"; aunque no se limitan a las mismas y se puede usar cualquier APC o exosoma que presente eficazmente los péptidos de la presente a las células T en el método de la presente.

Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o
10 equivalentes de aquellos que se describen en la presente en la práctica o para evaluar la presente invención, se describen los materiales y los métodos adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas aquí se incorporan por completo en la presente a modo de
15 referencia. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos solamente se ofrecen a efectos ilustrativos y no en un sentido limitativo.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a fin de ilustrar la
20 presente invención y para asistir a un experto en la elaboración y el uso de la misma. Los ejemplos no pretenden limitar en modo alguno el alcance de la invención.

EJEMPLOS

25 Materiales y métodos

Análisis de microordenamientos de ADNc

Se condujo una determinación del perfil de expresión
génica mediante un análisis de microordenamientos de ADNc como se

67

describió previamente (Nakamura T, et al., *Oncogene*, 2004; 23: 2385-400). Se obtuvieron muestras de tejido de cáncer de páncreas y de los tejidos de páncreas normales adyacentes no cancerosos de especímenes quirúrgicos, y todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado escrito para poder participar en este estudio. En la figura 1C, la proporción de expresión relativa se calculó dividiendo el valor de la expresión del ARNm de *RAB6KIFL* en células cancerosas por el valor en la contraparte normal. En la figura 1B, la proporción de expresión relativa de tejidos normales se calculó dividiendo el valor de la expresión del ARNm de *RAB6KIFL* en cada tejido normal por el valor de la expresión del ARNm de *RAB6KIFL* del ARN control que era una mezcla de cantidades iguales de muestras de ARN de 40 tejidos normales indicados en la figura 1B.

Ratones

Se generaron ratones doblemente anestesiados Tgm HLA-A2.1 (HHD); H-2D^b^{-/-} beta 2m^{-/-} en los cuales se había introducido un gen de estructura monocadena beta 2m-HLA-A2.1 (alfa 1, alfa 2)-H-2D^b (alfa 3 citoplasmático transmembrana humana; HHD) en el Departamento de AIDS-Retrovirus, Unite d' Immunité Cellulaire Antivirale, Institute Pasteur, Francia (Pascolo S, et al., *J Exp Med* 1997; 185: 2043-51, Firat H, et al., *Eur J Immunol* 1999; 29: 3112-21) y fueron provistos amablemente por el Dr. F.A. Lemonnier. Los ratones se mantuvieron en el Centro de Recursos y Desarrollo de Animales de la Universidad de Kumamoto y se manejaron de acuerdo con los lineamientos para el cuidado de animales de la Universidad de Kumamoto.

Líneas celulares y expresión de HLA

La línea celular humana de cáncer de páncreas PANC1, la línea celular humana de cáncer de colon CaCo-2 y una línea celular T2 positivo para HLA-A2 (A*0201) y deficiente en TAP se obtuvieron de *Riken Cell Bank* (Tsukuba, Japón). La línea celular humana del cáncer de páncreas PK8 fue provista amablemente por *Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer*, Universidad de Tohoku (Sendai, Japón). La línea celular humana de cáncer de hígado SKHepl fue provista amablemente por el Dr. Kyogo Ito, Universidad de Kurume (Kurume, Japón). La expresión de HLA-A2 se examinó usando citometría de flujo con un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-HLA-A2, BB7.2 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) con el fin de seleccionar los donantes de sangre positivos para HLA-A2 y líneas celulares blanco para los ensayos de citotoxicidad. Estas células se mantuvieron *in vitro* en medio RPMI 1640 o DMEM suplementado con FCS 10% en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

20 Pacientes, muestras de sangre y tejidos tumorales.

La investigación clínica usando PBMC de los donantes fue aprobada por *Institutional Review Board* de la Universidad de Kumamoto, Kumamoto, Japón. Las muestras de sangre y los tejidos de cáncer y no cancerosos adyacentes se obtuvieron durante los procedimientos de diagnóstico de rutina después de obtener los consentimientos informados escritos formales de los pacientes en el Hospital de la Universidad de Kumamoto. También se obtuvieron muestras de sangre de donantes saludables después de recibir su

6a

consentimiento informado escrito. Todas las muestras eran anónimas, se numeraron aleatoriamente y se guardaron a -80°C hasta el momento del uso. Todos los pacientes y donantes saludables eran de nacionalidad japonesa.

5

Análisis de transcripción inversa-PCR y de transferencia

Northern

Se efectuó un análisis de transcripción inversa-PCR (RT-PCR) de tejidos y líneas celulares normales y cancerosos para
 10 evaluar la expresión de RAB6KIFL a nivel del ARNm. Las secuencias de cebadores fueron como sigue: RAB6KIFL, 5'-CTACAAGCACCCAAGGACTCT-3' sentido (SEQ ID N°: 6) y 5'-AGATGGAGAAGCGAATGTTT -3' antisentido (SEQ ID N°: 7) y *beta*-actina, 5'-CATCCACGAACTACCTTCAACT-3' sentido (SEQ ID N°: 8) y
 15 5'-TCTCCTTAGAGAGAAGTGGGGTG-3' antisentido (SEQ ID N°: 9), y se usaron reacciones de RT-PCR que consisten de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos y 32-35 ciclos de amplificación a una temperatura de fijación de 58°C . Después de la normalización por ARNm de *beta*-actina como control, se comparó la
 20 expresión del ARNm de RAB6KIFL en los tejidos y líneas celulares.

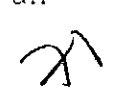
Análisis de transferencia Western y examen inmunohistoquímico

La transferencia Western y la tinción inmunohistoquímica de la proteína RAB6KIFL se condujeron como se
 25 describió previamente (Nakatsura T, et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 281: 936-44; Yoshitake Y, et al., *Clin Cancer Res*, 2004; 10: 6437-48.). Para el análisis de transferencia Western de tejidos normales humanos, se usó una transferencia de tejido

normal de adulto humano prehecha (Biochain, Hayward, CA). Los anticuerpos primarios usados en la presente, anticuerpo policlonal anti-RAB6KIFL y anticuerpo monoclonal anti- β -actina, se obtuvieron de Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, EE.UU.) y de Sigma (Steinheim, Alemania), respectivamente. La tinción inmunohistoquímica de CD4 o CD8 en los especímenes de tejido de Tgm HLA-A2.1 (HHD) inmunizados con el péptido RAB6KIFL-A2-10-284 se efectuó como se describió previamente (Matsuyoshi H, et al. 2004; 172: 776-86).

Transferencia del gen Lentiviral

Se condujo una transferencia de genes mediada por un vector lentiviral como se describió previamente (Imai K, et al., *Clin Cancer Res*, 2008; 14: 6487-95, Tahara-Hanaoka S, et al., *Exp Hematol*, 2002; 30: 11-7). En resumen, se transfectaron 17 microgramos de vectores auto-inactivantes CSII-CMV-RfA y CSIIEF-RfA (Miyoshi H, et al., *J Virol*, 1998; 72: 8150-7) que contiene ADnc RAB6KIFL y 10 microgramos de pCMV-VSV-G-RSV-Rev y pCAG-HIVgp en las células T 293 cultivadas en una placa de cultivo de 10 cm usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.). Después de 60 horas de transfección, se recuperó el medio y las partículas virales se sedimentaron por ultracentrifugación (50,000 x g, 2 horas). El sedimento se suspendió en 50 microlitros de medio RPMI 1640 y se agregaron 10 microlitros de suspensión viral a 5×10^4 células SKHepl, por cavidad en una placa de 96 cavidades de fondo plano. La expresión del gen RAB6KIFL transfectado se confirmó mediante un análisis de transferencia Western.



Inducción de CTL reactivos para RAB6KIFL de ratón y ensayo de inmunomarcado enlazado a la enzima IFN-gamma.

Se seleccionaron péptidos derivados de RAB6KIFL humanos (pureza >95%), que contenían motivos de unión para moléculas codificadas por HLA-A2 (A*0201), usando el programa de software BIMAS (BioInformatics and Molecular Analysis Section, Center for Information Technology, NIH, Bethesda, MD) y se sintetizaron 36 péptidos (American Peptide Company, CA, EE.UU.). Se usó el péptido de VIH restringido a HLA-A2 (SLYNTYATL) (SEQ ID N°: 10) como un péptido irrelevante. La inmunización de los ratones con los péptidos se efectuó como se describió previamente (Nakatsura T, et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 306: 16-25). Se analizó la frecuencia de células productoras de IFN-gamma/células de bazo 1×10^5 CD4- luego de estimulación con BM-DC singénicas (1×10^4 /cavidad) con o sin pulsos de cada péptido mediante un ensayo por inmunomarcado enlazado a enzima (ELISPOT) como se describió previamente (Komori H, et al. *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 2689-97).

20

Inducción de CTL humanos reactivos para RAB6KIFL.

Se seleccionaron péptidos derivados de RAB6KIFL humanos (pureza >95%), que contenían motivos de unión para moléculas codificadas por HLA-A2 (A*0201), usando el programa de software BIMAS (BioInformatics and Molecular Analysis Section, Center for Information Technology, NIH, Bethesda, MD) y se sintetizaron 36 péptidos (American Peptide Company, CA, EE.UU.) (Tablas 1A y B). Se usaron DC derivados de monocitos como células presentadoras de

72

antígenos para inducir respuestas de CTL contra los péptidos presentados en el contexto de HLA. Se generaron DC en cultivo *in vitro* como se describió previamente (Yoshitake Y, et al., *Clin Cancer Res*, 2004; 10: 6437-48, Harao M, et al., *Int J Cancer*, 2008; en prensa., Imai K, et al., *Clin Cancer Res*, 2008; en prensa.). En resumen, las PBMC aisladas de un voluntario normal positivo para HLA-A2 usando la solución Ficoll-Plaque (GE Healthcare UK, Ltd., Buckinghamshire, Reino Unido) se clasificaron en una población CD8⁺ y una población CD14⁺ con 10 microesferas (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Para generar las DC, la población CD14⁺ se cultivó en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos 100 ng/ml (GM-CSF; PeproTec Inc., NJ, EE.UU.) y de interleuquina (IL)-4 (PeproTec) 10 ng/ml en medio AIM-V (Invitrogen) que 15 contiene plasma autólogo inactivado por calor 2%. Después de 5 días de cultivo, se agregó OK-432 en el disco para producir las DC maduras. A los siete días después de iniciar el cultivo las DC generadas con citoquina, fueron sometidas a pulsos con péptidos de unión a HLA-A2 20 ng/ml en presencia de beta 2- 20 microglobulina 4 microgramos/ml de beta 2-microglobulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 2 horas a 37°C en AIM-V. Estas DC sometidas a pulsos con péptidos fueron irradiadas luego (40 Gy) y se mezclaron a una proporción de 1:50 con células T CD8⁺ autólogas, obtenidas por selección positiva de PBMC con 25 microesferas anti-CD8 (Miltenyi Biotec). Estos cultivos se establecieron en placas de 24 cavidades, cada cavidad contenía 1×10^5 DC sometidas a pulsos de péptido, 2×10^6 células T CD8⁺ e IL-7 recombinante humana 5 ng/ml (Wako, Osaka, Japón) en 2 ml de

23

AIM-V con plasma autólogo 2%. Después de 2 días, estos cultivos fueron suplementados con IL-2 recombinante humana (PeproTec Inc.) hasta una concentración final de 20 UI/ml. Se condujeron dos estimulaciones semanales adicionales con DC autólogas cargadas de péptido usando el mismo procedimiento los días 7 y 14. Seis días después de la última estimulación, se investigaron las respuestas específicas del antígeno de los CTL inducidos mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr y un ensayo ELISPOT con IFN-gamma.

10 **Respuestas de CTL contra líneas de células cancerosas.**

Los CTL se cocultivaron con cada una de las células cancerosas, o las células T2 sometidas a pulsos de péptidos, como células blanco (5×10^3 /cavidad) a la proporción indicada de efector/blanco y se condujo un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar como se describió previamente (Yoshitake Y, et al., *Clin Cancer Res*, 2004; 10: 6437-48. Imai K, et al., *Clin Cancer Res*, 2008; en prensa.). En resumen, las células blanco se marcaron con $\text{Na}_2 \text{ } ^{51}\text{Cr}^4$ 3,7 KBq (Perkin Elmer Life Sciences) durante 1 hora a 37°C en un incubador con CO_2 . Las células blanco marcadas se lavaron tres veces, y las células blanco sometidas a pulsos con péptidos se prepararon por incubación de las células con 20 microgramos/ml de péptido durante 3 horas a 37°C. Las células blanco se mezclaron con células efectoras en un volumen final de 200 microlitros en placas para microtitulación de fondo plano y se incubaron. Después de 6 horas de incubación, se recolectaron 50 microlitros del sobrenadante de cada cavidad y la radioactividad se cuantificó usando un contador gamma. La citotoxicidad específica se evaluó calculando el porcentaje de



liberación de ^{51}Cr específica.

El bloqueo de HLA-clase I, o HLA-DR, se efectuó como se describió previamente (Yoshitake Y, et al., *Clin Cancer Res*, 2004; 10: 6437-48., Imai K, et al., *Clin Cancer Res*, 2008; en prensa.). En resumen, antes del cocultivo de los CTL con una línea celular de cáncer en el ensayo de liberación de ^{51}Cr o el ensayo ELISPOT, las células cancerosas de interés se incubaron durante 1 hora con 10 microgramos/ml de mAb anti-clase I, W6/32, o 10 microgramos/ml de mAb anti-HLA-DR, H-DR-1, y luego se examinaron los efectos de los mAb sobre la actividad citotóxica o sobre la producción de IFN-gamma por los CTL.

Análisis estadístico.

Se usó la prueba t de Student de dos colas para evaluar la significancia estadística de las diferencias en los datos obtenidos con el ensayo ELISPOT y en el tamaño del tumor entre los grupos de tratamiento. Se consideró que un valor de $P < 0.05$ era significativo. El análisis estadístico se efectuó usando un paquete de software estadístico comercial (SPSS para Windows, versión 11.0, Chicago, IL, EE.UU.).

Resultados

Identificación del gen *RAB6KIFL* sobrerregulado en el cáncer de páncreas y diversas malignidades en base a un microordenamiento de ADNc

Los perfiles de expresión génica de 6 tejidos de cáncer de páncreas y sus contrapartes adyacentes normales habían sido examinados previamente usando un microordenamiento de ADNc de

75

todo el genoma que contiene 27,648 genes. Después del análisis, se eligieron 6 genes. Esto era porque la proporción de expresión relativa de estos genes era más de cinco veces mayor en los tejidos de cáncer de páncreas en comparación con sus contrapartes normales (figura 1A) (Imai K, et al., *Clin Cancer Res*, 2008; 14: 6487-95). La expresión de estos genes se analizó usando un análisis de microordenamientos de ADNc en 29 tipos de tejidos normales incluyendo 4 tejidos embrionarios (figura 1B). En consecuencia, se consideró a RAB6KIFL/KIF20A como un nuevo TAA del cáncer de páncreas. La expresión del gen *RAB6KIFL* en tejidos de cáncer de páncreas era marcadamente mayor en los 6 pacientes evaluados (promedio de la proporción de expresión relativa: 32,000, rango: 15-72,000). Además, el gen *RAB6KIFL* solamente se expresaba escasamente en testículos y timo (figura 1B). El nivel de expresión del gen *RAB6KIFL* también era mayor en cáncer de pulmón y vejiga en base al análisis de microordenamientos de ADNc anterior (figura 1C) (Nakamura T, et al., *Oncogene*, 2004; 23: 2385-400, Kitahara O, et al., *Cancer Res*, 2001; 61: 3544-9, Hasegawa S, et al., *Cancer Res*, 2002; 62: 7012-7, Kikuchi T, et al., *Oncogene*, 2003; 22: 2192-205, Obama K, et al., *Hepatology*, 2005; 41: 1339-48).

Expresión del ARNm *RAB6KIFL* y la proteína en órganos normales, líneas de células cancerosas y tejidos de cáncer de páncreas

La expresión del gen *RAB6KIFL* en tejidos normales a nivel del ARNm se analizó usando análisis por RT-PCR. Un análisis RT-PCR semicuantitativo de *RAB6KIFL* en los tejidos normales reveló que solamente se expresaba en testículos (figura

76

2A). La expresión del gen *RAB6KIFL* se detectó en casi todas las líneas de células cancerosas de páncreas y otras líneas positivas para HLA-A2 usando un análisis por RT-PCR (figura 2B).

A continuación, se analizó la expresión del gen
5 *RAB6KIFL* usando un análisis por RT-PCR en los tejidos de cáncer de páncreas y sus contrapartes adyacentes normales, que fueron resecados quirúrgicamente. La expresión del gen *RAB6KIFL* se detectó en 5 de 8 tejidos de cáncer de páncreas, aunque se detectó poca expresión en sus contrapartes normales (figura 2C).
10 Además, su expresión se detectó en los focos metastásicos de piel y peritoneo.

La expresión de la proteína *RAB6KIFL* en tejidos cancerosos y en diversos tejidos normales también se examinó por transferencia Western (Figs. 3A, B). La proteína *RAB6KIFL* no se
15 pudo detectar en ocho tejidos normales y para testículos se proporcionó una banda muy tenue de movilidad similar a la observada en un lisado de células PANC1 (figura 3A). Por otro lado, la proteína *RAB6KIFL* se detectó en tejidos de cáncer de páncreas de dos pacientes examinados aunque no en los tejidos
20 adyacentes normales (figura 3B).

Para confirmar la sobreexpresión asociada a tumores de la proteína *RAB6KIFL*, se examinaron luego muchos especímenes de tejido de cáncer de páncreas embebidos en parafina mediante análisis inmunohistoquímicos. Una tinción fuerte de *RAB6KIFL* se
25 observó principalmente en el citoplasma de células cancerosas en cáncer de páncreas, en tanto se observó una tinción muy débil en células acinosas y en el epitelio de ductos normales de sus tejidos de páncreas adyacentes normales (figura 4A). Además, se

77

Tabla 1A: Péptidos 9mer de unión a HLA-A2 (A*0201)
derivados de RAB6KIFL

Denominación	Posición inicial	Subsecuencia	Calificación	SEQ ID
	204	LLSNEVIWL	459	
RAB6KIFL-A2-9-12	12	LLSDDDVVV	199	SEQ ID N°: 3
	715	KMLEPPPSA	191	
	750	KLGESLQSA	164	
	300	SIWISFFEI	131	
	38	NLLSDCSVV	106	
	688	QLQEVKAKL	88	
	695	KLQQCKAEL	75	
RAB6KIFL-A2-9-809	809	CIAEQYHTV	59	SEQ ID N°: 4
	11	GLSDDDVVV	52	
	436	TLGRCIAAL	49	
	179	ILPRSLALI	41	
	183	SLALIFNSL	41	
	625	KLNILKESL	37	
	781	ILIKQDQTL	36	
	231	GLQEEELST	31	
	494	TLHVAKFSA	29	
	556	SMYGKEELL	24	
	788	TLAELQNNM	20	
	209	VIWLDSKQI	20	

La posición inicial indica el número de aminoácido desde el término N de RAB6KIFL.

La calificación de unión se deriva de Materiales y Métodos.

79

Tabla 1B: Péptidos 9mer de unión a HLA-A2 (A*0201)
derivados de RAB6KIFL

Denominación	Posición inicial	Subsecuencia	Calificación	SEQ ID
	654	LLQEARQQSV	485	
	788	TLAELQNNMV	285	
	742	RLLRTELQKL	182	
	39	LLSDCSVVST	119	
	11	GLLSDDDVVV	106	
	400	KISELSLCDL	97	
	573	LLLKERQEKL	66	
	97	VLQAPKDSFA	46	
RAB6KIFL-A2-10-284	284	AQPD TAPLPV	29	SEQ ID N°: 5
	132	GQASFFNLTV	27	
	625	KLNILKESLT	26	
	382	SIFSIRILHL	25	
	203	PLLSNEVIWL	22	
	455	NLVPPFRDSKL	21	
	506	QLVHAPPMQL	21	
	98	LQAPKDSFAL	21	
	66	KVYLRVRPLL	21	

La posición inicial indica el número de aminoácido desde el término N de RAB6KIFL.

La calificación de unión se deriva de Materiales y Métodos.

80

Identificación de epítopes de CTL derivados de RAB6KIFL y restringidos a HLA-A2 de ratón usando ratones transgénicos HLA-A2.1 (HHD)

Para identificar los epítopes de CTL derivados de RAB6KIFL y restringidos a HLA-A2, se seleccionaron 36 péptidos candidato diferentes. Cada uno consistía de 9 ó 10 aminoácidos con calificaciones predichas elevadas de unión a HLA-A2 (A*0201), el producto alélico HLA más común en todo el mundo, basado en el algoritmo de predicción de la unión al péptido HLA provisto por NIH BIMAS (Tablas 1A, B). Para determinar el que podía inducir CTL reactivos al péptido, se estimularon nuevamente *in vitro* células de bazo CD4⁺ aisladas de Tgm HLA-A2.1 (HHD), inmunizados dos veces por vía i.p. con BM-DC sometidas a pulsos con los doce conjuntos de la mezcla de tres tipos de péptidos seleccionados entre estos 36 péptidos, con BM-DC sometidas a pulsos con cada péptido. Los resultados mostraron que las células de bazo CD4⁺, estimuladas con el péptido RAB6KIFL-A2-9-12, RAB6KIFL-A2-9-809 y RAB6KIFL-A2-10-284, produjo una cantidad significativa de IFN-gamma de una manera específica del péptido en un ensayo ELISPOT (figura 5A). Estas células de bazo CD4⁺ (2×10^4) mostraron $149,0 \pm 22,2$ conteo de marcas/cavidad como respuesta a las BM-DC que habían recibido pulsos con el Péptido RAB6KIFL-A2-9-12, en tanto mostraron $32,6 \pm 9,9$ conteos de marcas/cavidad en presencia de las BM-DC sin carga de péptidos ($P < 0.01$). Asimismo, las células de bazo CD4⁺ estimuladas con BM-DC que habían recibido pulsos con el péptido RAB6KIFL-A2-9-809 mostraron $117,2 \pm 23,4$ conteo de marcas/cavidad, en tanto mostraron $51,4 \pm 7,8$ conteo de marcas/cavidad en presencia de BM-DC sin una carga de péptidos (P

<0.01). Además, las células de bazo CD4⁺ estimuladas con BM-DC que habían recibido pulsos con el péptido RAB6KIFL-A2-10-284 también mostraron $141,2 \pm 5,5$ conteo de marcas/cavidad, en tanto mostraron $19,2 \pm 5,2$ conteo de marcas/cavidad en presencia de BM-DC sin una carga de péptidos ($P < 0.01$). No se observó una respuesta específica del péptido significativa con los otros péptidos. Estos resultados sugieren que los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12, RAB6KIFL-A2-9-809 y RAB6KIFL-A2-10-284 podrían ser los péptidos del epítipo de CTL restringidos a HLA-A2 en los Tgm HLA-A2.1 (HHD) y se esperaba que estos péptidos fueran los epítopes para los CTL humanos.

No hay fenómenos autoinmunes inducidos por la inmunización con el péptido epítipo, RAB6KIFL-A2-9-809, en Tgm HLA-A2.1 (HHD)

Es muy importante investigar si la inmunización con el péptido RAB6KIFL induce, o no, una reacción autoinmune. Por consiguiente, los autores llevaron a cabo un análisis inmunohistoquímico de diversos órganos vitales con mAb anti-CD4 y anti-CD8 en Tgm HLA-A2 (HHD) después dos vacunas con el péptido RAB6KIFL-A2-9-809, cuyas secuencias de aminoácidos estaban completamente conservadas entre la RAB6KIFL humana y de ratón. Por resultado de ello, no se observó ningún cambio patológico, tal como infiltración de linfocitos o destrucción de tejidos, que sugiriera autoinmunidad (figura 5B). En estos ratones tampoco se observaron las anomalías que con frecuencia aparecen en los ratones afectados por enfermedades autoinmunes, tales como anomalías de pelo y piel, diarrea y pérdida de peso. Estos resultados indican que los linfocitos estimulados con el péptido

RAB6KIFL-A2-9-809 no atacaban los tejidos normales, al menos en los Tgm HLA-A2.

Inducción de CTL reactivos a RAB6KIFL a partir de PBMC de donantes saludables positivos para HLA-A2 (A*0201)

Se intentó generar CTL específicos de RAB6KIFL a partir de las PBMC de donantes saludables positivos para HLA-A2 (A*0201) mediante estimulación con los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 (SEQ ID N°: 3), RAB6KIFL-A2-9-809 (SEQ ID N°: 4) y RAB6KIFL-A2-10-284 (SEQ ID N°: 5). Se aislaron PBMC de donantes saludables positivos para HLA-A2, y las células T CD8⁺ clasificadas a partir de las PBMC se incubaron con las DC autólogas derivadas de monocitos sometidas a pulsos con cada péptido. Después de tres estimulaciones, se examinó la actividad citotóxica contra las células T2 sometidas a pulsos con péptidos mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr (figura 6A) y un ensayo ELISPOT con IFN-gamma (no se muestran los datos). Los CTL inducidos por las PBMC de dos donantes saludables exhibieron actividad citotóxica para las células T2 que habían recibido pulsos con los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 (SEQ ID N°: 3), RAB6KIFL-A2-9-809 (SEQ ID N°: 4) o RAB6KIFL-A2-10-284 (SEQ ID N°: 5), aunque no para las células T2 que habían recibido pulsos con el péptido irrelevante y el péptido de VIH restringido a HLA-A2 o que no presentaban carga de péptido. Se observaron respuestas similares en otros donantes (no se muestran datos). Estos resultados indican que estos CTL tenían una citotoxicidad específica del péptido.

A continuación, se investigó si estos CTL pudieron exterminar líneas de células cancerosas humanas que expresaran

83

RAB6KIFL y HLA-A2 (A*0201). Según se muestra en la figura 6B, los CTL reactivos para RAB6KIFL estimulados con los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 (izquierda), RAB6KIFL-A2-9-809 (medio) o RAB6KIFL-A2-10-284 (derecha) exhibieron citotoxicidad para PANC1 (RAB6KIFL⁺, HLA-A2⁺), CaCo-2 (RAB6KIFL⁺, HLA-A2⁺), aunque no para PK8 (RAB6KIFL⁺, HLA-A2⁻) en donantes saludables.

Además, las células SKHep1/RAB6KIFL (RAB6KIFL^{alto}, HLA-A2⁺), SKHep1 (RAB6KIFL^{bajo}, HLA-A2⁺) transfectadas con el gen RAB6KIFL (figura 2B) se usaron como células blanco para confirmar que estos péptidos eran procesados naturalmente a partir de la proteína RAB6KIFL en las células cancerosas. Según se representa en la figura 6C, los CTL inducidos por estimulación con los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 (izquierda), RAB6KIFL-A2-9-809 (medio) y RAB6KIFL-A2-10-284 (derecha) exhibieron citotoxicidad contra SKHep1/RAB6KIFL, aunque no contra SKHep1/Falso. Estos resultados sugieren que estos péptidos podrían ser procesados naturalmente y que se podrían expresar sobre la superficie de células cancerosas en el contexto de moléculas HLA-A2.

Para confirmar que los CTL inducidos reconocían las células blanco de una manera restringida a HLA-clase I, se condujo un ensayo de bloqueo de HLA-clase I usando el mAb contra HLA-clase I (W6/32) para bloquear el reconocimiento de células cancerosas por los CTL (figura 6D). Por resultado de ello, el anticuerpo anti-HLA-clase I pudo inhibir marcadamente la producción de IFN-gamma estimulada con células PANC1 en un ensayo ELISPOT de los CTL generados por estimulación con los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 (izquierda), RAB6KIFL-A2-9-809 (medio) o RAB6KIFL-A2-10-284 (derecha), con significancia estadística

81

(figura 6D, $P < 0.01$). Estos resultados indican claramente que estos CTL inducidos reconocían las células blanco que expresan RAB6KIFL de una manera restringida a HLA-clase I.

5 Análisis

De acuerdo con el ejemplo, se mostró que RAB6KIFL es un TAA como blanco promisorio en una inmunoterapia anticancerosa para el cáncer de páncreas. Para establecer una inmunoterapia anticancerosa, es importante identificar los TAA que se expresan fuertemente en células tumorales aunque no en las células normales. El análisis de microordenamientos de ADNc mostró que el ARNm de *RAB6KIFL* se sobreexpresaba en células de cáncer de páncreas (Imai K, Hirata S, Irie A, Senju S, Ikuta Y, Yokomine K, Harao M, Inoue M, Tsunoda T, Nakatsuru S, Nakagawa H, Nakamura Y, et al., *Clin Cancer Res*, 2008; 14: 6487-95) y se expresaba escasamente en sus contrapartes normales y muchos tejidos adultos normales excepto por los testículos y timo (figura 1B). Además, el gen *RAB6KIFL* también se sobreexpresaba en cáncer de pulmón y vejiga, así como en el cáncer de páncreas (figura 1C). En el análisis por RT-PCR se demostró que el ARNm *RAB6KIFL* frecuentemente se expresaba en varias líneas de células cancerosas y tejidos de cáncer de páncreas, aunque no en los tejidos adultos normales, incluyendo médula ósea, excepto por los testículos (figura 2). De manera similar, el análisis de transferencia Western y los análisis inmunohistoquímicos revelaron que la proteína RAB6KIFL fue detectada en células de cáncer de páncreas, aunque no en sus contrapartes normales y en tejidos adultos normales incluyendo timo, excepto por los

85

testículos (Figs. 3, 4). Estas observaciones sustentan una característica de RAB6KIFL como un TAA tipo cáncer de testículos a nivel de proteínas.

Para identificar los TAA como blancos útiles para una
5 inmunoterapia anticancerosa, otro punto clave comprende seleccionar los antígenos que son indispensables para la proliferación, invasión, metástasis y supervivencia de células cancerosas. Recientemente, Taniuchi et al reportaron que RAB6KIFL está implicada en la carcinogénesis de páncreas
10 (Taniuchi K, et al., *Cancer Res*, 2005; 65: 105-12), además de su rol descrito previamente en el tráfico de membranas (Echard A, et al., *Science*, 1998; 279: 580-5) y la citoquinesis (Fontijn RD, et al., *Mol Cell Biol*, 2001; 21: 2944-55, Hill E, Clarke M, Barr FA., *EMBO J*, 2000; 19: 5711-9). Mostraron que la subregulación
15 de la RAB6KIFL endógena en células de cáncer de páncreas por ARN con poca interferencia daba por resultado en una atenuación drástica del crecimiento de las células cancerosas a través de la interacción con *disc*, homólogo grande 5 (DLG5), una proteína cargo de RAB6KIFL (Taniuchi K, et al., *Cancer Res*, 2005; 65: 105-
20 12), lo cual sugiere que entonces parecería que RAB6KIFL cumple un rol crítico en la carcinogénesis de páncreas y por ello sería un blanco potencialmente útil de una inmunoterapia anticancerosa.

El potencial de RAB6KIFL como un blanco inmunoterapéutico se verificó en la presente identificando los
25 péptidos-epítopes restringidos a HLA-A2 y evaluando su inmunogenicidad. El experimento que emplea Tgm HLA-A2 (HHD) permitió identificar tres péptidos-epítopes RAB6KIFL restringidos a HLA-A2 que podrían estimular la generación de los CTL

86

restringidos a HLA-A2 de ratón por medio de vacunación con los 36 péptidos candidato predichos de presentar afinidad de unión a HLA-A2 (A*0201) con el algoritmo BIMAS, sin causar ningún fenómeno autoinmune, tal como infiltración de linfocitos o destrucción de tejidos (figura 5). Además, los CTL reactivos a RAB6KIFL se podrían generar a partir de PBMC estimuladas con estos tres péptidos en tres donantes saludables independientes (figura 6). Estos CTL podrían exterminar no sólo las células T2 que habían recibido pulsos con su péptido cognado, sino que también a las líneas de células cancerosas que expresan ambos RAB6KIFL y HLA-A2. La especificidad por el antígeno de los CTL para estos péptidos se confirmó por el hallazgo que estos CTL exhibían citotoxicidad contra las células SKHepl transfectadas con el gen RAB6KIFL humano, aunque no contra las SKHepl transfectadas falsamente. Estos datos sugieren que estos péptidos RAB6KIFL (RAB6KIFL-A2-9-12, RAB6KIFL-A2-9-809 y RAB6KIFL-A2-10-284) son procesados naturalmente a partir de la proteína RAB6KIFL en células cancerosas y luego son presentados sobre la superficie celular junto con las moléculas HLA-A2 que serán reconocidas por los CTL. Además, sería posible que el péptido RAB6KIFL-A2-9-809 pudiera ser procesado más eficazmente a partir de la proteína RAB6KIFL en comparación con los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 y RAB6KIFL-A2-10-284 en células cancerosas, porque los CTL inducidos por el péptido RAB6KIFL-A2-9-809 exhibieron una citotoxicidad más fuerte dirigida contra las células cancerosas que expresan ambos RAB6KIFL y HLA-A2 en comparación con la citotoxicidad mediada por CTL inducidos por estimulación con los péptidos RAB6KIFL-A2-9-12 o RAB6KIFL-A2-10-

284.

Se usaron los Tgm HLA-A2.1 (HHD) que carecieron de expresión de las moléculas endógenas de clase I codificadas por H-2^b de ratón para identificar los péptidos-epítopes de RAB6KIFL de CTL restringidos a HLA-A2. Se informó que los Tgm HLA-A2.1 (HHD) eran un modelo de animal versátil para la evaluación preclínica de una inmunoterapia basada en péptidos (Imai K, et al., *Clin Cancer Res*, 2008; 14: 6487-95, Komori H, et al., *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 2689-97, Harao M, et al., *Int J Cancer*, 2008; 123: 2616-25, Pascolo S, et al., *J Exp Med*, 1997; 185: 2043-51, Firat H, et al., *Eur J Immunol*, 1999; 29: 3112-21).

Para evitar los efectos adversos inducidos por vacunación con TAA, se seleccionó RAB6KIFL como un blanco que se expresaba escasamente en tejidos adultos normales. Sin embargo, era muy importante determinar si la vacunación con RAB6KIFL podría inducir enfermedades autoinmunes ya sea durante o después de una inmunoterapia anticancerosa. En la presente, las secuencias de aminoácidos de dos de los tres péptidos-epítopes no están conservados entre humanos y ratones (RAB6KIFL-A2-9-12, humano: (SEQ ID N°: 3), ratón: (SEQ ID N°: 11); RAB6KIFL-A2-10-284, humano: (SEQ ID N°: 5), ratón: AQPDTVPVSV) (SEQ ID N°: 12). Por ello, se investigó el fenómeno autoinmune en los Tgm HLA-A2 después de dos vacunaciones con el péptido RAB6KIFL-A2-9-809 en donde las secuencias de aminoácidos estaban completamente conservadas entre humanos y ratones. Una de las ventajas de usar los Tgm HLA-A2 es que la posibilidad de fenómenos autoinmunes podía ser investigada *in vivo*. Por supuesto, dado que la cantidad de tejidos normales investigados en la presente es

88

limitada, no es posible excluir la posible expresión de RAB6KIFL en algunos tejidos normales que no fueron investigados en la presente. Por ello, se debe tener cuidado con la inducción de enfermedades autoinmunes al utilizar los péptidos RAB6KIFL en una
5 inmunoterapia para el cáncer.

En conclusión, los resultados actuales sugieren que RAB6KIFL es un TAA que contiene péptidos-epítopes capaces de generar CTL reactivos contra células cancerosas que expresan ambos RAB6KIFL y HLA-A2. Dado que RAB6KIFL representa una gran
10 expresión en un amplio rango de malignidades en humanos, RAB6KIFL constituye entonces un blanco promisorio en una inmunoterapia basada en péptidos para el tratamiento de un amplio espectro de malignidades, en especial cáncer de páncreas. Por lo tanto, la investigación de la capacidad de inducción de CTL específicos de
15 RAB6KIFL en pacientes con cáncer de páncreas continúa siendo un tema de gran importancia para aplicación clínica.

Aplicabilidad Industrial

La presente invención describe nuevos TAA, en particular aquellos derivados de RAB6KIFL, que inducen respuestas inmunes anti-tumorales potentes y específicas y que tienen aplicación en un amplio conjunto de tipos de cáncer. Tales TAA garantizan el desarrollo adicional como vacunas de péptidos contra las enfermedades asociadas con RAB6KIFL, por ejemplo,
25 cánceres tales como cáncer de vejiga, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), osteosarcoma, cáncer de páncreas, carcinoma renal y tumores de tejido suave.

89

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito el presente invento, se considera como una novedad y, por lo tanto, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes

5

REIVINDICACIONES:

1. Un oligopéptido aislado, caracterizado porque comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID N°: 3, 4 y 5.

10 2. El oligopéptido según la reivindicación 1, caracterizado porque se sustituyen, suprimen, insertan y/o agregan 1, 2 o varios aminoácidos, en donde el oligopéptido tiene inducibilidad de linfocitos T citotóxicos (CTL).

3. El oligopéptido según la reivindicación 2, caracterizado porque el oligopéptido tiene al menos una
15 sustitución seleccionada del grupo que consiste de:

(a) el segundo aminoácido a partir del término N es leucina o metionina, y

(b) el aminoácido C-terminal es valina o leucina.

20 4. Un agente farmacéutico para el tratamiento y/o profilaxis de cáncer, y/o para prevenir la recurrencia post-operatoria del mismo, caracterizado porque el agente comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más oligopéptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un polinucleótido que codifica para el oligopéptido.

25 5. El agente farmacéutico según la reivindicación 4, caracterizado porque está formulado para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2.

6. El agente farmacéutico según la reivindicación 4,
a\

caracterizado porque el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC).

7. El agente farmacéutico según la reivindicación 4, caracterizado porque es una vacuna.

8. Un exosoma, que presenta sobre su superficie un complejo caracterizado porque comprende el oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un antígeno HLA.

9. El exosoma según la reivindicación 8, caracterizado porque el antígeno HLA es HLA-A2.

10. Un método para inducir una célula presentadora de antígenos, caracterizado por utilizar el oligopéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

11. El método según la reivindicación 10, en donde el método se caracteriza porque comprende los pasos seleccionados del grupo que consiste de:

(a) poner una célula presentadora de antígenos en contacto con el oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y

(b) introducir un polinucleótido que codifica para el oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una célula presentadora de antígenos.

12. Un método para inducir un CTL, caracterizado por utilizar el oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

13. El método según la reivindicación 12, en donde el

al

método se caracteriza porque comprende los pasos seleccionados del grupo que consiste de:

(a) poner una célula T positiva para CD8 en contacto con una célula presentadora de antígenos y/o un exosoma que
5 presenta el oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 sobre su superficie, y

(b) introducir un polinucleótido que codifica para un polipéptido que sea capaz de formar una subunidad del receptor de
10 célula T (TCR) que se une a un complejo del oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un antígeno HLA sobre una superficie celular presentadora de antígenos, en una célula T positiva para CD8.

14. Un CTL aislado, caracterizado porque busca como blanco al oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1
15 a 3.

15. El CTL según la reivindicación 14, caracterizado porque tiene la capacidad de unirse a un complejo del oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un antígeno HLA sobre una superficie de la célula presentadora de
20 antígenos.

16. El CTL aislado, caracterizado porque se induce al utilizar el oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

17. El CTL según la reivindicación 16, caracterizado
25 porque se induce mediante el método según la reivindicación 13.

18. Una célula presentadora de antígenos aislada, caracterizada porque presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el oligopéptido según cualquiera de las

a3

reivindicaciones 1 a 3.

19. La célula presentadora de antígenos según la reivindicación 18, caracterizada porque se induce mediante el método según la reivindicación 10 ó 11.

5 20. Un método para inducir una respuesta inmune contra el cáncer en un sujeto, caracterizado porque comprende el paso de administrar al sujeto una vacuna que comprende al menos un ingrediente activo seleccionado del grupo que consiste de:

10 (a) uno o más oligopéptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un fragmento inmunológicamente activo de los mismos;

(b) uno o más polinucleótidos que codifican para el oligopéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un fragmento inmunológicamente activo de los mismos;

15 (c) uno o más CTL aislados según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17;

(d) una o más células presentadoras de antígenos aisladas según la reivindicación 18 ó 19.

20 21. Un agente farmacéutico para inducir un CTL, caracterizado porque el agente comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más oligopéptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un polinucleótido que codifica para el oligopéptido, o una célula presentadora de antígenos aislada según la reivindicación 18 ó 19.

25 22. El uso de un ingrediente activo seleccionado del grupo que consiste de:

(a) uno o más oligopéptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;

94

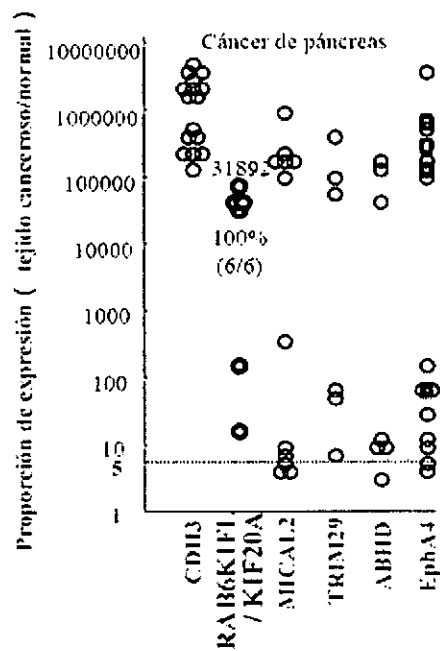


Fig. 1A

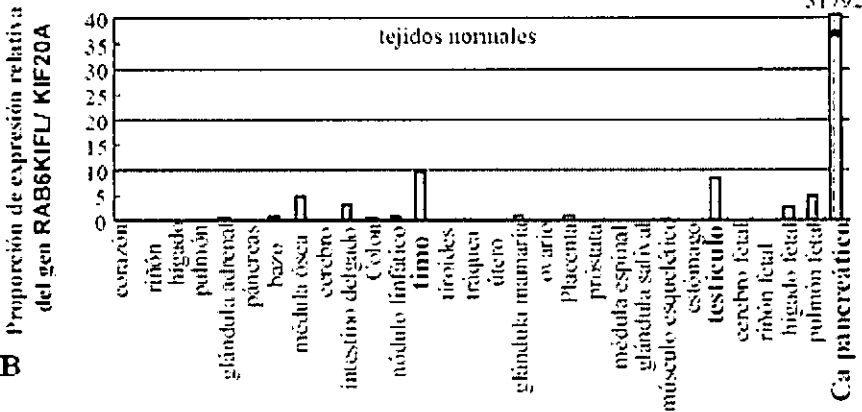
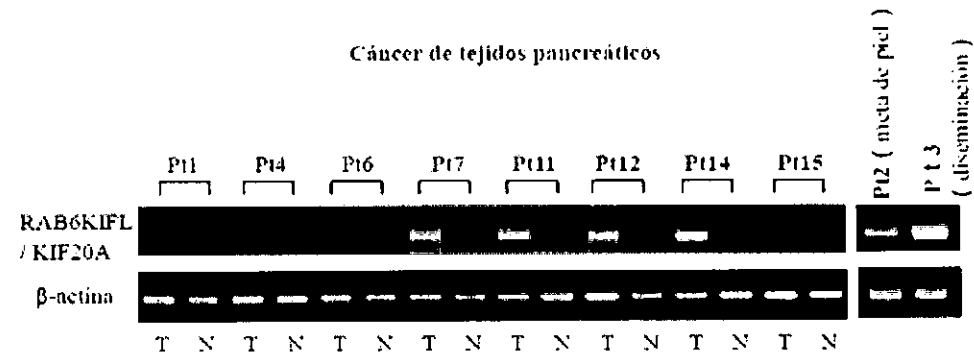
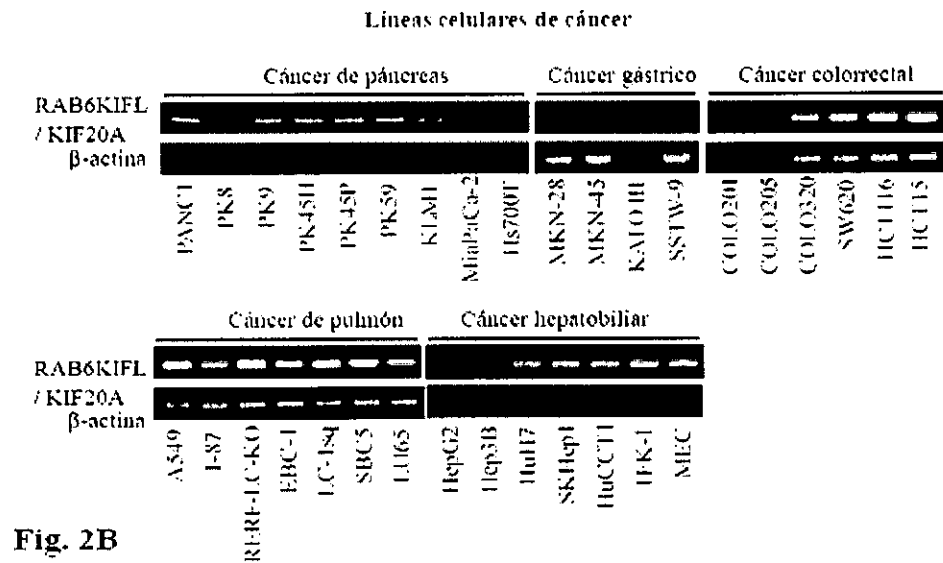
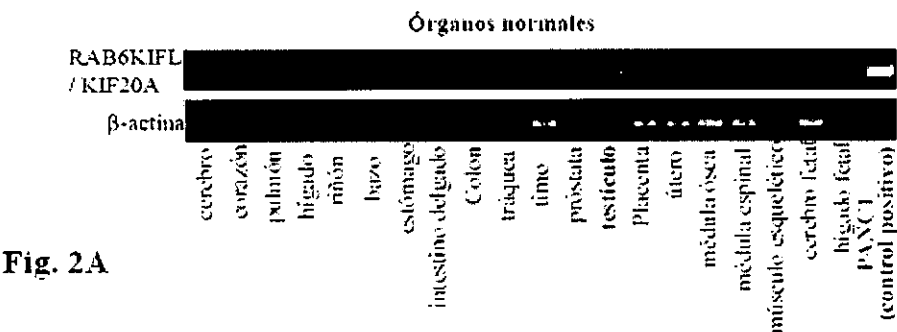


Fig. 1B

Diversas formas malignas	n	Índice positivo (%)	Proporción de expresión relativa (media)
Cáncer de páncreas	6	100	31892
Cáncer de pulmón de cél. peq.	15	100	22
Cáncer de vejiga	31	97	20471
Cáncer de pulmón de cél. no peq.	22	91	25779
Carcinoma colangiocelular	11	64	3781
Cáncer de mama	61	44	322
Cáncer de próstata	36	31	4
Carcinoma de células renales	11	27	5
Cáncer de esófago	13	15	3
Cáncer colorrectal	31	3	2
Cáncer gástrico	4	0	0

Fig. 1C



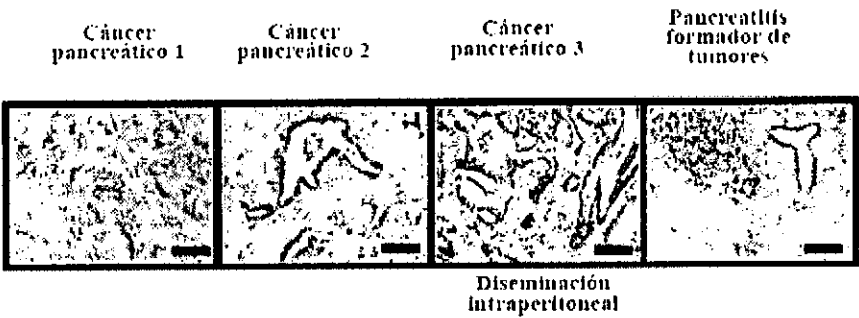


Fig. 4A

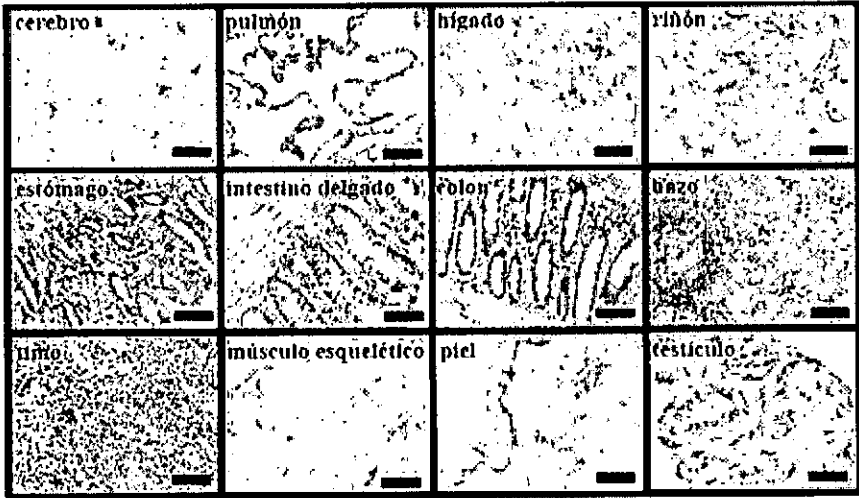


Fig. 4B

100µm

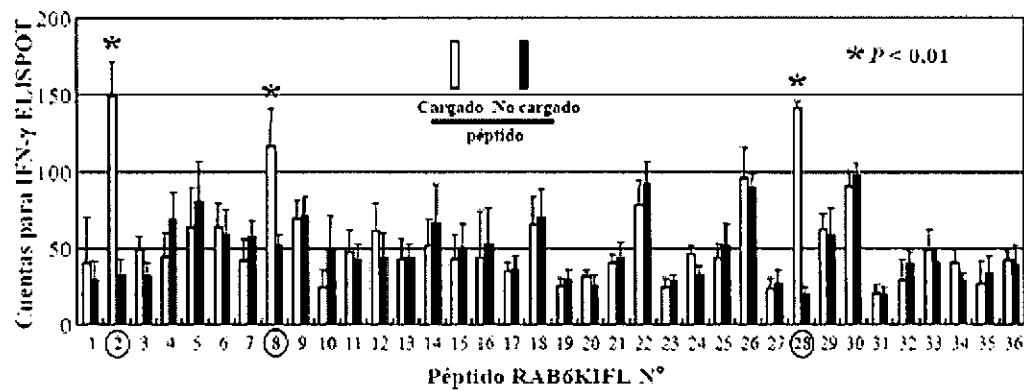


Fig. 5A

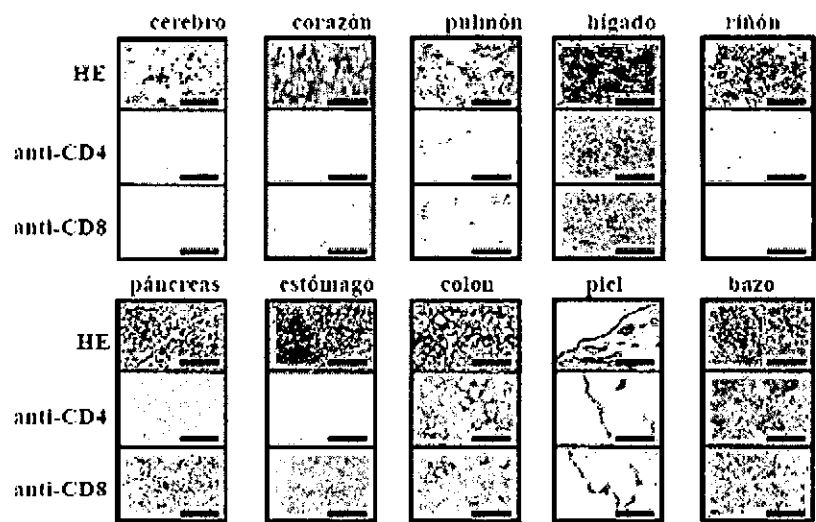


Fig. 5B

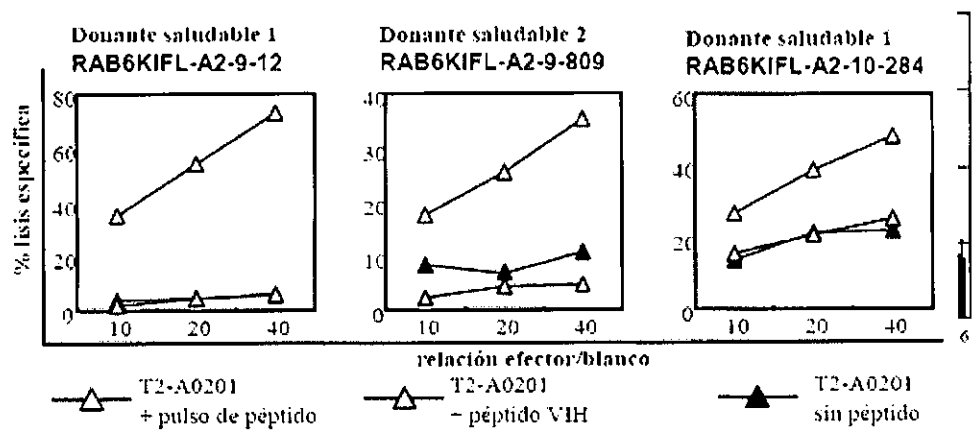


Fig. 6A

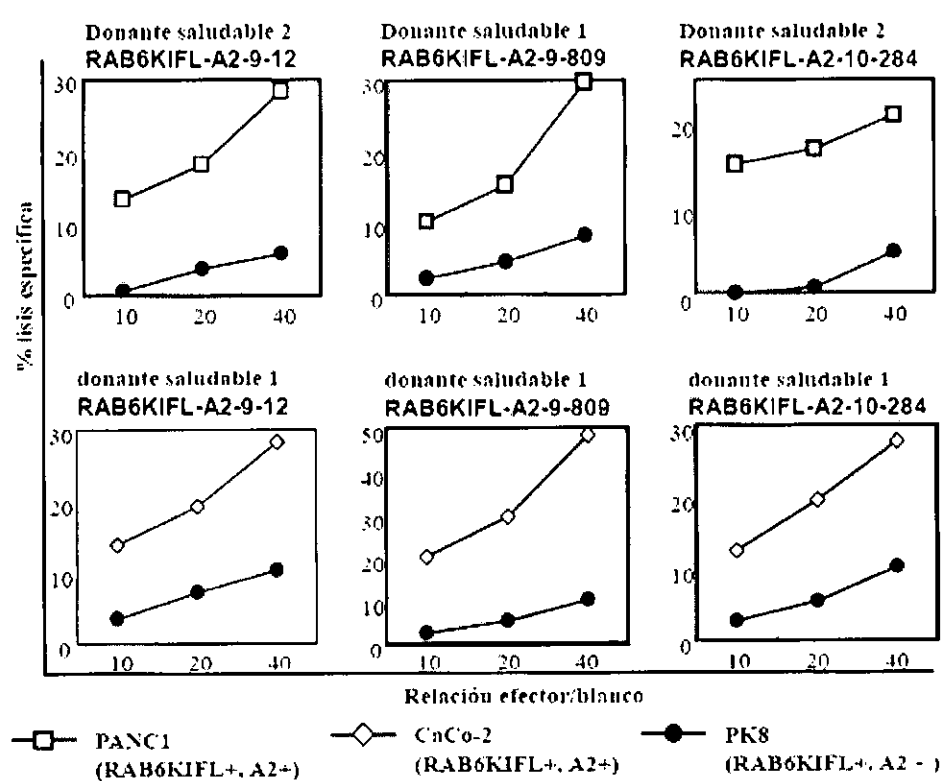


Fig. 6B

101

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDO-EPITOPE RAB6KIFL/KIF20A Y VACUNAS QUE CONTIENEN AL MISMO

<130> ONC-A0824P

<150> US61/197,106

<151> 2008-10-22

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 3471

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

tttttcccct taagacaaag caagcacccct aaaccagtta ccctgtgcac tccgtttaag	60
attgttgcta aggaaggaca ggagttggct gctgaagcct caagatttcc tttaggtctt	120
taggtaagaa atgtctaagg ttcaaggaaa aaggttaagt tggaagaatc ccaggcaaaa	180
taagtgcgaa tccacgacag ttggtaaccc ggaccacat tagaactcag aggtcaagca	240
gaagcgaacg actggaattc cagtcaggcc cgccccctt ccttacgcgg attggtagct	300
gcaggttcc ctatctgatt ggccgaacga acgcagcgcg taatttaaaa tattgtatct	360
gtaacaaagc tgcacctcgt gggcggagtt gtgctctgcg gctgcgaaag tccagcttcg	420
gcgactaggt gtgagtaagc cagtatccca ggaggagcaa gtggcacgtc ttcggaccta	480
ggctgcccct gcgcgc atg tcg caa ggg atc ctt tct ccg cca gcg ggc ttg	532
Met Ser Gln Gly Ile Leu Ser Pro Pro Ala Gly Leu	
1 5 10	
ctg tcc gat gac gat gtc gta gtt tct ccc atg ttt gag tcc aca gct	580
Leu Ser Asp Asp Asp Val Val Val Ser Pro Met Phe Glu Ser Thr Ala	
15 20 25	
gca gat ttg ggg tct gtg gta cgc aag aac ctg cta tca gac tgc tct	628
Ala Asp Leu Gly Ser Val Val Arg Lys Asn Leu Leu Ser Asp Cys Ser	
30 35 40	
gtc gtc tct acc tcc cta gag gac aag cag cag gtt cca tct gag gac	676
Val Val Ser Thr Ser Leu Glu Asp Lys Gln Gln Val Pro Ser Glu Asp	
45 50 55 60	
agt atg gag aag gtg aaa gta tac ttg agg gtt agg ccc ttg tta cct	724
Ser Met Glu Lys Val Lys Val Tyr Leu Arg Val Arg Pro Leu Leu Pro	
65 70 75	

tca gag ttg gaa cga cag gaa gat cag ggt tgt gtc cgt att gag aat	772
Ser Glu Leu Glu Arg Gln Glu Asp Gln Gly Cys Val Arg Ile Glu Asn	
80 85 90	
gtg gag acc ctt gtt cta caa gca ccc aag gac tct ttt gcc ctg aag	820
Val Glu Thr Leu Val Leu Gln Ala Pro Lys Asp Ser Phe Ala Leu Lys	
95 100 105	
agc aat gaa cgg gga att ggc caa gcc aca cac agg ttc acc ttt tcc	868
Ser Asn Glu Arg Gly Ile Gly Gln Ala Thr His Arg Phe Thr Phe Ser	
110 115 120	
cag atc ttt ggg cca gaa gtg gga cag gca tcc ttc ttc aac cta act	916
Gln Ile Phe Gly Pro Glu Val Gly Gln Ala Ser Phe Phe Asn Leu Thr	
125 130 135 140	
gtg aag gag atg gta aag gat gta ctc aaa ggg cag aac tgg ctc atc	964
Val Lys Glu Met Val Lys Asp Val Leu Lys Gly Gln Asn Trp Leu Ile	
145 150 155	
tat aca tat gga gtc act aac tca ggg aaa acc cac acg att caa ggt	1012
Tyr Thr Tyr Gly Val Thr Asn Ser Gly Lys Thr His Thr Ile Gln Gly	
160 165 170	
acc atc aag gat gga ggg att ctc ccc cgg tcc ctg gcg ctg atc ttc	1060
Thr Ile Lys Asp Gly Gly Ile Leu Pro Arg Ser Leu Ala Leu Ile Phe	
175 180 185	
aat agc ctc caa ggc caa ctt cat cca aca cct gat ctg aag ccc ttg	1108
Asn Ser Leu Gln Gly Gln Leu His Pro Thr Pro Asp Leu Lys Pro Leu	
190 195 200	
ctc tcc aat gag gta atc tgg cta gac agc aag cag atc cga cag gag	1156
Leu Ser Asn Glu Val Ile Trp Leu Asp Ser Lys Gln Ile Arg Gln Glu	
205 210 215 220	
gaa atg aag aag ctg tcc ctg cta aat gga ggc ctc caa gag gag gag	1204
Glu Met Lys Lys Leu Ser Leu Leu Asn Gly Gly Leu Gln Glu Glu Glu	
225 230 235	
ctg tcc act tcc ttg aag agg agt gtc tac atc gaa agt cgg ata ggt	1252
Leu Ser Thr Ser Leu Lys Arg Ser Val Tyr Ile Glu Ser Arg Ile Gly	
240 245 250	
acc agc acc agc ttc gac agt ggc att gct ggg ctc tct tct atc agt	1300
Thr Ser Thr Ser Phe Asp Ser Gly Ile Ala Gly Leu Ser Ser Ile Ser	
255 260 265	
cag tgt acc agc agt agc cag ctg gat gaa aca agt cat cga tgg gca	1348
Gln Cys Thr Ser Ser Ser Gln Leu Asp Glu Thr Ser His Arg Trp Ala	
270 275 280	
cag cca gac act gcc cca cta cct gtc ccg gca aac att cgc ttc tcc	1396
Gln Pro Asp Thr Ala Pro Leu Pro Val Pro Ala Asn Ile Arg Phe Ser	
285 290 295 300	
atc tgg atc tca ttc ttt gag atc tac aac gaa ctg ctt tat gac cta	1444
Ile Trp Ile Ser Phe Phe Glu Ile Tyr Asn Glu Leu Leu Tyr Asp Leu	
305 310 315	
tta gaa ccg cct agc caa cag cgc aag agg cag act ttg cgg cta tgc	1492

Leu Glu Pro Pro Ser Gln Gln Arg Lys Arg Gln Thr Leu Arg Leu Cys	
320 325 330	
gag gat caa aat ggc aat ccc tat gtg aaa gat ctc aac tgg att cat	1540
Glu Asp Gln Asn Gly Asn Pro Tyr Val Lys Asp Leu Asn Trp Ile His	
335 340 345	
gtg caa gat gct gag gag gcc tgg aag ctc cta aaa gtg ggt cgt aag	1588
Val Gln Asp Ala Glu Glu Ala Trp Lys Leu Leu Lys Val Gly Arg Lys	
350 355 360	
aac cag agc ttt gcc agc acc cac ctc aac cag aac tcc agc cgc agt	1636
Asn Gln Ser Phe Ala Ser Thr His Leu Asn Gln Asn Ser Ser Arg Ser	
365 370 375 380	
cac agc atc ttc tca atc agg atc cta cac ctt cag ggg gaa gga gat	1684
His Ser Ile Phe Ser Ile Arg Ile Leu His Leu Gln Gly Glu Gly Asp	
385 390 395	
ata gtc ccc aag atc agc gag ctg tca ctc tgt gat ctg gct ggc tca	1732
Ile Val Pro Lys Ile Ser Glu Leu Ser Leu Cys Asp Leu Ala Gly Ser	
400 405 410	
gag cgc tgc aaa gat cag aag agt ggt gaa cgg ttg aag gaa gca gga	1780
Glu Arg Cys Lys Asp Gln Lys Ser Gly Glu Arg Leu Lys Glu Ala Gly	
415 420 425	
aac att aac acc tct cta cac acc ctg ggc cgc tgt att gct gcc ctt	1828
Asn Ile Asn Thr Ser Leu His Thr Leu Gly Arg Cys Ile Ala Ala Leu	
430 435 440	
cgt caa aac cag cag aac cgg tca aag cag aac ctg gtt ccc ttc cgt	1876
Arg Gln Asn Gln Gln Asn Arg Ser Lys Gln Asn Leu Val Pro Phe Arg	
445 450 455 460	
gac agc aag ttg act cga gtg ttc caa ggt ttc ttc aca ggc cga ggc	1924
Asp Ser Lys Leu Thr Arg Val Phe Gln Gly Phe Phe Thr Gly Arg Gly	
465 470 475	
cgt tcc tgc atg att gtc aat gtg aat ccc tgt gca tct acc tat gat	1972
Arg Ser Cys Met Ile Val Asn Val Asn Pro Cys Ala Ser Thr Tyr Asp	
480 485 490	
gaa act ctt cat gtg gcc aag ttc tca gcc att gct agc cag ctt gtg	2020
Glu Thr Leu His Val Ala Lys Phe Ser Ala Ile Ala Ser Gln Leu Val	
495 500 505	
cat gcc cca cct atg caa ctg gga ttc cca tcc ctg cac tcg ttc atc	2068
His Ala Pro Pro Met Gln Leu Gly Phe Pro Ser Leu His Ser Phe Ile	
510 515 520	
aag gaa cat agt ctt cag gta tcc ccc agc tta gag aaa ggg gct aag	2116
Lys Glu His Ser Leu Gln Val Ser Pro Ser Leu Glu Lys Gly Ala Lys	
525 530 535 540	
gca gac aca ggc ctt gat gat gat att gaa aat gaa gct gac atc tcc	2164
Ala Asp Thr Gly Leu Asp Asp Asp Ile Glu Asn Glu Ala Asp Ile Ser	
545 550 555	
atg tat ggc aaa gag gag ctc cta caa gtt gtg gaa gcc atg aag aca	2212
Met Tyr Gly Lys Glu Glu Leu Leu Gln Val Val Glu Ala Met Lys Thr	

560	565	570	
ctg ctt ttg aag gaa cga cag gaa aag cta cag ctg gag atg cat ctc Leu Leu Leu Lys Glu Arg Gln Glu Lys Leu Gln Leu Glu Met His Leu 575 580 585			2260
cga gat gaa att tgc aat gag atg gta gaa cag atg caa cag cgg gaa Arg Asp Glu Ile Cys Asn Glu Met Val Glu Gln Met Gln Gln Arg Glu 590 595 600			2308
cag tgg tgc agt gaa cat ttg gac acc caa aag gaa cta ttg gag gaa Gln Trp Cys Ser Glu His Leu Asp Thr Gln Lys Glu Leu Leu Glu Glu 605 610 615 620			2356
atg tat gaa gaa aaa cta aat atc ctc aag gag tca ctg aca agt ttt Met Tyr Glu Glu Lys Leu Asn Ile Leu Lys Glu Ser Leu Thr Ser Phe 625 630 635			2404
tac caa gaa gag att cag gag cgg gat gaa aag att gaa gag cta gaa Tyr Gln Glu Glu Ile Gln Glu Arg Asp Glu Lys Ile Glu Glu Leu Glu 640 645 650			2452
gct ctc ttg cag gaa gcc aga caa cag tca gtg gcc cat cag caa tca Ala Leu Leu Gln Glu Ala Arg Gln Gln Ser Val Ala His Gln Gln Ser 655 660 665			2500
ggg tct gaa ttg gcc cta cgg cgg tca caa agg ttg gca gct tct gcc Gly Ser Glu Leu Ala Leu Arg Arg Ser Gln Arg Leu Ala Ala Ser Ala 670 675 680			2548
tcc acc cag cag ctt cag gag gtt aaa gct aaa tta cag cag tgc aaa Ser Thr Gln Gln Leu Gln Glu Val Lys Ala Lys Leu Gln Gln Cys Lys 685 690 695 700			2596
gca gag cta aac tct acc act gaa gag ttg cat aag tat cag aaa atg Ala Glu Leu Asn Ser Thr Thr Glu Glu Leu His Lys Tyr Gln Lys Met 705 710 715			2644
tta gaa cca cca ccc tca gcc aag ccc ttc acc att gat gtg gac aag Leu Glu Pro Pro Pro Ser Ala Lys Pro Phe Thr Ile Asp Val Asp Lys 720 725 730			2692
aag tta gaa gag ggc cag aag aat ata agg ctg ttg cgg aca gag ctt Lys Leu Glu Glu Gly Gln Lys Asn Ile Arg Leu Leu Arg Thr Glu Leu 735 740 745			2740
cag aaa ctt ggt gag tct ctc caa tca gca gag aga gct tgt tgc cac Gln Lys Leu Gly Glu Ser Leu Gln Ser Ala Glu Arg Ala Cys Cys His 750 755 760			2788
agc act ggg gca gga aaa ctt cgt caa gcc ttg acc act tgt gat gac Ser Thr Gly Ala Gly Lys Leu Arg Gln Ala Leu Thr Thr Cys Asp Asp 765 770 775 780			2836
atc tta atc aaa cag gac cag act ctg gct gaa ctg cag aac aac atg Ile Leu Ile Lys Gln Asp Gln Thr Leu Ala Glu Leu Gln Asn Asn Met 785 790 795			2884
gtg cta gtg aaa ctg gac ctt cgg aag aag gca gca tgt att gct gag Val Leu Val Lys Leu Asp Leu Arg Lys Lys Ala Ala Cys Ile Ala Glu 800 805 810			2932

106

cag tat cat act gtg ttg aaa ctc caa ggc cag gtt tct gcc aaa aag 2980
 Gln Tyr His Thr Val Leu Lys Leu Gln Gly Gln Val Ser Ala Lys Lys
 815 820 825

 cgc ctt ggt acc aac cag gaa aat cag caa cca aac caa caa cca cca 3028
 Arg Leu Gly Thr Asn Gln Glu Asn Gln Gln Pro Asn Gln Gln Pro Pro
 830 835 840

 ggg aag aaa cca ttc ctt cga aat tta ctt ccc cga aca cca acc tgc 3076
 Gly Lys Lys Pro Phe Leu Arg Asn Leu Leu Pro Arg Thr Pro Thr Cys
 845 850 855 860

 caa agc tca aca gac tgc agc cct tat gcc cgg atc cta cgc tca cgg 3124
 Gln Ser Ser Thr Asp Cys Ser Pro Tyr Ala Arg Ile Leu Arg Ser Arg
 865 870 875

 cgt tcc cct tta ctc aaa tct ggg cct ttt ggc aaa aag tac taa 3169
 Arg Ser Pro Leu Leu Lys Ser Gly Pro Phe Gly Lys Lys Tyr
 880 885 890

 ggctgtgggg aaagagaaga gcagtcattg ccctgaggtg ggtcagctac tctcctgaag 3229
 aaataggtct cttttatgct ttaccatata tcaggaatta tatccaggat gcaataactca 3289
 gacactagct tttttctcac ttttgtatta taaccaccta tgtaattctca tggtgttggt 3349
 tttttttatt tacttatatg attttctatgc acacaaaaac agttatatta aagatattat 3409
 tgttcacatt ttttattgaa ttccaaatgt agcaaaatca ttaaaacaaa ttataaaagg 3469
 ga 3471

<210> 2
 <211> 890
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 2
 Met Ser Gln Gly Ile Leu Ser Pro Pro Ala Gly Leu Leu Ser Asp Asp
 1 5 10 15

Asp Val Val Val Ser Pro Met Phe Glu Ser Thr Ala Ala Asp Leu Gly
 20 25 30

Ser Val Val Arg Lys Asn Leu Leu Ser Asp Cys Ser Val Val Ser Thr
 35 40 45

Ser Leu Glu Asp Lys Gln Gln Val Pro Ser Glu Asp Ser Met Glu Lys
 50 55 60

Val Lys Val Tyr Leu Arg Val Arg Pro Leu Leu Pro Ser Glu Leu Glu
 65 70 75 80

Arg Gln Glu Asp Gln Gly Cys Val Arg Ile Glu Asn Val Glu Thr Leu
 85 90 95

Val Leu Gln Ala Pro Lys Asp Ser Phe Ala Leu Lys Ser Asn Glu Arg
 100 105 110

Gly Ile Gly Gln Ala Thr His Arg Phe Thr Phe Ser Gln Ile Phe Gly
 115 120 125

Pro Glu Val Gly Gln Ala Ser Phe Phe Asn Leu Thr Val Lys Glu Met
 130 135 140

Val Lys Asp Val Leu Lys Gly Gln Asn Trp Leu Ile Tyr Thr Tyr Gly
 145 150 155 160

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

Gly Gly Ile Leu Pro Arg Ser Leu Ala Leu Ile Phe Asn Ser Leu Gln
 180 185 190

Gly Gln Leu His Pro Thr Pro Asp Leu Lys Pro Leu Leu Ser Asn Glu
 195 200 205

Val Ile Trp Leu Asp Ser Lys Gln Ile Arg Gln Glu Glu Met Lys Lys
 210 215 220

Leu Ser Leu Leu Asn Gly Gly Leu Gln Glu Glu Glu Leu Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Leu Lys Arg Ser Val Tyr Ile Glu Ser Arg Ile Gly Thr Ser Thr Ser
 245 250 255

Phe Asp Ser Gly Ile Ala Gly Leu Ser Ser Ile Ser Gln Cys Thr Ser
 260 265 270

Ser Ser Gln Leu Asp Glu Thr Ser His Arg Trp Ala Gln Pro Asp Thr
 275 280 285

Ala Pro Leu Pro Val Pro Ala Asn Ile Arg Phe Ser Ile Trp Ile Ser
 290 295 300

Phe Phe Glu Ile Tyr Asn Glu Leu Leu Tyr Asp Leu Leu Glu Pro Pro
 305 310 315 320

Ser Gln Gln Arg Lys Arg Gln Thr Leu Arg Leu Cys Glu Asp Gln Asn

109

Glu Arg Gln Glu Lys Leu Gln Leu Glu Met His Leu Arg Asp Glu Ile
580 585 590

Cys Asn Glu Met Val Glu Gln Met Gln Gln Arg Glu Gln Trp Cys Ser
595 600 605

Glu His Leu Asp Thr Gln Lys Glu Leu Leu Glu Glu Met Tyr Glu Glu
610 615 620

Lys Leu Asn Ile Leu Lys Glu Ser Leu Thr Ser Phe Tyr Gln Glu Glu
625 630 635 640

Ile Gln Glu Arg Asp Glu Lys Ile Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu Gln
645 650 655

Glu Ala Arg Gln Gln Ser Val Ala His Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu
660 665 670

Ala Leu Arg Arg Ser Gln Arg Leu Ala Ala Ser Ala Ser Thr Gln Gln
675 680 685

Leu Gln Glu Val Lys Ala Lys Leu Gln Gln Cys Lys Ala Glu Leu Asn
690 695 700

Ser Thr Thr Glu Glu Leu His Lys Tyr Gln Lys Met Leu Glu Pro Pro
705 710 715 720

Pro Ser Ala Lys Pro Phe Thr Ile Asp Val Asp Lys Lys Leu Glu Glu
725 730 735

Gly Gln Lys Asn Ile Arg Leu Leu Arg Thr Glu Leu Gln Lys Leu Gly
740 745 750

Glu Ser Leu Gln Ser Ala Glu Arg Ala Cys Cys His Ser Thr Gly Ala
755 760 765

Gly Lys Leu Arg Gln Ala Leu Thr Thr Cys Asp Asp Ile Leu Ile Lys
770 775 780

Gln Asp Gln Thr Leu Ala Glu Leu Gln Asn Asn Met Val Leu Val Lys
785 790 795 800

Leu Asp Leu Arg Lys Lys Ala Ala Cys Ile Ala Glu Gln Tyr His Thr
805 810 815



(43) International Publication Date
29 April 2010 (29.04.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/047062 A1

(51) International Patent Classification:

C12N 15/09 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/JP2009/005382

(22) International Filing Date:

15 October 2009 (15.10.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/197,106 22 October 2008 (22.10.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.** [JP/JP]; 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 2130012 (JP).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **NISHIMURA, Yasuharu** [JP/JP]; c/o NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY, 1-1, Honjo 1-chome, Kumamoto-shi, Kumamoto, 8608566 (JP). **IMAI, Katsunori** [JP/JP]; c/o NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY, 1-1, Honjo 1-chome, Kumamoto-shi, Kumamoto, 8608566 (JP). **NAKAMURA, Yusuke** [JP/JP]; c/o THE UNIVERSITY OF TOKYO, 3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku, Tokyo, 1138654 (JP). **TSUNODA, Takuya** [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 2130012 (JP).

(74) Agents: **SHIMIZU, Hatsushi et al.**; Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, Ibaraki, 3000847 (JP).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: RAB6KIFL/KIF20A EPTOPE PEPTIDE AND VACCINES CONTAINING THE SAME

(57) Abstract: The present invention provides oligopeptides comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5. The present invention also provides a pharmaceutical composition containing the amino acid sequence of selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5 formulated for the treatment or prevention of cancer in a subject. Furthermore, the present invention provides a method of inducing immune response using such oligopeptides and pharmaceutical agents.

WO 2010/047062 A1



No. 11-050897-00000-0000

Fecha: 2011-04-26 15:30:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DL

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



No. 11-050887-00001-0000

Fecha: 2011-05-26 16:08:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Trb. 11 PATENTEIYII Evb: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 3

Clarke, M...

COLOMBIA

P-2889

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Ref.: Expediente No. 11.050.897
Solicitud de Patente a nombre de
ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

Yo, DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.** domiciliada en Kawasaki-shi, Kanawa, Japón, solicitante de la patente de la referencia, atentamente me permito presentar:

1. Formulario de presentación PCT en el cual consta la cesión de derechos de los inventores bajo la regla 4.17.

Sobre el particular, es importante resaltar que de conformidad con las normas legales vigentes, artículo 1 de la Resolución 210 de 2001, expedida por el Superintendente de Industria y Comercio y artículo 2 de la Convención de la Haya, el documento en inglés que se pretenda aportar como parte de los trámites de propiedad industrial ante la Superintendencia de Industria y Comercio no requieren traducción. Por otro lado, la legalización consular y/o diplomática de los documentos expedidos en el extranjero no es necesaria. Por lo tanto, el documento de cesión anexo a este memorial es válidamente presentado en idioma inglés y con la correspondiente apostilla.

Señor Superintendente,


DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN
C.C. 41.654.882 de Bogotá.
T.P. 20824 CSJ

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51 bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(iv)		an assignment from NISHIMURA, Yasuharu to NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY, dated 22 September 2008 (22.09.2008)
VIII-2-1(iv)		an assignment from IMAI, Katsunori to NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY, dated 22 September 2008 (22.09.2008)
VIII-2-1(iv)		an assignment from NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY to ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., dated 01 October 2008 (01.10.2008)
VIII-2-1(iv)		an assignment from NAKAMURA, Yusuke to THE UNIVERSITY OF TOKYO, dated 25 September 2008 (25.09.2008)
VIII-2-1(iv)		an assignment from THE UNIVERSITY OF TOKYO to ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., dated 01 October 2008 (01.10.2008)
VIII-2-1(iv)		an assignment from TSUNODA, Takuya to ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., dated 07 June 2008 (07.06.2008)

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51 bis.1(a)(iii)) Name	in relation to this international application ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 61/197,106 by virtue of the following:
VIII-3-1(iv)		an assignment from NISHIMURA, Yasuharu to NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY, dated 22 September 2008 (22.09.2008)
VIII-3-1(iv)		an assignment from IMAI, Katsunori to NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY, dated 22 September 2008 (22.09.2008)
VIII-3-1(iv)		an assignment from NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY to ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., dated 01 October 2008 (01.10.2008)
VIII-3-1(iv)		an assignment from NAKAMURA, Yusuke to THE UNIVERSITY OF TOKYO, dated 25 September 2008 (25.09.2008)
VIII-3-1(iv)		an assignment from THE UNIVERSITY OF TOKYO to ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., dated 01 October 2008 (01.10.2008)
VIII-3-1(iv)		an assignment from TSUNODA, Takuya to ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., dated 07 June 2008 (07.06.2008)



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D' ALEMAN DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
ONCOTHERAPY SCIENCE, INC

REFERENCIA	Radicación No.	11 050897
	Solicitud internacional	PCT/JP2009/5382
	Fecha inicio fase nacional	22/05/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

109729

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

17 JUN. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11