

No. 12-173572- -00000-0000

Fecha: 2012-10-03 14:48:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 160

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: PÉPTIDOS ECT2 Y VACUNAS QUE LOS INCLUYEN

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL: C12N 15/09

71. SOLICITANTE: ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

DOMICILIO: Kanagawa, Japón.

74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.



No. 12-173572- -00000-0000

Fecha: 2012-10-03 14:48:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 160

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/JP2011/001909	Fecha 30 de Marzo de 2011
	Publicación Internacional No.	WO 2011/122022 A1	Fecha 06 de Octubre de 2011
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
	<u>PÉPTIDOS ECT2 Y VACUNAS QUE LOS INCLUYEN</u>		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C12N 15/09		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
	ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN: 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,		No. TELÉFONO:
	CIUDAD: Kanagawa 2130012,		CORREO ELECTRONICO:
	PAÍS DE RESIDENCIA: Japón		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Japón
7	INVENTOR (ES)		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	1. NAKAMURA,	Yusuke	Japonés
	2. TSUNODA,	Takuya	Japonés
	3. OHSAWA, Ryuji;	Ryuji	Japonés
	4. YOSHIMURA, Sachiko	Sachiko	Japonés
	5. WATANABE, Tomohisa;	Tomohisa	Japonés
	DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:		
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	DIRECCIÓN	CIUDAD	PAÍS RESIDENCIA
	1. c/o THE UNIVERSITY OF TOKYO, 3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku,	Tokyo 1138654,	Japón
	2. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,	Kanagawa 2130012,	Japón
	3. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,	Kanagawa 2130012,	Japón
	4. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,	Kanagawa 2130012,	Japón
	5. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,	Kanagawa 2130012,	Japón
	OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)		
	☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.		
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
	APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
	RODRIGUEZ D'ALEMAN	DILIA MARIA	C.C.41.654.882 T.P.20824 CSJ
	DIRECCIÓN	Cra. 11 No. 86 - 53, Piso 6	No. TELÉFONO 6181088
	CIUDAD	Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRONICO <u>notificaciones@clarkemodet.com.co</u>
	PAÍS	Colombia	
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA AAA/MM/DD
	Estados Unidos de América	US	61/320.577 2010/04/02

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 12-95612// 12-40-2831	Fecha 17/09/2012 13/40/2012
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 120		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 22		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante Declaraciones Regla 4.17.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 3		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

PÉPTIDOS ECT2 Y VACUNAS QUE LOS INCLUYEN

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el campo de las ciencias biológicas, más específicamente con el campo de la terapia anticancerosa. En particular, la presente invención se relaciona con novedosos péptidos que son extremadamente efectivos como vacunas anticancerosas, al igual que como drogas para el tratamiento y prevención de tumores.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se ha demostrado que los CTLs CD8-positivos reconocen a los péptidos epítipo derivados de los antígenos asociados a tumores (TAAs) hallados en la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y luego matan a las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia del antígeno del melanoma (MAGE) como el primer ejemplo de TAAs, se han descubierto muchos otros TAAs a través de procedimientos inmunológicos (NPL 1, Boon T, Int J Cancer, 8 de mayo de 1.993, 54(2): 177-80; NPL 2, Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1° de marzo de 1.996, 183(3): 725-9). Algunos de estos TAAs están actualmente en desarrollo clínico como objetivos inmunoterapéuticos.

20

Los TAAs favorables son indispensables para la proliferación y supervivencia de las células cancerosas. La utilización de estos TAAs como objetivos en la inmunoterapia puede minimizar el ampliamente descrito riesgo de escape inmunológico de las células cancerosas atribuible a la eliminación, mutación o regulación en

25

000002

descenso de los TAAs como resultado de la selección inmunológica terapéuticamente manejada. En conformidad, la identificación de nuevos TAAs capaces de inducir respuestas inmunológicas anti-tumorales potentes y específicas garantiza el desarrollo a futuro y está en proceso la investigación clínica de las estrategias de vacunación con péptidos en diversos tipos de cáncer (NPL 3, Harris CC, J Natl Cancer Inst, 16 de octubre de 1.996, 88(20): 1.442-55; NPL 4, Butterfield LH y colaboradores, Cancer Res, 1 de julio de 1.999, 59(13): 3.134-42; NPL 5, Vissers JL y colaboradores, Cancer Res noviembre 1 de 1.999, 59(21): 5.554-9; NPL 6, van der Burg SH y colaboradores, J Immunol, mayo 1 de 1.996, 156(9): 3.308-14; NPL 7, Tanaka F y colaboradores, Cancer Res octubre 15 de 1.997, 57(20): 4.465-8; NPL 8, Fujie T y colaboradores, Int J Cancer enero 18 de 1.999, 80(2): 169-72; NPL 9, Kikuchi M y colaboradores, Int J Cancer mayo 5 de 1.999, 81(3): 459-66; NPL 10, Oiso M y colaboradores, Int J Cancer mayo 5 de 1.999, 81(3): 387-94). A la fecha, se han documentado diversos experimentos clínicos que utilizan estos péptidos derivados de los antígenos asociados a tumores. Desafortunadamente, muchos de los actuales experimentos con vacunas anticancerosas han únicamente obtenido un índice de respuesta al objetivo (NPL 11, Belli F y colaboradores, J Clin Oncol octubre 15 de 2.002, 20(20): 4.169-80; NPL 12, Coulie PG y colaboradores, Immunol Rev octubre 2.002, 188: 33-42; NPL 13, Rosenberg SA y colaboradores, Nat Med septiembre 2.004, 10(9): 909-15). En conformidad, persiste la necesidad de disponer de nuevos TAAs como objetivos inmunoterapéuticos.

Se descubrió el oncogén de la secuencia 2 de transformación

000003

de la célula epitelial (ECT2) (Acceso al GenBank No. AY376439; por ejemplo, SEC ID No: 41) a partir de las transcripciones identificadas como reguladas en ascenso en el cáncer. El gen ECT2 está específicamente regulado en ascenso en las células

5 tumorales de diversos cánceres, lo que entre otros incluye el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la leucemia mieloide crónica (CML), el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), el linfoma, el cáncer pancreático,

10 el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC) y, por ende, presenta una interés particular en la presente invención. (PTL1, WO 2007/013671; PTL2, WO 2.008/102557; PTL3, WO 2.010/007791). En particular,

15 los péptidos inmunogénicos derivados de ECT2 pueden resultar de utilidad en la erradicación selectiva de las células tumorales que expresan a estos antígenos.

Lista de Citas

Literatura No Patentada

- 20 [NPL 1] Boon T, Int J Cancer mayo 8 de 1.993, 54(2): 177-80
- [NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med marzo 1 de 1.996, 183(3): 725-9
- [NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst octubre 16 de 1.996, 88(20): 1.442-55
- 25 [NPL 4] Butterfield LH y colaboradores, Cancer Res julio 1 de 1.999, 59(13): 3.134-42
- [NPL 5] Vissers JL y colaboradores, Cancer Res noviembre 1 de 1.999, 59(21): .5554-9

000004

[NPL 6] van der Burg SH y colaboradores, J Immunol mayo 1 de 1.996, 156(9): 3.308-14

[NPL 7] Tanaka F y colaboradores, Cancer Res octubre 15 de 1.997, 57(20): 4.465-8

5 [NPL 8] Fujie T y colaboradores, Int J Cancer enero 18 de 1.999, 80(2): 169-72

[NPL 9] Kikuchi M y colaboradores, Int J Cancer mayo 5 de 1.999, 81(3): 459-66

10 [NPL 10] Oiso M y colaboradores, Int J Cancer mayo 5 de 1.999, 81(3): 387-94

[NPL 11] Belli F y colaboradores, J Clin Oncol octubre 15 de 2.002, 20(20): 4.169-80

[NPL 12] Coulie PG y colaboradores, Immunol Rev octubre 2.002, 188: 33-42

15 [NPL 13] Rosenberg SA y colaboradores, Nat Med septiembre 2.004, 10(9): 909-15

Literatura Patentada

[PTL1] WO 2007/013671

20 [PTL2] WO 2.008/102557

[PTL3] WO 2.010/007791

SUMARIO DE LA INVENCION

25 La presente invención, al menos en parte, se basa en el descubrimiento de los objetivos adecuados de la inmunoterapia. Por cuanto los TAAs son por lo general percibidos por el sistema inmunológico como "propios" y en consecuencia con frecuencia no poseen inmunogenicidad, el descubrimiento de objetivos apropiados

000005

resulta de extrema importancia. El reconociendo que la ECT2 (SEC ID NO: 42 codificada por el gen con Acceso al GenBank No. AY376439 (por ejemplo, SEC ID NO: 41)) ha sido identificada como regulada de forma ascendente en los cánceres, algunos ejemplos de los cuales entre otros incluyen el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC, la presente invención se enfoca en ECT2 como un candidato dirigido a la inmunoterapia del cáncer/tumoral, más particularmente en los novedosos péptidos epítipo de ECT2 que pueden servir como objetivos inmunoterapéuticos adecuados.

A tales fines, la presente invención está, al menos en parte, dirigida a la identificación de péptidos epítipo específicos entre los productos genéticos de ECT2 que poseen la capacidad de inducir a CTLs específicos para ECT2. Conforme se explica en detalle más adelante, se estimularon las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) obtenidas a partir de un donante sano utilizando los péptidos candidatos que se acoplan a HLA-A*0201 derivados de ECT2. Luego se establecieron líneas de CTLs con una citotoxicidad específica contra las células objetivo HLA-A2-positivas cargadas con cada uno de los péptidos candidatos. Los resultados obtenidos demuestran que estos péptidos son péptidos epítipo HLA-A2 restringidos que pueden inducir respuestas inmunológicas potentes y específicas contra las células que expresan a ECT2. Estos resultados además demuestran que la ECT2 es altamente inmunogénica y que sus epítopos constituyen objetivos efectivos en la inmunoterapia del

000006

cáncer/tumoral.

En conformidad, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar péptidos aislados que se acoplen al antígeno HLA, lo que incluye ECT2 (SEC ID NO: 42) y sus
5 fragmentos inmunológicamente activos. Se prevé que estos péptidos induzcan a los CTLs y que, por ende, puedan ser utilizados para inducir a los CTLs ex vivo o administrados a un sujeto para inducir respuestas inmunológicas contra los cánceres, algunos ejemplos de los cuales entre otros incluyen el cáncer
10 vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC. Los péptidos que se prefiere utilizar son nonapéptidos y decapeptidos, idealmente,
15 nonapéptidos y decapeptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de las SEC ID NO: 1 a 40. Los péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de las SEC ID NO: 1, 3 y 21 demostraron tener una fuerte inducción de los CTLs y, por ende, resultan particularmente preferentes.

20 La presente invención igualmente contempla péptidos modificados con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de las SEC ID NO: 1 a 40, en los cuales dos o más aminoácidos son sustituidos, insertados, eliminados o añadidos, siempre que los péptidos modificados conserven la necesaria
25 capacidad de inducción de los CTLs del péptido original.

La presente invención adicionalmente abarca polinucleótidos aislados que codifican a cualquiera de los péptidos de la presente invención. Se puede utilizar estos polinucleótidos para

000007

inducir o preparar APCs con capacidad de inducir a los CTLs o, al igual que los péptidos de la presente invención descritos con anterioridad, los mismos pueden ser administrados a un sujeto para inducir respuestas inmunológicas contra los cánceres.

5 Cuando son administrados a un sujeto, los presentes péptidos se ubican sobre la superficie de las APCs de forma tal de inducir a los CTLs dirigidos a los respectivos péptidos. En consecuencia, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar agentes, composiciones y/o sustancias que incluyan o
10 incorporen cualquiera de los péptidos o polinucleótidos de la presente invención para la inducción de los CTLs. Se puede utilizar estos agentes, composiciones y sustancias en el tratamiento y/o profilaxis y/o la recurrencia post-operatoria de los cánceres, en especial el cáncer vesical, el cáncer de mama,
15 el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC. En consecuencia, inclusive otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar agentes, composiciones y/o
20 sustancias farmacéuticas para el tratamiento y/o profilaxis y/o la recurrencia post-operatoria del cáncer, que incluyan o incorporen uno o más péptidos o polinucleótidos de la presente invención. En lugar o además de los presentes péptidos o polinucleótidos, los agentes, composiciones y sustancias
25 farmacéuticas de la presente invención pueden incluir como ingredientes activos APCs o exosomas que incluyan cualquiera de los presentes péptidos.

Se puede utilizar los péptidos o polinucleótidos de la

000008

presente invención en la inducción de las APCs que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y uno de los presentes péptidos, por ejemplo, por medio de la puesta en contacto de las APCs derivadas de un sujeto con el péptido o de la introducción de un polinucleótido que codifique a un péptido de la presente invención en APCs. Estas APCs logran una alta inducción de los CTLs contra los péptidos objetivos y encuentran utilidad en la inmunoterapia del cáncer. En conformidad, la presente invención abarca los métodos para inducir las APCs con capacidad de inducción de los CTLs, al igual que las APCs obtenidas de conformidad con estos métodos.

Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un método para la inducción de los CTLs, métodos éstos que incluyen el paso de cultivo simultáneo de células CD8-positivas con APCs o exosomas que presentan al péptido de la presente invención sobre su superficie o el paso de introducción de un gen que incluye un polinucleótido que codifica a un polipéptido de la subunidad de los receptores de células T (TCR) que se acopla al presente péptido. Los CTLs obtenidos de conformidad con estos métodos encuentran utilidad en el tratamiento y/o prevención de los cánceres, algunos ejemplos de los cuales entre otros incluyen el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC. En consecuencia, inclusive otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar los CTLs obtenidos de conformidad con los presentes métodos.

000009

Inclusive otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar métodos para la inducción de una respuesta inmunológica contra el cáncer en un sujeto que así lo requiere, métodos éstos que incluyen el paso de administración de composiciones o sustancias que incluyan los polipéptidos ECT2 o sus fragmentos inmunológicamente activos, polinucleótidos que codifiquen a los polipéptidos ECT2, exosomas o APCs que presenten los polipéptidos ECT2.

La aplicabilidad de la presente invención se extiende a cualquiera de diversas enfermedades relacionadas con o que se derivan de una sobre expresión de ECT2 tales como el cáncer, algunos ejemplos de los cuales entre otros incluyen el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC.

Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] Un péptido aislado con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 42 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, donde dicho péptido se acopla a un antígeno HLA e induce a los linfocitos T citotóxicos (CTLs),

[2] El péptido aislado de [1], donde el antígeno HLA es HLA-A2,

[3] El péptido aislado de [1] ó [2], donde dicho péptido incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEC ID NO: 1 a 40,

[4] Un péptido aislado seleccionado a partir del grupo

000010

constituido por:

(a) un péptido aislado que se acopla a un antígeno HLA e induce a los linfocitos T citotóxicos (CTLs) y que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 42 o un fragmento
5 inmunológicamente activo del mismo,

(b) el péptido aislado de (a), donde el antígeno HLA es HLA-A2,

(c) el péptido aislado de (a) o (b), el cual incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo
10 constituido por las SEC ID NO: 1 a 40, y

(d) el péptido aislado de (a) o (b) con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEC ID NO: 1 a 40, donde 1, 2 o diversos aminoácido son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos, siempre que dicho
15 péptido modificado conserve la capacidad de inducción de los CTLs del péptido original,

[5] El péptido aislado de [4] con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEC ID NO: 1 a 40, donde el péptido tiene una o ambas de las
20 siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N es seleccionado a partir del grupo constituido por leucina o metionina; y

(b) el aminoácido C-terminal es seleccionado a partir del grupo constituido por valina o leucina,

25 [6] El péptido aislado de cualquiera de [1] a [5], donde dicho péptido es un nonapéptido o decapeptido,

[7] Un polinucleótido aislado que codifica al péptido de cualquiera de [1] a [6],

000011

[8] Una composición para la inducción de los CTLs, donde la composición incluye uno o más péptidos de cualquiera de [1] a [6] o uno o más de los polinucleótidos de [7],

5 [9] Una composición farmacéutica para el tratamiento y/o profilaxis y/o prevención de la recurrencia post-operatoria del cáncer, composición ésta que incluye uno o más péptidos de cualquiera de [1] a [6] o uno o más polinucleótidos de [7],

[10] La composición farmacéutica de [9], composición ésta que es formulada para ser administrada a un sujeto cuyo antígeno
10 HLA es HLA-A2,

[11] La composición farmacéutica de [9] ó [10], composición ésta que es formulada para el tratamiento del cáncer,

[12] Un método para la inducción de una célula presentadora de antígenos (APC) con capacidad de inducción de los CTLs que
15 incluye un paso seleccionado a partir del grupo constituido por:

(a) la puesta en contacto de una APC con un péptido de cualquiera de [1] a [6] *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, y

(b) la introducción de un polinucleótido que codifica al péptido de cualquiera de [1] a [6] en una APC,

20 [13] Un método para la inducción de los CTLs de conformidad con un método que incluye un paso seleccionado a partir del grupo constituido por:

(a) el cultivo simultáneo de células T CD8-positivas con las APCs que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno
25 HLA y el péptido de cualquiera de [1] a [6];

(b) el cultivo simultáneo de células T CD8-positivas con exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de cualquiera de [1] a [6]; y

000012

(c) la introducción de un gen que incluye un polinucleótido que codifica a un polipéptido de la subunidad de los receptores de células T (TCR) acoplado a un péptido de cualquiera de [1] a [6] en una célula T,

5 [14] Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de cualquiera de [1] a [6],

 [15] La APC de [14], la cual es inducida de conformidad con el método de [12],

10 [16] Un CTL aislado dirigido a cualquiera de los péptidos de [1] al [6],

 [17] Un CTL de [16], el cual es inducido de conformidad con el método de [13],

 [18] Un método para la inducción de una respuesta
15 inmunológica contra el cáncer en un sujeto que así lo requiere, método éste que incluye el paso que consiste en administrarle al sujeto una composición que incluye un péptido de [1] a [6], un fragmento inmunológicamente activo del mismo o un polinucleótido que codifica al péptido o fragmento,

20 [19] Un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo contra cualquiera de los péptidos de [1] a [6],

 [20] Un vector que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica a cualquiera de los péptidos de [1] a [6],

 [21] Un equipo de diagnóstico que incluye cualquiera de los
25 péptidos de [1] a [6], el nucleótido de [7] o el anticuerpo de [19].

Se entenderá que tanto el resumen que antecede de la presente invención como la siguiente descripción detallada se

000013

refieren a las aplicaciones ilustrativas y no limitan la presente invención u otras aplicaciones alternativas de la misma.

Adicionalmente, otros objetivos y características de la invención resultarán más evidentes al dar lectura a la siguiente descripción detallada, en conjunto con las figuras y ejemplos adjuntos. Sin embargo, se entenderá que tanto el resumen que antecede de la invención como la siguiente descripción detallada se refieren a las aplicaciones ilustrativas y no limitan la invención u otras aplicaciones alternativas de la misma. En particular, aun cuando se describe la invención haciendo referencia a un número de aplicaciones específicas, se apreciará que la descripción es ilustrativa de la invención y no ha de ser interpretada como limitante de la invención. Pueden ocurrírsele diversas modificaciones y aplicaciones a aquellos con experiencia en este arte, sin alejarse del espíritu y alcance de la invención descrita en las reivindicaciones adjuntas. De igual forma, otros objetivos, características, beneficios y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de este resumen y de ciertas aplicaciones descritas más adelante y los mismos resultarán evidentes para aquellos con experiencia en este arte. Estos objetivos, características, beneficios y ventajas resultarán evidentes a partir del texto que antecede, en conjunto con los ejemplos, datos y figuras adjuntos y toda deducción razonable que pueda surgir del mismo, sola o tomando en consideración las referencias aquí incorporadas.

000014

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Diversos aspectos y aplicaciones de la presente invención resultarán evidentes para aquellos con experiencia en este arte luego de considerar la breve descripción de las figuras y la siguiente descripción detallada de la presente invención y sus aplicaciones preferentes.

La **Figura 1** está constituida por una serie de fotografías, (a) a (c), que ilustran los resultados de los experimentos ELISPOT con IFN-gamma sobre los CTLs que fueron inducidos con péptidos derivados de ECT2. Los CTLs del compartimiento número #6 estimulados con ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1) (a), del compartimiento número #5 estimulados con ECT2-A02-9-664 (SEC ID NO: 3) (b) y del compartimiento número #1 estimulados con ECT2-A02-10-33 (SEC ID NO: 21) (c) demostraron tener una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. El recuadro en el compartimiento de estas fotografías indica que se expandieron las células del correspondiente compartimiento a los fines de establecer líneas de CTLs. En las figuras, el signo "+" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo cargadas con el péptido apropiado y el signo "-" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo no cargadas con ninguno de los péptidos.

La **Figura 2** está constituida por una series de gráficos de líneas, (a) a (c), que ilustran los resultados de un experimento ELISA con IFN-gamma que demuestra la producción de IFN-gamma de las líneas de CTLs estimuladas con (a) ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1), (b) ECT2-A02-9-664 (SEC ID NO: 3) y (c) ECT2-A02-10-33 (SEC

000015

ID NO: 21). Los resultados de las líneas de CTLs establecidas por estimulación con cada péptido demuestran una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En las figuras, el signo "+" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo cargadas con el péptido apropiado y el signo "-" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo no cargadas con ninguno de los péptidos.

La **Figura 3** describe un par de gráficos de líneas, (a) y (b), que ilustran la producción de IFN-gamma de los clones de CTL establecidos por medio de la limitación de la dilución de las líneas de CTL estimuladas con (a) ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1) y (b) ECT2-A02-9-664 (SEC ID NO: 3). Los resultados de los clones de CTL establecidos por estimulación con cada péptido demuestran una potente producción de IFN-gamma en comparación con el control. En la figura, el signo "+" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo cargadas con el péptido apropiado y el signo "-" indica la producción de IFN-gamma contra las células objetivo no cargadas con ninguna de los péptidos.

La **Figura 4** ilustra un par de gráficos de líneas, (a) y (b), que ilustran la actividad específica de los CTLs contra las células objetivo que exógenamente expresan a ECT2 y HLA-A*0201. Se prepararon células COS7 transfectadas con HLA-A*0201 o la longitud total del gen ECT2 como control. El clon de CTL establecido con ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1) (a) y la línea de CTLs establecida con ECT2-A02-10-33 (SEC ID NO: 21) (b) demostró tener actividad CTL específica contra las células COS7 transfectadas tanto con ECT2 como con HLA-A*0201 (círculo de color negro). Por otro parte, no se detectó actividad CTL

000016

específica significativa contra las células objetivo que expresan a ya sea HLA-A*0201 (triángulo) o ECT2 (círculo blanco).

Descripción de las Aplicaciones

5 Aunque en la práctica o evaluación de las aplicaciones de la presente invención se puede utilizar cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, a continuación se describen los materiales, métodos y dispositivos que se prefiere utilizar. Sin embargo, antes de describir los
10 presentes materiales y métodos, se entenderá que estas descripciones son mera y únicamente ilustrativas y que no se prevé sean limitantes. Igualmente se entenderá que la presente invención no se limita a los tamaños, formas, dimensiones, materiales, metodologías, protocolos, etc. particularmente
15 descritos en el presente documento, por cuanto estos pueden variar de acuerdo con la experimentación de rutina y/o la optimización. Adicionalmente, la terminología utilizada en la descripción tiene como propósito describir las versiones o aplicaciones particulares únicamente y no se prevé que limite el
20 alcance de la presente invención, el cual se verá únicamente limitado por las reivindicaciones adjuntas.

La descripción de cada publicación, patente o solicitud de patente citada en la presente especificación está específicamente incorporada a título de referencia en su totalidad. Sin embargo,
25 nada de lo aquí contenido deberá ser interpretado como una admisión que la invención pueda preceder en tiempo a esta revelación por virtud o invención previa.

A no ser que se defina algo diferente, todos los términos

000017

técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado del entendimiento común de aquellos con experiencia en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones. Adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos tienen propósitos únicamente ilustrativos y no se prevé que sean limitantes.

I. Definiciones

A no ser que específicamente se indique algo diferente, las palabras "un", "una", y "el/la" utilizadas en el presente documento significan "al menos uno".

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" son utilizados de forma intercambiable para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Estos términos aplican a los polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos pueden ser residuos modificados o residuos de aparición no natural tales como miméticos químicos artificiales de los correspondientes aminoácidos de aparición natural, al igual que a los polímeros de aminoácidos de aparición natural.

El término "oligopéptido" utilizado en ocasiones en la presente especificación es utilizado para referirse a los péptidos de la presente invención que tienen una longitud de 20 residuos o menos, típicamente 15 residuos o menos y que están típicamente constituidos por entre aproximadamente 8 y cerca de 11 residuos, con frecuencia 9 ó 10 residuos.

El término "aminoácido" como utilizado en el presente documento se refiere a los aminoácidos de aparición natural y sintéticos, al igual que a los análogos de los aminoácidos y a

000318

los miméticos de los aminoácidos que funcionan de forma similar a la de los aminoácidos de aparición natural. Los aminoácidos pueden ser ya sea aminoácidos L o aminoácidos D. Los aminoácidos de aparición natural son aquellos codificados por el código genético, al igual que aquellos modificados después de la translación en células (por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina). La frase "análogo de los aminoácidos" se refiere a los compuestos que tienen la misma estructura química básica (un carbono alfa unido a un hidrógeno, un grupo carboxi, un grupo amino y un grupo R) de un aminoácido de aparición natural pero que tienen uno o más grupos R modificados o estructuras centrales modificadas (por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metionina metil sulfonio). La frase "mimético de los aminoácido" se refiere a los compuestos químicos que tienen estructuras diferentes pero un funcionamiento similar al de los aminoácidos en en general.

Los aminoácidos pueden ser aquí denominados por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

Los términos "gen", "polinucleótidos", "nucleótidos" y "ácidos nucleicos" son utilizados de forma intercambiable y, a no ser que específicamente se indique algo diferente, son, al igual que los aminoácidos, denominados por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Los términos "agente", "sustancia" y "composición" son utilizados de forma intercambiable para referirse a un producto que incluye los ingredientes especificados en las cantidades

000019

especificadas, al igual que cualquier producto que sea el resultado directo o indirecto de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas. Se prevé que estos términos, cuando son utilizados en relación con el calificativo "farmacéutico" (por ejemplo, "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica") abarquen un producto que incluye el o los ingredientes activos, y cualquier ingrediente inerte que constituya el transportador, al igual que cualquier producto que sea el resultado directo o indirecto de la combinación, complexación o adición de cualesquiera dos o más de los ingredientes o de la disociación de uno o más de los ingredientes o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. En conformidad, en el contexto de la presente invención, los términos "agente farmacéutico" y "composición farmacéutica" se refieren a cualquier producto producido por medio de la combinación de una molécula o compuesto de la presente invención y un transportador farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

La frase "transportador farmacéuticamente aceptable" o "transportador fisiológicamente aceptable" utilizado en el presente documento significa un material, composición, sustancia o vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable, lo que entre otros incluye un material de relleno líquido o sólido, un diluyente, un excipiente, un solvente o un material encapsulante, involucrado en el transporte de los agentes polifarmacofóricos entramados en cuestión de un órgano o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo.

Los agentes o composiciones farmacéuticas de la presente

000020

invención encuentran un uso particular como vacunas. En el contexto de la presente invención, la frase "vacuna" (igualmente denominada una "composición inmunogénica") se refiere a una sustancia que tiene la función de inducir inmunidad anti-tumoral luego de su inoculación en animales.

El término "ingrediente activo" aquí utilizado se refiere a una sustancia presente en un agente o composición que es biológica o fisiológicamente activa. En particular, en el contexto de un agente o composición farmacéutica, el término "ingrediente activo" se refiere a una sustancia que tiene un efecto farmacológico objetivo. Por ejemplo, en el caso de los agentes o composiciones farmacéuticas a ser utilizados en el tratamiento o prevención del cáncer, los ingredientes activos presentes en los agentes o composiciones pueden conllevar a al menos una acción biológica o fisiológica sobre las células cancerosas y/o los tejidos directamente o indirectamente. Preferiblemente, esta acción puede incluir la reducción o inhibición del crecimiento de células cancerosas, el daño o muerte de las células cancerosas y/o tejidos y similares. Típicamente, el efecto indirecto que tienen los ingredientes activos es la inducción de los CTLs para que reconozcan o maten a las células cancerosas. Antes de ser formulado, el "ingrediente activo" puede ser igualmente denominado "crudo", "sustancia farmacológica" o "producto técnico".

A no ser que se defina algo diferente, el término "cáncer" se refiere a los cánceres que expresan el gen ECT2, algunos ejemplos de los cuales entre otros incluyen el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular,

000021

la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC.

A no ser que se defina algo diferente, los términos
 5 "linfocito T citotóxico", "célula T citotóxica" y "CTL" son utilizados de forma intercambiable y, a no ser que específicamente se indique algo diferente, se refieren a un subgrupo de los linfocitos T que están en la capacidad de reconocer a las células extrañas (por ejemplo, las células
 10 tumorales/cancerosas, las células infectadas con virus) y de inducir la muerte de estas células.

A no ser que se defina algo diferente, el término "HLA-A2" utilizado en el presente documento se refiere de forma representativa a los subtipos, algunos ejemplos de los cuales
 15 entre otros incluyen HLA-A*0201, HLA-A*0202 HLA-A*0203. HLA-A*0204. HLA-A*0205. HLA-A*0206. HLA-A*0207. HLA-A*0210. HLA-A*0211, HLA-A*0213? HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219. HLA-A*0228 y HLA-A*0250.

A no ser que se defina algo diferente, se utiliza el término
 20 "equipo" en relación con una combinación de reactivos y otros materiales. Se prevé que el equipo pueda incluir un micro arreglo, un chip, un marcador, y similares. No se prevé que el término "equipo" se vea limitado a una combinación en particular de reactivos y/o materiales.

25 Conforme es utilizada en el contexto de un sujeto o paciente, la frase "HLA-A2 positivo" se refiere a que el sujeto o paciente homocigóticamente o heterocigóticamente posee el gen del antígeno HLA-A2 y que el antígeno HLA-A2 se expresa en las

células del sujeto o paciente en la forma de un antígeno HLA.

En la medida en la cual los métodos y composiciones de la presente invención encuentran utilidad en el contexto del "tratamiento" del cáncer, se estima que un tratamiento es 5 "eficaz" si conlleva a un beneficio clínico tal como la reducción de la expresión del gen ECT2 o una disminución en el tamaño, la predominio o el potencial metastásico del cáncer en el sujeto. Cuando se aplica el tratamiento profilácticamente, el término "eficaz" significa que el mismo retarda o impide la formación de 10 cánceres o previene o mejora un síntoma clínico del cáncer. La eficacia es determinada en asociación con cualquier método conocido para el diagnóstico o tratamiento del tipo particular de tumor.

En la medida en la cual los métodos y composiciones de la 15 presente invención encuentran utilidad en el contexto de la "prevención" y "profilaxis" del cáncer, estos términos son utilizados de forma intercambiable para referirse a cualquier actividad que reduzca la carga de mortalidad o morbilidad de la enfermedad. La prevención y profilaxis puede ocurrir "a los 20 niveles primarios, secundarios y terciarios de prevención". Aun cuando la prevención y profilaxis primaria evitan el desarrollo de una enfermedad, los niveles secundario y terciario de prevención y profilaxis abarcan las actividades dirigidas a la prevención y profilaxis del avance de una enfermedad y la 25 presencia de síntomas, al igual que la reducción del impacto negativo que tiene una enfermedad ya establecida por medio de la restauración de la funcionalidad y de la reducción de las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Alternativamente,

000023

la prevención y profilaxis pueden incluir un rango amplio de terapias profilácticas dirigidas al alivio de la severidad del trastorno en particular, por ejemplo, a la reducción de la proliferación y de la metástasis de los tumores.

5 En el contexto de la presente invención, el tratamiento y/o profilaxis del cáncer y/o la prevención de la recurrencia post-operatoria del mismo incluyen cualquiera de los siguientes pasos, por ejemplo, la remoción quirúrgica de las células cancerosas, la inhibición del crecimiento de las células cancerosas, la
10 involución o regresión de un tumor, la inducción de la remisión y supresión de la aparición del cáncer, la regresión del tumor y la reducción o inhibición de la metástasis. El tratamiento y/o profilaxis efectiva del cáncer disminuye la mortalidad y mejora el pronóstico de los individuos con cáncer, disminuye los niveles
15 de los marcadores tumorales en la sangre y mejora los síntomas detectables que acompañan al cáncer. Por ejemplo, la reducción o mejora de los síntomas constituye un tratamiento eficaz y/o la profilaxis incluye 10%, 20%, 30% o más de reducción o una enfermedad estable.

20 En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere a las inmunoglobulinas y sus fragmentos que son específicamente reactivos a una determinada proteína o un péptido de la misma. Un anticuerpo puede incluir los anticuerpos humanos, los anticuerpos primatizados, los anticuerpos
25 quiméricos, los anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos fundidos con otras proteínas o radiomarcadores y los fragmentos de anticuerpos. Adicionalmente, se utiliza el término anticuerpo en su más amplio sentido y el

000024

mismo específicamente abarca los anticuerpos monoclonales intactos, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y los
5 fragmentos de anticuerpos, siempre que estos dispongan de la actividad biológica deseada. Un "anticuerpo" indica todas las clases (por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).

A no ser que se defina algo diferente, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen
10 el mismo significado comúnmente del conocimiento de aquellos con experiencia en el arte al que pertenece la presente invención.

II. Péptidos

Para demostrar que los péptidos derivados de ECT2 funcionan
15 como un antígeno reconocido por los CTLs, se analizaron péptidos derivados de ECT2 (SEC ID NO: 42) para determinar si eran los epítomos antigénicos restringidos por HLA-A2, los cuales son comúnmente hallados en los alelos de HLA (Date Y y colaboradores, Antígenos Tisulares 47: 93-101, 1.996; Kondo A y colaboradores, J
20 Immunol 155: 4307-12, 1.995; Kubo RT y colaboradores, J Immunol 152: 3.913-24, 1.994).

Los candidatos de péptidos derivados de ECT2 acoplados a HLA-A2 fueron identificados basándose en sus afinidades de acoplamiento hacia HLA-A2. Se identificaron los siguientes
25 péptidos candidatos:

ECT2-A2-9-34 (SEC ID NO: 1),

ECT2-A2-9-619 (SEC ID NO: 2),

ECT2-A2-9-664 (SEC ID NO: 3),

000025

ECT2-A2-9-662 (SEC ID NO: 4),
ECT2-A2-9-634 (SEC ID NO: 5),
ECT2-A2-9-145 (SEC ID NO: 6),
ECT2-A2-9-561 (SEC ID NO: 7),
5 ECT2-A2-9-98 (SEC ID NO: 8),
ECT2-A2-9-575 (SEC ID NO: 9),
ECT2-A2-9-240 (SEC ID NO: 10),
ECT2-A2-9-292 (SEC ID NO: 11),
ECT2-A2-9-823 (SEC ID NO: 12),
10 ECT2-A2-9-220 (SEC ID NO: 13),
ECT2-A2-9-755 (SEC ID NO: 14),
ECT2-A2-9-357 (SEC ID NO: 15),
ECT2-A2-9-438 (SEC ID NO: 16),
ECT2-A2-9-874 (SEC ID NO: 17),
15 ECT2-A2-9-568 (SEC ID NO: 18),
ECT2-A2-9-166 (SEC ID NO: 19),
ECT2-A2-9-443 (SEC ID NO: 20),
ECT2-A2-10-33 (SEC ID NO: 21),
ECT2-A2-10-633 (SEC ID NO: 22),
20 ECT2-A2-10-144 (SEC ID NO: 23),
ECT2-A2-10-701 (SEC ID NO: 24),
ECT2-A2-10-754 (SEC ID NO: 25),
ECT2-A2-10-557 (SEC ID NO: 26),
ECT2-A2-10-191 (SEC ID NO: 27),
25 ECT2-A2-10-774 (SEC ID NO: 28),
ECT2-A2-10-428 (SEC ID NO: 29),
ECT2-A2-10-618 (SEC ID NO: 30),
ECT2-A2-10-97 (SEC ID NO: 31),

000026

ECT2-A2-10-20 (SEC ID NO: 32),
ECT2-A2-10-574 (SEC ID NO: 33)
ECT2-A2-10-461 (SEC ID NO: 34),
ECT2-A2-10-664 (SEC ID NO: 35),
5 ECT2-A2-10-575 (SEC ID NO: 36),
ECT2-A2-10-430 (SEC ID NO: 37),
ECT2-A2-10-511 (SEC ID NO: 38),
ECT2-A2-10-471 (SEC ID NO: 39) y
ECT2-A2-10-87 (SEC ID NO: 40).

10 Además, luego de la estimulación *in vitro* de las células T
con células dendríticas (DCs) pulsadas (cargadas) con estos
péptidos, se establecieron exitosamente CTLs por medio de la
estimulación de las DCs con cada uno de los siguientes péptidos:

ECT2-A2-9-34 (SEC ID NO: 1),
15 ECT2-A2-9-664 (SEC ID NO: 3) y
ECT2-A2-10-33 (SEC ID NO: 21).

Estos CTLs establecidos demostraron tener una potente
actividad CTL específica contra las células objetivo pulsadas con
los respectivos péptidos. Estos resultados demuestran que ECT2
20 es un antígeno reconocido por los CTLs y que los péptidos
evaluados son péptidos epítipo de ECT2 restringidos por HLA-A2.

Dado que el gen ECT2 se encuentra sobre expresado en las
células cancerosas tales como las del cáncer vesical, el cáncer
de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la
25 CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el
linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el
carcinoma renal y el SCLC y no se expresa en la mayoría de los
órganos normales, el mismo constituye un objetivo adecuado de la

000027

inmunoterapia del cáncer. En consecuencia, la presente invención proporciona nonapéptidos (péptidos constituidos por nueve residuos de aminoácidos) y decapeptidos (péptidos constituidos por diez residuos de aminoácidos) de epítopos reconocidos por los CTLs de ECT2. Alternativamente, la presente invención proporciona péptidos aislados que se acoplan a los antígenos HLA e inducen a los linfocitos T citotóxicos (CTLs), donde el péptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 42 o es un fragmento inmunológicamente activo del mismo. Más específicamente, en algunas aplicaciones, la presente invención proporciona péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de las SEC ID NO: 1 a 40.

Generalmente, se puede utilizar los programas de software actualmente disponibles, por ejemplo, en la Internet, tales como aquellos descritos en Parker KC y colaboradores, J Immunol enero 1 1.994, 152(1): 163-75 y en Nielsen M y colaboradores, Protein Sci 2.003; 12: 1.007-17, para calcular las afinidades de enlace entre diversos péptidos y los antígenos HLA *in silico*. Se puede medir la afinidad de enlace con los antígenos HLA conforme se describe en, por ejemplo, Parker KC y colaboradores, J Immunol enero 1 de 1.994, 152(1): 163-75, Kuzushima K y colaboradores, Sangre 2.001, 98(6): 1.872-81, Larsen MV y colaboradores. BMC Bioinformatics. Oct. 31 de 2.007; 8: 424, Buus S y colaboradores. Antígenos Tisulares, 62:378-84, 2.003, Nielsen M y colaboradores, Protein Sci 2.003; 12: 1.007-17, y Nielsen M y colaboradores. PLoS ONE 2007; 2: e796, los cuales se encuentran resumidos en, por ejemplo, Lafuente EM y colaboradores, Diseño Farmacéutico de Actualidad, 2.009, 15, 3.209-3.220. Los métodos para la

000028

determinación de la afinidad de enlace se encuentran descritos en, por ejemplo, **Journal of Immunological Methods** (1.995, 185: 181-190) y Protein Science (2.000, 9: 1838-1846). En consecuencia, se pueden utilizar estos programas de software para
5 seleccionar aquellos fragmentos derivados de ECT2 que tienen una alta afinidad de enlace con los antígenos HLA. En conformidad, la presente invención abarca los péptidos constituidos por fragmentos derivados de ECT2 que se determine se acoplen a los antígenos HLA de conformidad con estos programas conocidos.
10 Adicionalmente, estos péptidos pueden incluir el péptido compuesto por la longitud total de ECT2.

Los péptidos de la presente invención, particularmente los nonapéptidos y los decapeptidos de la presente invención, pueden ser flanqueados con residuos de aminoácidos adicionales siempre
15 que los péptidos retengan su inducción de los CTL. Los residuos particulares de aminoácidos adicionales pueden estar compuestos de cualquier tipo de aminoácidos, siempre que estos no impidan la inducción de los CTL del péptido original. Por ende, la presente invención abarca péptidos que presentan una afinidad de
20 acoplamiento por los antígenos HLA, incluyendo los péptidos derivados de ECT2. Estos péptidos son, por ejemplo, menores de cerca de 40 aminoácidos, con frecuencia menores de cerca de 20 aminoácidos, usualmente menores de cerca de 15 aminoácidos.

Generalmente, se sabe que las modificaciones de uno o más
25 aminoácidos en un péptido no afectan la función del péptido o, en algunos casos, inclusive mejoran la función deseada de la proteína original. De hecho, se sabe que los péptidos modificados (es decir, los compuestos peptídicos de una secuencia

000029

de aminoácidos modificados por medio de la sustitución
 eliminación, inserción y/o adición de uno, dos o varios residuos
 de aminoácidos a una secuencia de referencia original) retienen
 la actividad biológica del péptido original (Mark y
 5 colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 1.984, 81: 5662-6; Zoller y
 Smith, Nucleic Acids Res 1.982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland
 y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 1.982, 79: 6409-13). Por
 ende, de acuerdo con una aplicación de la presente invención, el
 péptido que presenta inducción de los CTL de la presente
 10 invención, puede estar compuesto de un péptido que presenta una
 secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEC ID NO: 1 a
 40, donde uno, dos o inclusive más aminoácidos son añadidos,
 insertados, eliminados y/o sustituidos.

Los expertos en el arte reconocerán que individual las
 15 eliminaciones, inserciones y/o sustituciones adiciones a una
 secuencia de aminoácidos que alteren un aminoácido individual o
 un pequeño porcentaje de aminoácidos resulta en la conservación
 de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original;
 por lo cual es denominada como "sustitución conservativa" o
 20 "modificación conservativa", donde la alteración de una proteína
 resulta en una proteína con un funcionamiento similar. Las
 tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos
 funcionalmente similares son bien conocidos en el arte. Ejemplos
 de propiedades de cadenas laterales de aminoácidos son
 25 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 presentan los siguientes grupos funcionales o
 características en común: una cadena lateral alifática (G, A, V,

000030

L, I, P); un grupo hidroxilo que contenga una cadena lateral (S, T, Y); un átomo de azufre que contenga una cadena lateral (C, M); un ácido carboxílico y una amida que contenga una cadena lateral (D, N, E, Q); una base que contenga una cadena lateral (R, K, H);
 5 y un grupo aromático que contenga una cadena lateral (H, F, Y, W). Adicionalmente, los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

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

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

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

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

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

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

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

15 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins 1.984).

Estos péptidos modificados de forma conservadora son igualmente considerados péptidos de la presente invención. Sin embargo, el péptido de la presente invención no se ve limitado en
 20 este sentido y puede incluir modificaciones no conservadoras, siempre que el péptido modificado resultante retenga la inducción requerida de los CTL del péptido original. Adicionalmente, los péptidos modificados no deberían excluir los péptidos inducibles CTL de variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos
 25 de ECT2.

Se puede insertar, sustituir o añadir residuos de aminoácidos a los péptidos de la presente invención o, alternativamente, se les puede eliminar residuos de aminoácidos

000031

con el objeto de lograr una mayor afinidad de acoplamiento. Para conservar la necesario capacidad de inducción de los CTLs, preferiblemente se modifica (inserta, elimina, agrega y/o sustituye) únicamente un número reducido (por ejemplo, 1, 2 o 5 varios) o un porcentaje reducido de aminoácidos. En el presente documento, el término "varios" significa 5 o menos aminoácidos, por ejemplo, 4 ó 3 o menos. El porcentaje de aminoácidos a ser modificados puede ser, por ejemplo, 20% o menos, preferiblemente 15% o menos, idealmente 10% o menos aún idealmente 1 a 5%.

10 Cuando se utiliza en el contexto de la inmunoterapia del cáncer, los presentes péptidos pueden estar presentes sobre la superficie de una célula o exosoma en la forma de un complejo con un antígeno HLA. En consecuencia, se prefiere seleccionar péptidos que no sólo induzcan a los CTLs, sino que también posean 15 una alta afinidad de acoplamiento hacia el antígeno HLA. A tales fines, los péptidos pueden ser modificados por medio de la eliminación, sustitución, inserción, y/o agregando los residuos de aminoácidos para conseguir un péptido modificado que presente una afinidad de acoplamiento mejorada. Además de los péptidos 20 que son naturalmente desplegados, por cuanto se está en conocimiento de la regularidad de las secuencias de péptidos desplegadas por medio de su acoplamiento con antígenos HLA (J Immunol 1.994, 152: 3913; Immunogenetics 1.995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), modificaciones basándose en esta 25 regularidad puede ser introducido en los péptidos inmunogénicos de la presente invención.

Por ejemplo, los péptidos que presentan una alta afinidad de acoplamiento a HLA-A2 tienden a presentar el segundo aminoácido

000032

del extremo N sustituido con leucina o metionina. De igual forma, los péptidos en los cuales el aminoácido C-terminal está sustituido con valina o leucina pueden ser igualmente utilizados de forma favorable. Por ende, los péptidos que presentan una
5 secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEC ID NO: 1 a 40, donde el segundo aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos de dicha SEC ID NO. es sustituido con leucina o metionina, y los péptidos, y/o donde el extremo C de la secuencia de aminoácidos de dicha SEC ID NO. es sustituido con valina o
10 leucina son contemplados en la presente invención.

Se puede introducir sustituciones no sólo en los aminoácidos terminales, sino también en la posición de posible reconocimiento del receptor de células T (TCR) de los péptidos. Varios estudios han demostrado que un péptido con sustituciones de aminoácidos
15 puede tener una función igual o mejor que la del original, por ejemplo, CAP1, p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎, Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ o gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba y colaboradores. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1.997, T. K. Hoffmann y colaboradores. J Immunol. (2.002) Feb. 1; 168(3):1338-47., S. O. Dionne y colaboradores. Cancer Immunol immunother.
20 (2.003) 52: 199-206 y S. O. Dionne y colaboradores. Cancer Immunology, Immunotherapy (2.004) 53, 307-314).

La presente invención igualmente contempla la adición de uno, dos o varios aminoácidos al extremo N y/o C de los presentes péptidos. Estos péptidos modificados que exhiben una alta
25 afinidad de acoplamiento con el antígeno HLA y mantienen la inducción de los CTL están igualmente incluidos en la presente invención. Por ejemplo, la presente invención proporciona un péptido aislado de menos de 14, 13, 12, 11, ó 10 aminoácidos en

000033

longitud, que incluye la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por:

(i) una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEC ID NO: 1 a 20, donde 1, 2, o varios aminoácido(s) son sustituidos y donde el péptido acopla un antígeno HLA e induce linfocitos T citotóxicos, y

(ii) la secuencia de aminoácidos de (i), donde la misma presenta una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de dicha SEC ID NO. es seleccionado a partir del grupo constituido por leucina o metionina; y

(b) el aminoácido C-terminal de dicha SEC ID es seleccionado a partir del grupo constituido por valina o leucina.

Además, la presente invención igualmente proporciona un péptido aislado de menos de 15, 14, 13, 12, ó 11 aminoácidos en longitud, lo que incluye la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por:

(i) una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEC ID NO: 21 a 40, donde 1, 2, o varios aminoácido(s) son sustituidos, y el péptido acopla un antígeno HLA e induce linfocitos T citotóxicos, y

(ii) la secuencia de aminoácidos de (i), donde la misma presenta una o ambas de las siguientes características:

(a) el segundo aminoácido del extremo N de dicha SEC ID es seleccionado a partir del grupo constituido por leucina o metionina; y

(b) el aminoácido C-terminal de dicha SEC ID es seleccionado a partir del grupo constituido por valina o leucina.

000034

Estos péptidos son procesados en APC de forma tal que incluyan un péptido de (i), (ii), (i') y (ii'), cuando estos péptidos entran en contacto o son introducidos en APC.

Sin embargo, cuando la secuencia de péptidos es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, se puede inducir efectos colaterales tales como desórdenes autoinmunes o síntomas alérgicos contra sustancias específicas. En consecuencia, se puede llevar a cabo búsquedas de homología utilizando las bases de datos disponibles para evitar las situaciones en las cuales la secuencia del péptido coincida con la secuencia de aminoácidos de otra proteína. Cuando se haga evidente a partir de las búsquedas de homología que no existe ningún péptido con 1 ó 2 aminoácidos diferentes al péptido objetivo, este último puede ser modificado a los fines de incrementar su afinidad de acoplamiento con los antígenos HLA, y/o de incrementar su inducción de los CTL sin cualquier peligro de estos efectos colaterales.

Aunque se prevé que los péptidos con alta afinidad de acoplamiento hacia los antígenos HLA descritos con antelación sean sumamente efectivos, los péptidos candidatos, que son seleccionados de acuerdo con la presencia de una alta afinidad de acoplamiento como un indicador, son examinados adicionalmente en búsqueda de la presencia de inducción de los CTL. En el presente documento, la frase "inducción de los CTL" indica la habilidad del péptido para inducir los CTLs, cuando se presentan sobre la célula que presenta antígenos (las APCs). Además, la "capacidad de inducción de los CTL" incluye la capacidad del péptido

inducir la activación de los CTL, la proliferación de los CTLs, la promoción de la lisis por parte de los CTLs de las células objetivo y el incremento en la producción de IFN-gamma en los CTLs.

5 La confirmación de la capacidad de inducción de los CTLs es llevada cabo por medio de la inducción de las APCs portadoras de antígenos MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos, y células dendríticas (DCs)), o más específicamente las DCs derivadas de los leucocitos mononucleares de la sangre periférica
10 humano, y luego de la estimulación con los péptidos, la mezcla con células CD8-positivas, y posteriormente la medición del IFN-gamma producido y liberado por los CTL en contra de las células objetivo. Como sistema de reacción, se puede utilizar los animales transgénicos que han sido producidos para expresar un
15 antígeno HLA humano (por ejemplo, los descritos en BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol agosto 2.000, 61(8): 764-79, Artículos relacionados, libros, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on MHC (HLA)
20 class II restricted T(H) response). Por ejemplo, las células objetivo puede ser radio marcadas con ⁵¹Cr y similares, y la actividad citotóxica puede ser calculada a partir de la radioactividad liberada por las células objetivo. Alternativamente, estas pueden ser examinadas por medio de la
25 medición del IFN-gamma producido y liberado por el CTL en la presencia de las APCs portadoras de péptidos inmovilizados y de la visualización de la zona de inhibición en el medio utilizando anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

000036

Como resultado del examen de la inducción de los CTL de los péptidos tales como se describe con antelación, se descubrió que los nonapéptidos y los decapeptidos seleccionados de entre los péptidos que presentan una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEC ID NO: 1 a 40, mostraron una inducción de los CTL particularmente alta, así como también una alta afinidad de acoplamiento con un antígeno HLA. Por ende, estos péptidos son ilustrativos como aplicaciones preferentes de la presente invención.

Adicionalmente, los resultados del análisis de la homología demuestran que estos péptidos no comparten una homología significativa con los péptidos derivados de cualquier otro producto genético humano conocido. Esto disminuye la posibilidad de respuestas inmunes desconocida o no deseadas cuando se utiliza para inmunoterapia. En consecuencia, igualmente desde este aspecto, estos péptidos son útiles buscando como respuesta la inmunidad en contra de ECT2 en pacientes con cáncer. Por ende, los péptidos de la presente invención, preferiblemente, los péptidos que presentan una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEC ID NO: 1 a 40 son contemplados por la presente invención.

Además de la modificación de los presentes péptidos discutida con anterioridad, los péptidos de la presente invención pueden ser acoplados a otros péptidos, siempre que el péptido acoplado resultante conserve la necesaria capacidad de inducción de los CTL del péptido original y que idealmente conserve también su necesaria capacidad de acoplamiento a HLA. "Otros" péptidos ilustrativos incluyen: los péptidos de la presente invención o

000037

los péptidos inducibles CTL derivados de otros TAAs. Los ligadores entre los péptidos son bien conocidos en el arte, por ejemplo, AAY (P. M. Daftarian y colaboradores, J Trans Med 2.007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Sutmuller y colaboradores, J Immunol. 2.000, 165: 7308-7315) o K (S. Ota y colaboradores, Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura y colaboradores, J Immunol. 2.002, 168: 5709-5715).

Por ejemplo, se puede igualmente utilizar los péptidos antigénicos no ECT2 asociados con tumores sustancial y simultáneamente para incrementar la respuesta inmune por medio de la HLA clase I y/o clase II. Está bien establecido que las células cancerosas pueden expresar más de un gen asociado a tumor. En conformidad, dentro del alcance de la experimentación rutina de los expertos en el arte se prevé determinar si un sujeto en particular expresa genes adicionales asociados a tumor, y posteriormente incluir el HLA clase I y/o HLA clase II acoplando los péptidos derivados de los productos de expresión de estos genes en las composiciones que contengan ECT2 o en las vacunas de la presente invención.

Los ejemplos de los péptidos que se acoplan a HLA clase I y HLA clase II son del conocimiento de aquellos con experiencia en este arte (véase, por ejemplo, Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1.995) y los mismos pueden ser utilizados en relación a la presente invención de manera similar a las descritas en el presente documento. Los expertos en el arte pueden preparar polipéptidos incluyendo uno o más péptidos ECT2 y uno o más de los péptidos no ECT2, o ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos, que utilizan procedimientos convencionales de la

000038

biología molecular.

Los péptidos acoplados que anteceden son denominados "polítomos", es decir, grupos de dos o más péptidos posiblemente inmunogénicos o estimuladores de respuesta inmunológicas que pueden ser agrupados entre sí en varias disposiciones (por ejemplo, concadenado, traslapado). El polítomo (o ácido nucleico que codifica el polítomo) puede ser administrado de acuerdo con los protocolos de inmunización convencionales, por ejemplo, a los animales, con el objeto de evaluar la efectividad del polítomo en la estimulación, mejora y/o inducción de una respuesta inmune.

Los péptidos pueden ser agrupados conjuntamente de forma directa o por medio de la utilización de secuencias flanqueadoras para formar polítomos, y el uso de polítomos como vacunas es bien conocido en el arte (véase, por ejemplo, Thomson y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1.995; Gilbert y colaboradores, Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1.997; Thomson y colaboradores, J Immunol. 157(2):822-826, 1.996; Tarn y colaboradores, J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990). Los polítomos que contienen varios números y combinaciones de epítomos, pueden ser preparados y evaluado para ser reconocidos por los CTLs y para la eficacia del incremento de una respuesta inmune.

Los péptidos de la presente invención pueden ser adicionalmente unidos a otras sustancias, siempre que mantengan la inducción requerida de los CTL. Ejemplos ilustrativos de estas "otras" sustancias incluyen, pero que no están limitados a, péptidos, lípidos, azúcar y cadenas de azúcares, grupos acetilo, polímeros naturales y sintéticos, etc. Los péptidos pueden contener modificaciones tales como glicosilación, oxidación de la

000039

cadena lateral, o fosforilación, siempre que las modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos tales como se describe en el presente documento. Se puede llevar a cabo estos tipos de modificaciones para conferirle funciones adicionales (por ejemplo, función direccional y función de liberación) o estabilizar al polipéptido.

Por ejemplo, para incrementar la estabilidad *in vivo* de un polipéptido, es conocido en el arte la introducción de aminoácidos D, aminoácido miméticos o aminoácidos no naturales; este concepto puede ser igualmente adoptado para los presentes polipéptidos. La estabilidad de un polipéptido puede ser experimentada de varias formas. Por ejemplo, las peptidasas y varios medios biológicos, tales como el plasma y el suero humano, pueden ser utilizado para evaluar la estabilidad (véase, por ejemplo, Verhoef y colaboradores, Eur J Drug Metab Pharmacokin 1.986, 11: 291-302).

Además, conforme se mencionó anteriormente, entre los péptidos modificados que son sustituidos, insertados, eliminados o añadidos por uno, dos o varios residuos de aminoácidos, los que presentan una actividad igual o superior comparada con los péptidos originales pueden ser evaluados o seleccionados. La presente invención, en consecuencia, igualmente proporciona el método de evaluación o selección de los péptidos modificados que presentan una actividad igual o superior comparada con los originales. Por ejemplo, el método puede incluir los siguientes pasos:

a: la sustitución, inserción, eliminación o adición de al menos un residuo de aminoácido de un péptido de la presente

000040

invención,

b: la determinación de la actividad del péptido, y

c: la selección del péptido que presente una actividad igual o superior comparada con el original.

5 En el presente documento, la actividad puede incluir actividad de acoplamiento de MHC, APC o la inducción de los CTL y la actividad citotóxica.

En el presente documento, los péptidos de la presente invención pueden ser descritos también como "péptido(s) ECT2" o
10 "polipéptido(s) ECT2".

III. Preparación de los péptidos ECT2

Los péptidos de la presente invención pueden ser preparados utilizando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, los péptidos
15 pueden ser preparados de forma sintética, por medio de la tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Los péptidos de la presente invención pueden ser sintetizados individualmente o como polipéptidos más largos, incluyendo dos o más péptidos. Los péptidos pueden ser aislados, es decir, purificados o
20 aislados sustancialmente libres de otras proteínas de la célula huésped de aparición natural y fragmentos de los mismos, o de cualquiera de otras sustancias químicas.

Los péptidos de la presente invención pueden contener modificaciones, tales como glicosilación, oxidación de la cadena
25 lateral, o fosforilación, con la salvedad que estas modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos originales. Otras modificaciones ilustrativas incluyen la incorporación de aminoácidos D u otros aminoácidos miméticos

000041

que pueden ser utilizados, por ejemplo, para incrementar la vida media sérica de los péptidos.

Un péptido de la presente invención puede obtenerse a través de la síntesis química basada en la secuencia de aminoácidos seleccionada. Por ejemplo, los métodos de síntesis de péptidos convencionales que pueden ser adoptados para la síntesis incluyen:

(i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1.966;

(ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Pres, New York, 1.976;

10 (iii) Peptide Synthesis (en Japonés), Maruzen Co., 1.975;

(iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (en Japonés), Maruzen Co., 1.985;

(v) Development of Pharmaceuticals (segundo volumen) (en Japonés), Vol. 14 (síntesis peptídica), Hirokawa, 1.991;

15 (vi) WO99/67288; y

(vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Pres, New York, 1.980, 100-118.

Alternativamente, los presentes péptidos pueden ser obtenidos adoptando cualquiera de los métodos de ingeniería genética conocidos para la producción de péptidos (por ejemplo, Morrison J, J Bacteriology 1.977, 132: 349-51; Clark-Curtis & Curtis, Métodos en Enzimología (eds. Wu y colaboradores.) 1.983, 101: 347-62). Por ejemplo, primero, se prepara un vector adecuado que hospeda un polinucleótido que codifica el péptido objetivo en una forma expresable (por ejemplo, aguas abajo de una secuencia regulatoria correspondiente a una secuencia promotora) y es transformado en una célula huésped adecuada. Tales vectores

000042

y células huésped se proporcionan igualmente en la presente invención. La célula huésped es posteriormente cultivada para producir el péptido de interés. El péptido puede ser también producido *in vitro* adoptando un sistema de translación *in vitro*.

5

IV. Polinucleótidos

La presente invención proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los péptidos mencionados con anterioridad de la presente invención. Estos incluyen los polinucleótidos derivados del gen *ECT2* de aparición natural (acceso al GenBank No. AY376439 (por ejemplo, SEC ID NO: 41)) y aquellos que presentan una secuencia de nucleótidos modificada de forma conservativa de los mismos. En el presente documento, la frase "secuencia de nucleótidos modificada de forma conservativa" se refiere a secuencias que codifican una secuencia idéntica o esencialmente idéntica de aminoácidos. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG, y GCU codifican todos al aminoácido alanina. Por ende, en cualquier posición donde se especifique una alanina es por un codón, este último puede ser alterado hasta cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones del ácido nucleico, denominadas en el arte "variaciones silentes", representan una especie de la variante conservadoramente modificada. Cada secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento como las que codifican un péptido igualmente describe todas las posibles variaciones

10

15

20

25

000043

silentes del ácido nucleico. Los expertos en el arte reconocerán fácilmente que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que de forma ordinaria constituye el único codón para la metionina, y TGG, que es de forma ordinaria el único codón para el triptófano) puede ser modificado para conseguir una molécula funcionalmente idéntica. En conformidad, cada secuencia descrita de nucleótidos que codifica a un péptido representa una descripción implícita de las variaciones silentes asociadas con la misma.

El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto de ADN, ARN, y derivados de los mismos. Como es bien conocido en el arte, una molécula de ADN está constituida por forma adecuada de bases tales como las bases de aparición natural A, T, C, y G, y T es reemplazada por U en un ARN. Los expertos reconocerán que las bases de aparición no natural se incluyan igualmente en los polinucleótidos.

El polinucleótido de la presente invención puede codificar a múltiples péptidos de la presente invención, con o sin la intervención de secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos intermedia puede proporcionar un sitio de división (por ejemplo, secuencia de reconocimiento de la enzima) del polinucleótido o los péptidos convertidos. Adicionalmente, el polinucleótido puede incluir cualquiera de las secuencias adicionales a la secuencia de codificación que codifica el péptido de la presente invención. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido recombinante que incluye secuencias regulatorias requeridas para la expresión del péptido o puede ser un vector de expresión (plásmido) con genes marcadores y similares. En general, estos polinucleótidos

000044

recombinantes pueden ser preparados por medio de la manipulación de polinucleótidos a través de técnicas recombinantes convencionales que utilizan, por ejemplo, polimerasas y endonucleasas.

5 Tanto las técnicas químicas de síntesis como las recombinantes pueden ser utilizadas para producir los polinucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, un polinucleótido puede ser producido por la inserción en un vector apropiado, que puede ser expresado cuando es transfectado en una
10 célula competente. Alternativamente, un polinucleótido puede ser ampliado utilizando técnicas de PCR o por medio de la expresión en huéspedes adecuados (véase, por ejemplo, Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1.989). Alternativamente, un
15 polinucleótido puede ser sintetizado utilizando las técnicas de fase sólida, tales como las que se describe en Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1.992, 48: 2223-311; Matthes y colaboradores, EMBO J 1.984, 3: 801-5.

20 V. Exosomas

La presente invención adicionalmente proporciona vesículas intracelulares denominadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de la presente invención y los antígenos HLA sobre su superficie. Los exosomas pueden ser
25 preparados, por ejemplo utilizando los métodos detallados en las Publicaciones Kohyo de las Solicitudes de Patente Japonesa No. Hei 11-510507 y WO99/03499, y pueden ser preparados utilizando las APCs obtenidas a partir de los pacientes sometidos a

000045

tratamiento y/o prevención. Los exosomas de la presente invención pueden ser inoculados en la forma de vacunas, de forma similar a los péptidos de la presente invención.

El tipo de antígenos HLA incluidos en los complejos debe coincidir con el del sujeto que requiere tratamiento y/o prevención. Por ejemplo, para los Japoneses, HLA-A2, en particular HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 y HLA-A*0250 con frecuencia resultan apropiados. La utilización del tipo A24 o del tipo A2 que es altamente expresado entre los Japoneses y Caucásicos resulta favorable en términos de la obtención de resultados efectivos y los subtipos tales como HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 y HLA-A*0250 encuentran utilidad. Típicamente, en la clínica, se investiga el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere tratamiento de forma anticipada, lo que permite una selección apropiada de los péptidos que tienen altos niveles de afinidad de acoplamiento con este antígeno o que tienen la capacidad de inducir a los CTL por medio de la presentación del antígeno. Adicionalmente, para obtener péptidos con una alta afinidad de acoplamiento y capacidad de inducción de los CTL, se puede llevar a cabo la sustitución, inserción, eliminación o adición de 1, 2 o varios aminoácidos, en función de la secuencia de aminoácidos del péptido parcial ECT2 de aparición natural.

En caso que se utilice el tipo A2 de antígeno HLA para el

000046

exosoma de la presente invención, los péptidos que presentan una secuencia de cualquier de las SEC ID NO: 1 a 40 presentan una particular utilidad.

5 VI. Células que presentan antígeno (APCs)

La presente invención igualmente proporciona las APCs aisladas que están presentes complejos formados con los antígenos HLA y los péptidos de la presente invención sobre su superficie. Las APCs pueden ser derivadas de pacientes sometidos a
10 tratamiento y/o prevención, y puede ser administrado en la forma de vacunas solas o en combinación con otras drogas, incluyendo los péptidos de la presente invención, los exosomas, o los CTLs.

Las APCs no se limitan a un tipo en particular de células e incluyen las células dendríticas (DCs), las células tipo
15 Langerhans, los macrófagos, las células B y las células T activadas, las cuales se sabe presentan antígenos proteínáceos sobre su superficie celular de forma tal de ser reconocidos por los linfocitos. Dado que la DC es una APC representativa que presenta la máxima actividad inductora de los CTLs entre las
20 APCs, las DCs encuentran utilidad en la forma de las APCs de la presente invención.

Por ejemplo, las APCs de la presente invención puede ser obtenidas por medio de la inducción de DCs a partir de los monocitos de la sangre periférica, poniéndolos en contacto
25 posteriormente (estimulando) con los péptidos de la presente invención *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Cuando se administran los péptidos de la presente invención a los sujetos, se inducen las APCs que presentan los péptidos de la presente invención en el

000047

cuerpo del sujeto. En consecuencia, las APCs de la presente invención pueden ser obtenidas recolectando las APCs del sujeto luego de la administración de los péptidos de la presente invención al sujeto. Alternativamente, las APCs de la presente invención pueden ser obtenidas poniendo en contacto las APCs recolectadas de un sujeto con el péptido de la presente invención.

Las APCs de la presente invención pueden ser administradas a un sujeto para inducir una respuesta inmune en contra del cáncer en el sujeto, solas o en combinación con otras drogas incluyendo los péptidos, exosomas o los CTLs de la presente invención. Por ejemplo, la administración ex vivo puede incluir los siguientes pasos:

- a: la recolección de las APCs del un primer sujeto,
- b: el contacto con las APCs del paso a, con el péptido, y
- c: la administración de las APCs del paso b a un segundo sujeto.

El primer y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo o pueden ser individuos diferentes. Las APCs obtenidas de conformidad con el paso b pueden ser administradas en la forma de una vacuna para el tratamiento y/o prevención del cáncer y algunos ejemplos entre otros incluyen el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC.

La presente invención igualmente proporciona un método o proceso para la elaboración de una composición farmacéutica para

000048

inducir las APCs, donde el método incluye el paso de la mezcla de
o la formulación del péptido de la invención con un transportador
farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo a un aspecto de la presente invención, las APCs
5 tienen un alto nivel de inducción de los CTL. En el término
"alto nivel de inducción de los CTL", el alto nivel se refiere a
ese nivel por medio de la puesta en contacto en APC con ningún
péptido o péptidos que no pueda inducir a los CTL. Las APCs que
presentan un alto nivel de inducción de los CTL pueden ser
10 preparados utilizando un método que incluye el paso de la
transferencia un polinucleótido que codifica el péptido de la
presente invención a las APCs *in vitro*, así como también el
método mencionado anteriormente. Los genes introducidos pueden
encontrarse en la forma de ADNs o ARNs. Algunos ejemplos de los
15 métodos de introducción entre otros incluyen diversos métodos
convencionalmente llevados a cabo en este campo tales como la
lipofección y la electroporación o se puede utilizar el método
que utiliza fosfato de calcio. Más específicamente, este puede
ser llevado a cabo tal como se describe en Cancer Res 1.996, 56:
20 5672-7; J Immunol 1.998, 161: 5607-13; J Exp Med 1.996, 184: 465-
72; Traducción de la Publicación Internacional Japonesa No. 2000-
509281. Por medio de la transferencia el gen en las APCs, el gen
experimenta transcripción, traslación y similares en la célula y
luego se procesa la proteína obtenida por MHC Clase I o Clase II
25 y se procede a través de una vía de presentación para presentar
los péptido parciales.

000049

VII. Linfocitos T citotóxicos (CTLs)

Un CTL inducido contra cualquiera de los péptidos de la presente invención refuerza la respuesta inmunológica dirigida a las células cancerosas *in vivo* y por ende puede ser utilizado en la forma de vacunas similares a los péptidos. Por ende, la presente invención proporciona CTLs aislados que son específicamente inducidos o activados a través de cualquiera de los presentes péptidos.

Estos CTLs pueden ser obtenidos por (1) la administración del péptido(s) de la presente invención a un sujeto, o (2) por medio del contacto de (estimulando) las APCs derivadas del sujeto, y las células CD8-positivas, o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con el péptido(s) de la presente invención o (3) por medio del contacto de células CD8-positivas o leucocitos mononucleares de sangre periférica *in vitro* con las APCs o exosomas que presenten un complejo de un antígeno HLA y el péptido sobre su superficie o (4) a través de la introducción de un gen que incluye un polinucleótido que codifica una subunidad de una célula T receptora (TCR) acoplada al péptido de la presente invención. Estas APCs o exosomas pueden ser preparados utilizando los métodos descritos anteriormente y los detalles del método (4) están descritos más adelante en la sección "VIII. Célula T receptora (TCR)".

Los CTLs de la presente invención pueden ser derivados de pacientes sometidos a tratamiento y/o prevención, y pueden ser administrados solos o en combinación con otras drogas incluyendo los péptidos o exosomas de la presente invención con el propósito de regular los efectos. Los CTLs obtenidos actúan

000050

específicamente contra las células objetivo que presentan los péptidos de la presente invención, por ejemplo, los mismos péptidos utilizados en la inducción. Las células objetivo pueden ser células que expresan de forma endógena a ECT2 tales como las células cancerosas o células que son transfectadas con el gen ECT2; y las células que presentan un péptido de la presente invención sobre la superficie celular debido a la estimulación con el péptido pueden ser igualmente utilizadas como objetivos del ataque de los CTL activados.

VIII. Receptor de células T (TCR)

La presente invención igualmente proporciona una composición incluyendo ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de células T (TCR), y los métodos de que utiliza el mismo. Las subunidades TCR tienen la habilidad de formar TCRs que confieren especificidad a las células T contra las células tumorales que presentan ECT2. Utilizando los métodos conocidos en el arte, pueden identificarse los ácidos nucleicos de cadenas alfa y beta así como las subunidades TCR del CTL inducido con uno o más péptidos de la presente invención (WO2007/032255 y Morgan y colaboradores, J Immunol, 171, 3288 (2003)). Por ejemplo, el método PCR es ideal para analizar el TCR. Los cebadores PCR para el análisis pueden ser, por ejemplo, cebadores 5'-R (5'-gtctaccaggcatttcgcttcat-3') como 5' cebadores laterales (SEC ID NO: 43) y cebadores 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') específica para la región C de la cadena alfa de TCR (SEC ID NO: 44), cebadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') específico

000051

para la región C1 de la cadena beta de TCR (SEC ID NO: 45) o cebadores 3-TRbeta-C2 (5'- ctagcctctggaatcctttctctt-3')

específico para la región C2 de la cadena beta de TCR (SEC ID NO: 46) como 3' cebadores laterales, pero sin limitarse a los mismos.

5 Los derivados TCRs pueden unirse una células objetivo mostrando el péptido ECT2 con alta avidéz, y opcionalmente mediar eficientemente la muerte de células objetivo que presentan el péptido ECT2 *in vivo* y *in vitro*.

Los ácidos nucleicos que codifican a las subunidades TCR
10 pueden ser incorporados en vectores adecuados, por ejemplo, vectores retrovirales. Estos vectores son bien conocidos en el arte. Los ácidos nucleicos o los vectores incluyéndolos, pueden ser transferidos de forma útil a una célula T, por ejemplo, una célula T de un paciente. Ventajosamente, la presente invención
15 proporciona una composición en existencia que permite una rápida modificación de las células T propias de un paciente (o aquellas de otros mamíferos) para rápida y fácilmente producir células T modificadas con excelentes propiedades aniquiladoras de las células cancerosas.

20 El TCR específico es un receptor capaz de reconocer específicamente un complejo de un péptido de la presente invención y una molécula de HLA, dando como resultado la actividad específica de una célula T en contra de la célula objetivo cuando el TCR es presentado sobre la superficie de la
25 célula T. Se puede confirmar un reconocimiento específico del complejo que antecede de conformidad con cualquiera de los métodos conocidos y los métodos que se prefiere utilizar, por ejemplo, incluyen el análisis por tinción del multímero

000052

utilizando moléculas HLA y los péptidos de la presente invención, y el experimento ELISPOT. Llevando a cabo el experimento ELISPOT, se puede confirmar que una célula T que expresa el TCR sobre la superficie celular reconoce una célula por medio del TCR, y que la señal es transmitida intracelularmente. La confirmación que el complejo anteriormente-mencionado puede dar como resultado la actividad citotóxica de una célula T cuando el complejo está presente sobre la superficie de la célula T puede ser igualmente llevada a cabo mediante un método conocido. Un método preferente incluye, por ejemplo, la determinación de la actividad citotóxica en contra de una célula objetivo HLA positiva, tal como el experimento de liberación de cromo.

Adicionalmente, la presente invención proporciona CTLs que son preparados por transducción con los ácidos nucleicos que codifican a los polipéptidos de las subunidades TCR que se unen al péptido ECT2 de, por ejemplo, las SEC ID NO: 1 a 40 en el contexto de HLA-A2.

Los CTLs convertidos son capaces de alojar a las células cancerosas *in vivo*, y pueden ser expandidos por métodos de cultivo *in vitro* ampliamente conocidos (por ejemplo, Kawakami y colaboradores, J Immunol., 142, 3452-3461 (1.989)). Los CTLs de la presente invención pueden ser utilizados para formar una composición inmunogénica útil en el tratamiento o la prevención del cáncer en un paciente que tiene la necesidad de terapia o protección (WO2006/031221).

IX. Sustancias o composiciones farmacéuticas

Dado que la expresión de ECT2 está específicamente elevada

000053

en el cáncer, por ejemplo, en el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC en comparación con el tejido normal, los péptidos o polinucleótidos de la presente invención pueden ser utilizados en el tratamiento y/o profilaxis del cáncer y/o la prevención de la recurrencia post-operatoria de los mismos. Por ende, la presente invención proporciona una sustancia o composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis y/o la prevención de la recurrencia post-operatoria del cáncer, incluyendo estos agente, sustancias o composiciones como un ingrediente activo uno o más de los péptidos, o polinucleótidos de la presente invención en la forma de un ingrediente activo. Alternativamente, los presentes péptidos pueden ser expresados sobre la superficie de cualquier de los exosomas o células que anteceden, tales como las APCs para ser utilizadas como sustancias o composiciones farmacéuticas. Adicionalmente, los CTLs mencionados con anterioridad cuyo objetivo es cualquiera de los péptidos de la presente invención, pueden ser igualmente utilizados como el ingrediente activo de las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas.

Los presentes agentes farmacéuticos, sustancias o composiciones se utilizan en la forma de una vacuna. En la presente invención, la frase "vacuna" (igualmente denominada como una composición inmunogénica) se refiere a una sustancia que funciona para inducir la inmunidad anti-tumoral luego de su inoculación en animales.

Los agentes farmacéuticos, sustancias o composiciones de la

000054

presente invención pueden ser utilizados para tratar y/o prevenir cánceres, y/o para la prevención de la recurrencia post-operatoria de los mismos, en sujetos o pacientes, incluyendo el ser humano y cualquier otro mamífero incluyendo, pero sin limitarse a, ratón, rata, cerdo de guinea, conejo, gato, perro, oveja, cabra, cerdo, ganado, caballo, mono, mandril, y chimpancé, particularmente un animal comercialmente importante o domesticado.

En otra aplicación, la presente invención proporciona también la utilización de un ingrediente activo en la elaboración de agentes farmacéuticos, sustancias o composiciones formuladas para el tratamiento y/o la prevención del cánceres o tumores, siendo dicho ingrediente activo seleccionado a partir de:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un ácido nucleico que codifica estos péptidos como está descrito en el presente documento en una forma expresable;

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

(d) una célula T citotóxica de la presente invención.

Alternativamente, la presente invención proporciona también un ingrediente activo para ser utilizado en el tratamiento o prevención del cáncer o tumor, siendo el ingrediente activo seleccionado a partir de:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un ácido nucleico que codifica estos péptidos como está descrito en el presente documento en una forma expresable;

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

000055

(d) una célula T citotóxica de la presente invención.

Alternativamente, la presente invención adicionalmente proporciona un método o proceso para la elaboración de un agente, una composición o una sustancia farmacéutica para el tratamiento
5 o prevención del cáncer o los tumores, donde el método o proceso incluye el paso de formulación de un transportador farmacéutica o fisiológicamente aceptable con un ingrediente activo seleccionado a partir de:

(a) un péptido de la presente invención;

10 (b) un ácido nucleico que codifica estos péptidos como está descrito en el presente documento en una forma expresable;

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

(d) una célula T citotóxica de la presente invención.

15 En otra aplicación, la presente invención igualmente proporciona un método o proceso para la elaboración de un agente, una composición o una sustancia farmacéutica para el tratamiento o prevención del cáncer o los tumores, donde el método o proceso incluye los pasos de combinación de un ingrediente activo con un
20 transportador farmacéutica o fisiológicamente aceptable, donde el ingrediente activo es seleccionado a partir de:

(a) un péptido de la presente invención;

(b) un ácido nucleico que codifica estos péptidos como está descrito en el presente documento en una forma expresable;

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

(d) una célula T citotóxica de la presente invención.

De acuerdo a la presente invención, se ha encontrado que los

000056

péptidos que presentan una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEC ID NO: 1 a 40 son péptidos epítipo HLA-A2 restringidos o los candidatos que pueden inducir una respuesta inmune potente y específica. En consecuencia, las presentes
5 sustancias o composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de estos péptidos con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 a 40 pueden ser particularmente utilizados para la administración a sujetos cuyo antígeno HLA es HLA-A2. Lo mismo aplica para sustancias o composiciones farmacéuticas que incluyen
10 polinucleótidos que codifican cualquiera de estos péptidos (es decir, los polinucleótidos de la presente invención).

Los cánceres a ser tratados con las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención no se ven limitadas e incluyen cualquier cáncer en el cual el ECT2 esté
15 involucrado (por ejemplo, esté sobre expresado), lo que entre otros incluye el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC.

20 Las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas pueden contener adicionalmente a los ingredientes activos mencionados con anterioridad, otros péptidos que tengan la habilidad de inducir los CTLs en contra de las células cancerosas, otros polinucleótidos que codifican los otros
25 péptidos, otras células que están presentes los otros péptidos, o estos. En el presente documento, los otros péptidos que tienen la habilidad de inducir los CTLs en contra de las células cancerosas son ilustrativos por los antígenos específicos del

000057

cáncer (por ejemplo, TAAAs identificados), pero sin limitarse a los mismos.

De ser necesario, las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden opcionalmente
5 incluir otras sustancias terapéuticas en la forma de un ingrediente activo, siempre que la sustancia no inhiba el efecto antitumoral del ingrediente activo, por ejemplo, cualquiera de los presentes péptidos. Por ejemplo, las formulaciones pueden incluir sustancias o composiciones anti inflamatorias,
10 analgésicos, quimioterapias, y similares. Adicionalmente a las otras sustancias terapéuticas en el medicamento por sí mismo, los medicamentos de la presente invención pueden ser igualmente administrados de forma única o secuencial con una o más sustancias o composiciones farmacológicas. Las cantidades de
15 medicamento y sustancia o composición farmacológica dependen de, por ejemplo, que tipo de sustancia(s) o composición(s) farmacológica es/son utilizada, la enfermedad que está siendo tratada, y los horarios y vías de administración.

Se entenderá que, además de los ingredientes en particular
20 mencionados en el presente documento, las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir otras sustancias o composiciones convencionales en el arte que se relacionen con el tipo de formulación en cuestión.

En una aplicación de la presente invención, las presentes
25 sustancias o composiciones farmacéuticas pueden ser incluidas en artículos de elaboración y equipos que contienen materiales útiles para el tratamiento las condiciones patológicas de la enfermedad a ser tratada, por ejemplo, el cáncer. El artículo de

000058

elaboración puede incluir un recipiente de cualquier de las presentes sustancias o composiciones farmacéuticas con una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen botellas, ampollas, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una
5 variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta en el recipiente debe indicar la la sustancia o composición utilizada para el tratamiento o la prevención de una o más condiciones de la enfermedad. La etiqueta puede indicar igualmente las direcciones para su administración y similares.

10 Además del recipiente anteriormente descrito, un equipo que incluya una sustancia o composición farmacéutica de la presente invención puede opcional y adicionalmente incluir un segundo recipiente contentivo de un diluyente farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente se pueden incluir otros materiales
15 adecuados desde el punto de vista comercial y de su utilización, lo que incluye otro buffers, diluyentes, filtros, agujas, inyectoras e inserciones en el empaque con las instrucciones de uso.

Las composiciones farmacéuticas pueden, si se desea, ser
20 presentadas en en la forma de un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más unidades de formas de dosificación que contienen el ingrediente activo. El paquete puede, por ejemplo, incluir una lámina metálica o plástica, tal como un paquete tipo blíster. El paquete o dispositivo
25 dispensador puede estar acompañado por las instrucciones para la administración.

(1) Las sustancias o composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos como el ingrediente activo

000059

Los péptidos de la presente invención pueden ser administrados directamente en la forma de una sustancia o composición farmacéutica, o en caso que se considere necesario, puede ser formulada a través de los métodos de formulación 5 convencionales. En el último caso, Adicionalmente a los péptidos de la presente invención, pueden incluirse como apropiados, transportadores, excipientes y los que son utilizados de forma ordinaria para las drogas, sin limitaciones particulares. Ejemplos de estos transportadores son agua estéril, solución 10 fisiológica salina, buffer de fosfato, fluidos de cultivo y similares. Adicionalmente, las sustancias o composiciones farmacéuticas pueden contener si se considera necesario, estabilizantes, suspensiones, preservativos, surfactantes y similares. Las sustancias o composiciones farmacéuticas de la 15 presente invención pueden ser utilizadas con propósitos anticancerosos.

Los péptidos de la presente invención pueden ser preparados en combinación, lo que incluye dos o más de los péptidos de la presente invención, para inducir a CTL *in vivo*. Los péptidos 20 pueden encontrarse en la forma de un coctel o pueden ser conjugados entre sí utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, los péptidos pueden ser químicamente enlazados o expresados en la forma de una poli secuencia de péptidos de fusión única que puede tener uno o varios aminoácido(s) en la 25 forma de un ligador (por ejemplo, ligador de Lisina: K. S. Kawamura y colaboradores. J. Immunol. 2.002, 168: 5709-5715). Los péptidos en la combinación puede ser los mismos o diferentes. Mediante la administración de los péptidos de la presente

000360

invención, los mismos presentan una alta densidad por los antígenos HLA sobre las APCs, entonces son inducidos los CTLs que reaccionan específicamente en dirección al complejo formado entre el péptido desplegado y el antígeno HLA. Alternativamente, las APCs (por ejemplo, DCs) son removidos de los sujetos y posteriormente son estimulados por los péptidos de la presente invención, para obtener las APCs que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención sobre su superficie celular. Estas APCs son nuevamente administradas a los sujetos, para inducir los CTLs en los mismos y, como resultado, pueden aumentar la agresividad hacia los tumores asociados con el endotelio.

Los agentes, sustancias o composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o la prevención del cáncer que incluyen cualquiera de los péptidos de la presente invención como el ingrediente activo pueden igualmente incluir un adyuvante de forma tal que se establezca efectivamente la inmunidad celular. Alternativamente, el agente farmacéutico, la sustancia o la composición, puede ser administrada con otros ingredientes activos o puede ser administrada por su formulación en gránulos. Un adyuvante se refiere a cualquier compuesto, sustancia o composición que mejora la respuesta inmune en contra de la proteína cuando se administra conjuntamente (o sucesivamente) con la proteína que presenta la actividad inmunológica. Un adyuvante que puede ser aplicado incluye los descritos en la literatura (Clin Microbiol Rev 1.994, 7: 277-89). Adyuvantes ilustrativos incluyen fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, toxina de cólera, toxina de salmonella, adyuvante incompleto de Freund (IFA), adyuvante completo de Freund (CFA), ISCOMatrix, GM-

000061

CSF, CpG, O/W emulsión, y similares, pero sin limitarse a los mismos.

Adicionalmente, las formulaciones de liposomas, formulaciones granulares en las cuales el péptido está unido a
5 microesferas de unos pocos micrómetros de diámetro, y las formulaciones en las cuales a lípido está unido al péptido pueden ser utilizadas convenientemente.

En otra aplicación de la presente invención, los péptidos de la misma pueden ser igualmente administrados en la forma de una
10 sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos ilustrativos de las sales incluyen sales con un metal alcalino, sales con un metal, sales con una base orgánica, sales con un ácido orgánico y sales con un ácido inorgánico.

En algunas aplicaciones, las sustancias o composiciones
15 farmacéuticas de la presente invención incluyen un componente que ceba al CTL. Los lípidos han sido identificados como sustancias o composiciones capaces de cebar el CTL *in vivo* en contra de antígenos virales. Por ejemplo, los residuos de ácido palmítico pueden ser ligados a la épsilon y a los grupos alfa aminos de un
20 residuo de lisina y posteriormente enlazados a un péptido de la presente invención. El péptido lipidado puede ser luego administrado ya sea directamente en una micela o partícula, incorporado en un liposoma, o emulsificado en un adyuvante. A título de otro ejemplo del cebado lipídico de las respuestas del
25 CTL, se puede utilizar lipoproteínas de *E. coli*, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS) para cebar el CTL cuando este está ligado de forma covalente a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres y colaboradores, Nature

000062

1.989, 342: 561-4).

El método de administración puede ser oral, intradérmico, subcutáneo, intravenoso inyección, o similares, y administración sistémica o administración local en la vecindad de los sitios
5 objetivo. La administración puede ser llevada a cabo mediante administración individual o reforzada por múltiples administraciones. Se puede ajustar la dosis de los péptidos de la presente invención de forma apropiada de acuerdo con la enfermedad a ser tratada, la edad del paciente, el peso, el
10 método de administración y similares y habitualmente se ubica entre 0.001 mg y 1.000 mg, por ejemplo, 0.01 mg hasta 100 mg, por ejemplo, 0.1 mg hasta 10 mg y puede ser administrada una vez durante entre unos días y hasta unos meses. Aquellos con experiencia en este arte podrán apropiadamente seleccionar la
15 dosis adecuada.

(2) Las sustancias o composiciones farmacéuticas que contiene polinucleótidos como el ingrediente activo

Los agentes, sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden igualmente incluir ácidos nucleicos que
20 codifiquen al o a los péptidos descritos en el presente documento, en una forma expresable. En el presente documento, la frase "en una forma expresable" significa que el polinucleótido, cuando es introducido en una célula, se expresará *in vivo* en la forma de un polipéptido que induce inmunidad anti-tumoral. En
25 una aplicación ilustrativa, la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido de interés incluye elementos regulatorios necesarios para la expresión del polinucleótido. El polinucleótido(s) puede ser equipado con el objeto de lograr una

000063

inserción estable en el genoma de la célula objetivo (véase, por ejemplo, Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1.987, 51: 503-12 para una descripción de los vectores cassette de recombinación homóloga. Véase igualmente, por ejemplo, Wolff y colaboradores, Science 1.990, 247: 1465-8; las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y WO 98/04720). Ejemplos de tecnologías de liberación basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", facilitado (bupivacaína, polímeros, mediados por péptidos) liberación, complejos lipídicos catiónicos, y mediado por partículas ("pistola genética") o liberación mediada por presión (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de América No. 5.922.687).

Los péptidos de la presente invención pueden ser igualmente expresados por vectores virales o bacterianos. Ejemplos de vectores de expresión incluyen los huéspedes virales atenuados, tales como vaccinia o fowlpox. Esta aproximación conlleva la utilización de una vacuna viral, por ejemplo, como un vector para expresar la secuencia de nucleótidos que codifican el péptido. Luego de su introducción en un huésped, la vacuna recombinante viral expresa al péptido inmunogénico y en consecuencia tiene como resultado una respuesta inmune. Los protocolos de vectores de vacuna y los métodos útiles en la inmunización están descritos en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de América No. 4.722.848. Otro vector es BCG (Bacille Calmette Guerin). Los vectores BCG están descritos en Stover y colaboradores, Nature 1.991, 351: 456-60. Serán aparentes una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o inmunización, por ejemplo, adenovectores y vectores adenovirales,

000004

vectores retrovirales, vectores de *Salmonella tyfi*, vectores de toxina ántrax destoxificada, y similares. Véase, por ejemplo, Shata y colaboradores, *Mol Med Today* 2,000, 6: 66-71; Shedlock y colaboradores, *J Leukoc Biol* 2.000, 68: 793-806; Hip y colaboradores, *En Vivo* 2000, 14: 571-85.

La liberación de un polinucleótido en un paciente puede ser sea directa, caso en el cual el paciente es directamente expuesto a un vector transportador de un polinucleótido, o indirecta, caso en el cual, las células transformadas con un cebador con el polinucleótido de interés *in vitro*, entonces las células son trasplantadas en el paciente. Estas dos aproximaciones son conocidas, respectivamente, como terapias genéticas *in vivo* y *ex vivo*.

Para revisiones generales de los métodos de terapia genética, véase Goldspiel y colaboradores, *Clinical Pharmacy* 1.993, 12: 488-505; Wu y Wu, *Biotherapy* 1.991, 3: 87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1.993, 33: 573-96; Mulligan, *Science* 1.993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1.993, 62: 191-217; *Trends in Biotechnology* 1,993, 11(5): 155-215). Los métodos comúnmente conocidos en el arte de tecnología de ADN recombinante que son aplicable a la presente invención están descritos por Ausubel y colaboradores, en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1.993; y por Krieger, en *Gene Transfer y Expresión, A Laboratory Manual*, Stockton Pres, NY, 1.990.

El método de administración puede ser oral, intradérmico, subcutáneo, por inyección intravenosa o similares y la administración sistémica o la administración local en las

000065

cercanías de los sitios objetivo encuentra utilidad. La administración puede ser llevada a cabo mediante administración individual o reforzada por múltiples administraciones. La dosis del polinucleótido en el transportador adecuado o en las células transformadas con el polinucleótido que codifica los péptidos de la presente invención, pueden ser ajustadas de forma apropiada de acuerdo con la enfermedad a ser tratada, la edad del paciente, el peso, el método de administración y similares, y de forma ordinaria está entre 0.001 mg y 1000 mg, por ejemplo, 0.001 mg y 1000 mg, por ejemplo, 0.1 mg y 10 mg, y puede ser administrada una vez cada pocos días hasta una vez cada pocos meses. Los expertos en el arte pueden seleccionar de forma apropiada las dosis adecuadas.

15 X. Métodos que utilizan los péptidos, los exosomas, las APCs y los CTLs

Los péptidos y polinucleótidos de la presente invención pueden ser utilizados para la preparación o inducción de las APCs y los CTLs. Los exosomas y las APCs de la presente invención pueden ser igualmente utilizados para inducir los CTLs. Los péptidos, polinucleótidos, exosomas y las APCs pueden ser utilizados en combinación con cualquier otro compuesto siempre que los compuestos adicionales no inhiban la inducción de los CTL. Por ende, cualquier de las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención mencionados con anterioridad pueden ser utilizados para inducir los CTLs. Adicionalmente, se puede igualmente utilizar aquellos que incluyen los péptidos y polinucleótidos para inducir las APCs tal

000066

como se explica más adelante.

(1) El método para inducir el antígeno que presenta células (APCs)

La presente invención proporciona los métodos para inducir las APCs con alta inducción de los CTL, que utilizan los péptidos o polinucleótidos de la presente invención.

Los métodos de la presente invención incluyen el paso del contacto de las APCs con los péptidos de la presente invención *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, el método el contacto de las APCs con los péptidos *ex vivo* puede incluir los siguientes pasos:

a: la recolección de las APCs de un sujeto, y

b: el contacto de las APCs del paso a, con el péptido.

Las APCs son sin limitarse, un tipo particular de células e incluyen DCs, células tipo Langerhans, macrófagos, células B, y células T activadas, que son conocidas por presentar antígenos proteínáceos sobre su superficie celular, de forma tal de ser reconocido por los linfocitos. Preferiblemente, los DCs pueden ser utilizados dado que presentan la más fuerte inducción de los CTL entre las APCs. Cualquiera de los péptidos de la presente invención pueden ser utilizados solos o con otros péptidos de la presente invención.

Por otro lado, cuando los péptidos de la presente invención son administrados a un sujeto, las APCs entran en contacto con los péptidos *in vivo*; consecuentemente, las APCs con alta inducción de los CTL son inducidos en el cuerpo del sujeto. Por ende, la presente invención incluye la administración de los péptidos de la presente invención a un sujeto. De igual forma,

000067

cuando los polinucleótidos de la presente invención son administrados a un sujeto en una forma expresable, los péptidos de la presente invención son expresados y entran en contacto con las APCs *in vivo*; consecuentemente, las APCs con alta inducción de los CTL son inducidos en el cuerpo del sujeto. Por ende, la presente invención puede igualmente incluir la administración de los polinucleótidos de la presente invención a un sujeto. La frase "forma expresable" es descrita anteriormente en la sección "IX. Sustancias y composiciones farmacéuticas, (2) Sustancias o composiciones farmacéuticas que contiene polinucleótidos como el ingrediente activo".

Adicionalmente, la presente invención puede incluir la introducción del polinucleótido de la presente invención en las APCs para inducir las APCs con inducción de los CTL. Por ejemplo, el método puede incluir los siguientes pasos:

a: la recolección de las APCs de un sujeto, y

b: la introducción de un polinucleótido que codifica al péptido de la presente invención.

El paso b puede ser llevado a cabo tal como se describe con antelación en la sección "VI. Células que presentan antígeno".

Alternativamente, la presente invención proporciona un método para la preparación de una célula presentadora de antígeno (APC), que específicamente induce la actividad CTL en contra de ECT2, donde el método puede incluir uno de los siguientes pasos:

(a) el contacto de una APC con un péptido de la presente invención *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*; y

(b) la introducción de un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención en un APC.

000008

(2) El método para inducir los CTLs

La presente invención igualmente proporciona los métodos para inducir los CTLs que utilizan los péptidos, polinucleótidos, exosomas o las APCs de la presente invención.

5 La presente invención igualmente proporciona los métodos para inducir los CTLs que utilizan un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad de una célula T receptora (TCR), reconociendo un complejo de los péptidos de la presente invención y los antígenos HLA. Preferiblemente, los
10 métodos para inducir los CTLs pueden incluir al menos un paso seleccionado a partir de entre:

a) el contacto de una célula CD8 positiva T con una célula presentadora de antígeno y/o un exosoma que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la
15 presente invención; y

b) la introducción de un polinucleótido que codifica un polipéptido que es capaz de formar una subunidad TCR que reconoce un complejo de un péptido de la presente invención y un antígeno HLA en una célula CD8 positiva.

20 Cuando los péptidos, los polinucleótidos, las APCs o los exosomas de la presente invención son administrados a un sujeto, los CTLs son inducidos en el cuerpo del sujeto y mejora la intensidad de la respuesta inmune dirigida a las células cancerosas. Por ende, los métodos de la presente invención
25 incluyen el paso de la administración de los péptidos, los polinucleótidos, las APCs o exosomas de la presente invención a un sujeto.

Alternativamente, los CTLs pueden ser inducidos también por

000009

que se utilizan ex vivo, y luego de inducir CTL, los CTLs activados pueden ser retornados al sujeto. Por ejemplo, el método puede incluir los siguientes pasos:

a: la recolección de las APCs de un sujeto;

5 b: el contacto con las APCs del paso a, con el péptido; y

c: el cultivo simultáneo las APCs del paso b con las células CD8-positivas.

Las APCs a ser cultivadas en conjunto con las células CD8-positivas en el paso c que antecede pueden ser igualmente
10 preparadas por medio de la transferencia de un gen que incluye un polinucleótido de la presente invención en las APCs descritas con antelación en la sección "VI. Las células presentadoras de antígeno"; sin embargo, la presente invención no se ve limitada en este sentido y abarca cualquiera de las APCs que están
15 efectivamente presentes sobre la superficie de un complejo de un antígeno HLA y un péptido de la presente invención.

En lugar de estas APCs, puede igualmente utilizarse los exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención. A saber, la
20 presente invención puede incluir el paso del cultivo simultáneo de exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de la presente invención. Estos exosomas pueden ser preparados utilizando los métodos descritos anteriormente en la sección "V. Exosomas".

25 Adicionalmente, los CTL pueden ser inducidos por la introducción de un gen que incluye un polinucleótido que codifica la subunidad TCR acoplada al péptido de la presente invención en las células CD8-positivas. Esta transducción puede ser llevada a

cabo tal como se describe con antelación en la sección "VIII. Célula T receptora (TCR)".

Adicionalmente, la presente invención proporciona un método o proceso para la elaboración de una sustancia o composición farmacéutica para inducir los CTLs, método éste que incluye el paso de la mezcla de o de la formulación del péptido de la presente invención, con un transportador farmacéuticamente aceptable.

(3) Método para inducir la respuesta inmune

Además, la presente invención proporciona los métodos para inducir una respuesta inmune en contra de las enfermedades relacionadas con ECT2. Las enfermedades adecuadas pueden incluir el cáncer, ejemplos que incluyen, pero que no están limitados a, cáncer vesical, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, NSCLC, linfoma, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC.

Los métodos de la presente invención pueden incluir el paso de la administración de sustancia(s) o composición(s) que contenga cualquiera de los péptidos de la presente invención o los polinucleótidos que los codifican. El presente método inventivo puede también contemplar la administración de exosomas o las APCs que presentan cualquiera de los péptidos de la presente invención. Para los detalles, véase el segmento de "IX. Sustancias o composiciones farmacéuticas", particularmente la parte que describe el uso de las sustancias o composiciones farmacéuticas de la presente invención en forma de vacunas. Adicionalmente, los exosomas y las APCs que puede ser utilizados para los presentes métodos con el fin de inducir la respuesta

000071

inmune, están descritos en detalle bajo los segmentos de "V. Exosomas", "VI. Las células que presentan el antígeno (APCs)", y (1) y (2) de "X. Los métodos que utilizan los péptidos, exosomas, las APCs y los CTLs", *supra*.

5 La presente invención igualmente proporciona un método o proceso para la elaboración de una sustancia o una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmune, método éste que puede incluir el paso de la mezcla o la formulación del péptido de la presente invención, con un transportador farmacéuticamente
10 aceptable.

Alternativamente, el método de la presente invención puede incluir el paso de la administración de una vacuna o una composición farmacéutica de la presente invención que contiene:

- (a) un péptido de la presente invención;
- 15 (b) un ácido nucleico que codifica estos péptidos, como está descrito en el presente documento en una forma expresable;
- (c) una APC o un exosoma que presenta un péptido de la presente invención sobre su superficie; o
- (d) una célula T citotóxica de la presente invención.

20 En el contexto de la presente invención, se puede tratar un cáncer que sobre expresa a ECT2 con estos ingredientes activos. Algunos ejemplos de estos cánceres entre otros incluyen el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer
25 esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC. En conformidad, antes de llevar a cabo la administración de las vacunas o composiciones farmacéuticas que incluyen los ingredientes activos, se prefiere

000072

confirmar si el nivel de expresión de ECT2 en las células o tejidos a ser tratados está aumentado en comparación con las células normales del mismo órgano. En consecuencia, en una aplicación, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un cáncer que (sobre) expresa a ECT2, método éste que puede incluir los siguientes pasos:

i) la determinación del nivel de expresión de ECT2 en las células o tejido(s) obtenidos de un sujeto con el cáncer a ser tratado;

ii) la comparación del nivel de expresión de ECT2 con un control normal; y

iii) la administración de al menos uno componente seleccionado a partir de entre (a) a (d) a un sujeto con cáncer descrito anteriormente que sobre expresa ECT2 comparado con un control normal.

Alternativamente, la presente invención igualmente proporciona una vacuna o composición farmacéutica que incluye al menos uno componente seleccionado a partir de entre (a) a (d), descrito anteriormente, para ser utilizado en la administración a un sujeto que presenta cáncer, que sobre expresa ECT2. En otras palabras, la presente invención adicionalmente proporciona un método para la identificación de un sujeto a ser tratado con el polipéptido ECT2 de la presente invención, método éste que incluye el paso de la determinación de un nivel de expresión de ECT2 en las células o tejido(s) derivadas del sujeto, donde un incremento del nivel comparado con un nivel normal de control del gen, indica que el sujeto puede tener cáncer que puede ser tratado con el polipéptido ECT2 de la presente invención. Los

000073

métodos de tratamiento del cáncer de la presente invención están descritos con mayores detalles más adelante.

Cualquier célula o tejido derivado del sujeto puede ser utilizado para la determinación de la expresión de ECT2, siempre
5 que estos incluyan la transcripción objetiva o el producto de la traducción de ECT2. Ejemplos de muestras adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, tejidos y fluidos corporales, tales como sangre, esputo y orina. Preferiblemente, la muestra de células o de tejidos derivados del sujeto contiene una población
10 celular que incluye una célula epitelial, idealmente, una célula epitelial cancerosa o una célula epitelial derivada del tejido sospechoso de ser canceroso. Adicionalmente, en caso que se considere necesario, la célula puede ser purificada a partir de los tejidos y fluidos corporales obtenidos, y posteriormente
15 utilizada como la muestra derivada del sujeto.

Un sujeto a ser tratado por el presente método es preferiblemente un mamífero. Mamíferos ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo, el ser humano, el primate
no humano, el ratón, la rata, el perro, el gato, el caballo, y la
20 vaca.

De acuerdo a la presente invención, puede determinarse el nivel de expresión de ECT2 en las células o tejidos obtenidos a partir de un sujeto. El nivel de expresión puede ser determinado en el nivel del producto de la transcripción (ácido nucleico),
25 que utiliza métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, el ARNm de ECT2 puede ser cuantificado que utiliza sondas por medio de métodos de hibridización (por ejemplo, hibridización Northern). La detección puede ser llevada a cabo en un chip, una serie o

000074

similares. El uso de una serie puede ser preferible para la detección del nivel de expresión de ECT2. Aquellos expertos en el arte pueden preparar estas sondas utilizando la información de la secuencia de ECT2. Por ejemplo, el ADNc de ECT2 puede ser
5 utilizado como las sondas. De ser necesario, las mismas pueden ser marcadas con un marcador adecuado, tal como tintes, sustancias fluorescentes e isótopos y el nivel de expresión del gen puede ser detectado como la intensidad de los marcadores hibridizados.

10 Adicionalmente, el producto de la transcripción de ECT2 (por ejemplo, la SEC ID NO: 42) puede ser cuantificado utilizando cebadores por métodos de detección basados en amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Estos cebadores pueden ser preparados basándose en la información disponible de la secuencia del gen.

15 Específicamente, una sonda o cebador utilizado en el presente método sufre hibridización bajo condiciones severas, moderadamente severas o poco severas en la forma del ARNm de ECT2. Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "condiciones rigurosa (hibridización)" se refiere a condiciones
20 bajo las cuales una sonda o cebador hibridizará su secuencia objetivo, pero otras secuencias. Condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes bajo diferentes circunstancias. La hibridización específica de secuencias más largas es observada a temperaturas más altas que las secuencias
25 más cortas. Generalmente, la temperatura de una condición rigurosa es seleccionada para estar entre 5 grados C más bajo que el punto térmico de derretimiento (T_m) para una secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. T_m es la

000075

temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la cual 50% de las sondas complementarias de la secuencia objetivo sufren hibridización en la forma de la secuencia objetivo en equilibrio. Dado que las secuencias
5 objetivos están generalmente presentes en exceso, a T_m , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio. Típicamente, se considera condiciones exigentes a aquellas en las cuales la concentración salina inferior a alrededor de 1,0 M del ión de sodio, típicamente alrededor de entre 0,01 y 1,0 M del ión de
10 sodio (u otras sales) a un pH de entre 7,0 y 8,3, siendo la temperatura de al menos cerca de 30 grados C para las sondas o cebadores cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos de cerca de 60 grados C para las sondas o cebadores más largos. Las condiciones rigurosas pueden ser igualmente logradas con la
15 adición sustancias desestabilizadoras, tales como la formamida.

Una sonda o cebador de la presente invención típicamente es un oligonucleótido esencialmente purificado. El oligonucleótido típicamente incluye una región de secuencia de nucleótidos que sufre hibridización bajo condiciones severas a una secuencia de
20 nucleótidos de al menos cerca de 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 ó 25 cadenas consecutivas con sentido de un ácido nucleico que incluye una secuencia ECT2 o una secuencia de nucleótidos de cadenas anti sentido de un ácido nucleico que incluye una secuencia ECT2 o un mutante de aparición natural de
25 estas secuencias. En particular, por ejemplo, en una aplicación preferente, un oligonucleótido que presenta 5-50 de longitud, puede ser utilizado en la forma de un cebador para la amplificación de los genes, a ser detectados. Idealmente, el

000076

ARNm o el ADNc de un gen ECT2 puede ser detectado con sonda o cebador de un oligonucleótido de un tamaño específico, generalmente entre 15- 30b de longitud.

En aplicaciones preferentes, la longitud de la sonda o cebador de un oligonucleótido puede ser seleccionado a partir de 15-25. Los procedimientos, dispositivos, o reactivos de ensayo para la detección del gen utilizando estas sondas o cebadores de un oligonucleótido son bien conocidos (por ejemplo una microserie de oligonucleótidos o PCR). En estos experimentos, las sondas o cebadores pueden incluir igualmente secuencias de marcadoras o de enlace. Adicionalmente, las sondas o cebadores pueden ser modificados con un marcador detectable o con el ligando de afinidad a ser capturado. Alternativamente, en los procedimientos de detección basados en hibridización, puede utilizarse igualmente un polinucleótido que presente unos pocos cientos (por ejemplo, cerca de 100-200) de bases hasta unas bases de pocos kilos (por ejemplo, cerca de 1000-2000) de longitud, para una sonda (por ejemplo, experimento northern blotting o análisis de una microserie de ADNc).

Alternativamente, el producto de la traducción puede ser detectado para el diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, puede determinarse la cantidad de proteína ECT2 (SEC ID NO: 42) o el fragmento inmunológico de la misma. Los métodos para la determinación de la cantidad de la proteína como el producto de la traducción incluyen los métodos de experimentos inmunológicos que utilizan un anticuerpo específico reconociendo la proteína. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Adicionalmente, cualquier fragmento o modificación (por ejemplo,

000077

anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo puede ser utilizado para la detección, siempre que el fragmento o anticuerpo modificado retenga la habilidad de acoplamiento con la proteína ECT2. Estos anticuerpos en contra de los péptidos de la presente invención y los fragmentos de los mismos, se proporcionan igualmente en la presente invención. Los métodos para preparar estos tipos de anticuerpos para la detección de proteínas, son bien conocidos en el arte, y cualquier método puede ser utilizado en la presente invención para preparar estos anticuerpos y equivalentes de los mismos.

A título de otro método para detectar el nivel de expresión del gen ECT2, basándose en su producto de la traducción, puede medirse la intensidad de la coloración por medio de un análisis inmunohistoquímico que utiliza un anticuerpo en contra de la proteína ECT2. A saber, al tomar esta medida, una fuerte coloración indica una presencia/nivel incrementado de la proteína y, al mismo tiempo, un alto nivel de expresión del gen ECT2.

Se puede determinar que el nivel de expresión de un gen objetivo, por ejemplo, el gen ECT2, en las células cancerosas está aumentado si el nivel aumenta del nivel de control (por ejemplo, el nivel en las células normales) del gen objetivo por, por ejemplo, 10%, 25%, o 50%; o aumenta hasta más de 1.1 veces, más de 1.5 veces, más de 2.0 veces, más de 5.0 veces, más de 10.0 veces o más.

El nivel de control puede ser determinado al mismo tiempo que las células cancerosas que utilizan una muestra(s) previamente recolectada y almacenada de un sujeto(s) cuyo estado de enfermedad(s) (cancerosa o no cancerosa) es/son conocidos.

000078

Adicionalmente, las células normales obtenidas a partir de regiones no cancerosas de un órgano que tiene un cáncer a ser tratado, pueden ser utilizadas como un control normal. Alternativamente, el nivel de control puede ser determinado por un método estadístico, basándose en los resultados obtenidos por medio del análisis previamente determinado del nivel de expresión del o los genes ECT2 en las muestras de los sujetos cuyos estados de enfermedad son conocidos. Adicionalmente, el nivel de control puede ser derivado de los patrones de una base de datos de expresión de las células previamente evaluadas. Además, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, el nivel de expresión del gen ECT2 en una muestra biológica puede ser comparado con múltiples niveles de control, determinados a partir de múltiples muestras de referencia. Es preferible utilizar un nivel de control determinado de una muestra de referencia derivada de un tejido similar al tipo del derivado de la muestra biológica del sujeto. Además, es preferible utilizar el valor convencional del nivel de expresión del gen ECT2 en una población con un estado de enfermedad conocido. El valor convencional puede ser obtenido utilizando cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, puede utilizarse un rango de desviación estándar media de ± 2 o ± 3 como el valor convencional.

En el contexto de la presente invención, un nivel de control determinado a partir de una muestra biológica que es conocida por no ser cancerosa, es denominado como un "nivel normal de control". Por otro lado, si el nivel de control es determinado a partir de una muestra biológica cancerosa, este es denominado como a "nivel canceroso de control". La diferencia entre el nivel

000079

de expresión de una muestra y el nivel de control puede ser normalizada al nivel de expresión de los ácidos nucleicos de control, por ejemplo, genes housekeeping, cuyos niveles de expresión se sabe no difieren dependiendo del estado canceroso o
5 no canceroso de la célula. Los genes de control Ilustrativos entre otros incluyen beta-actina, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, y la proteína ribosomal P1.

Cuando el nivel de expresión del gen ECT2 incrementa en comparación con el nivel normal de control o es
10 similar/equivalente al nivel canceroso de control, se puede diagnosticar que el sujeto padece de un cáncer que necesita ser tratado.

La presente invención igualmente proporciona un método para (i) el diagnóstico de una sospecha que un sujeto padezca de un
15 cáncer que necesita ser tratado, y/o (ii) la selección de un sujeto para recibir tratamiento del cáncer, método éste que puede incluir los siguientes pasos:

a) la determinación del nivel de expresión de ECT2 en las células o tejido(s) obtenidos de un sujeto del que se sospecha
20 tener un cáncer a ser tratado;

b) la comparación del nivel de expresión de ECT2 con un nivel de control normal;

c) el diagnóstico del sujeto como el que presenta el cáncer a ser tratado, si el nivel de expresión de ECT2 es incrementado
25 comparado con el nivel de control normal; y

d) la selección del sujeto que ha de recibir un tratamiento para el cáncer, si se diagnostica que el sujeto padece del cáncer a ser tratado, en el paso c).

000080

Alternativamente, este método puede incluir los siguientes pasos:

- a) la determinación del nivel de expresión de ECT2 en las células o tejido(s) obtenidos de un sujeto del que se sospecha pueda tener el cáncer a ser tratado;
- b) la comparación del nivel de expresión de ECT2 con un nivel de control canceroso;
- c) el diagnóstico del sujeto como el que presenta el cáncer a ser tratado, si el nivel de expresión de ECT2 es similar o equivalente al nivel de control canceroso; y
- d) la selección del sujeto que ha de recibir un tratamiento para el cáncer, si se diagnostica que el sujeto padece del cáncer a ser tratado, en el paso c).

La presente invención igualmente proporciona un equipo de diagnóstico para el diagnóstico o determinación de un sujeto que tiene o se sospecha padece de un cáncer que puede ser tratado con el polipéptido ECT2 de la presente invención, el cual puede ser igualmente utilizado en la determinación y/o monitoreo de la eficacia o aplicabilidad de una inmunoterapia del cáncer. Preferiblemente, el cáncer entre otros incluye el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC. Más particularmente, el equipo puede preferiblemente incluir al menos un reactivo para la detección de la expresión del gen ECT2 en una célula derivada del sujeto, reactivo éste que puede ser seleccionado a partir del grupo constituido por:

000081

(a) un reactivo para la detección del ARNm del gen ECT2;

(b) un reactivo para la detección de la proteína ECT2 o del fragmento inmunológico de los mismos; y

(c) un reactivo para la detección de la actividad biológica
5 de la proteína ECT2.

Ejemplos de reactivos adecuados para la detección ARNm del gen ECT2 pueden incluir los ácidos nucleicos que específicamente se unen a o identifican el ARNm del ECT2, tal como los oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a una
10 porción del ARNm del ECT2. Estos tipos de oligonucleótidos son ilustrados por cebadores y sondas que son específicos para el ARNm del ECT2. Estos tipos de oligonucleótidos pueden ser preparados basándose en métodos bien conocidos en el arte. Si se considera necesario, el reactivo para la detección del ARNm del
15 ECT2 puede ser inmovilizado sobre una matriz sólida. Además, en el equipo puede incluirse más de un reactivo para la detección del ARNm del ECT2.

Por otro lado, ejemplos de reactivos adecuados para la detección de la proteína ECT2 o del fragmento inmunológico de la
20 misma pueden incluir los anticuerpos de la proteína ECT2 o el fragmento inmunológico de los mismos. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Adicionalmente, cualquier fragmento o modificación (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv, etc.) del anticuerpo puede ser utilizado como el
25 reactivo, siempre que el fragmento o anticuerpo modificado mantenga la habilidad de acoplamiento con la proteína ECT2 o el fragmento inmunológico de la misma. Los métodos para preparar estos tipos de anticuerpos para la detección de las proteínas

000002

son bien conocidos en el arte, y cualquier método puede ser utilizado en la presente invención para preparar estos anticuerpos y los equivalentes de los mismos. Adicionalmente, el anticuerpo puede ser marcado con moléculas para la generación de
5 señales por medio del acoplamiento directo o una técnica de marcado indirecta. Los marcadores y los métodos para el marcado de los anticuerpos y la detección del acoplamiento de los anticuerpos con sus objetivos son bien conocidos en el arte, y cualquier marcador y método puede ser utilizado para la presente
10 invención. Además, en el equipo puede utilizarse más de un reactivo para la detección de la proteína ECT2.

El equipo puede contener más de uno de los reactivos mencionados con anterioridad. El equipo puede incluir adicionalmente una matriz sólida y un reactivo para acoplar una
15 sonda en contra de un gen ECT2 o un anticuerpo en contra de un péptido ECT2, un medio y un recipiente para el cultivo de células, reactivos de control positivos y negativos, y un anticuerpo secundario para la detección de un anticuerpo en contra de un péptido ECT2. Por ejemplo, las muestras de tejido
20 obtenidas a partir de sujetos sin o con cáncer, pueden ser reactivos de control útiles. Un equipo de la presente invención puede adicionalmente incluir otros materiales adecuados desde el punto de vista comercial y del usuario, lo que incluye buffers, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e inserciones en el empaque
25 (por ejemplo, escritas, grabadas, en CD-ROM, etc.). Estos reactivos y similares pueden ser introducidos en un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados pueden incluir botellas, ampollas, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden

000083

formarse a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

En una aplicación de la presente invención, cuando el reactivo es una sonda en contra del ARNm del ECT2, el mismo puede ser inmovilizado sobre una matriz sólida, tal como una cinta porosa, para formar al menos uno sitio de detección. La región de medición o detección de la cinta porosa puede incluir una pluralidad de sitios, que contienen cada uno un ácido nucleico (sonda). Una cinta de evaluación puede también contener sitios para los controles negativos y/o positivos. Alternativamente, los sitios de control pueden ser ubicados sobre una cinta separada de la cinta de evaluación. Opcionalmente, los diferentes sitios de detección pueden contener diferente cantidades de ácidos nucleicos inmovilizados, es decir, una cantidad mayor en el sitio de detección del cebador y menores cantidades en los sitios subsiguientes. Después de la adición de una muestra de evaluación, el número de sitios que muestran una señal detectable proporciona una indicación de la cantidad cuantitativa de ECT2 ARNm presente en la muestra. La sitios de detección pueden ser configurados de cualquier de forma adecuada y detectable y están típicamente en la forma de una barra o partícula que abarcan el ancho de una cinta de evaluación.

El equipo de la presente invención puede incluir adicionalmente una muestra de positivo control o una muestra convencional de ECT2. La muestra de control positivo de la presente invención puede ser preparada recolectando muestras positivas de ECT2, experimentando posteriormente sus Niveles de ECT2. Alternativamente, la proteína purificada de ECT2 o al

000084

polinucleótido, pueden añadirse a las células que do no expresan el ECT2 para formar la muestra positiva o la muestra de ECT2 convencional. En la presente invención, el ECT2 purificado puede ser una proteína recombinante. El nivel de ECT2 de la muestra de control positivo es, por ejemplo, más del valor de corte.

En una aplicación, la presente invención adicionalmente proporciona un equipo de diagnóstico incluyendo, una proteína o una proteína parcial de la misma capaz de reconocer específicamente el anticuerpo de la presente invención o el fragmento de los mismos.

Ejemplos de péptido parciales de la presente invención incluyen compuestos polipeptídicos de al menos 8, preferiblemente 15, y idealmente 20 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de una proteína de la presente invención. El cáncer puede ser diagnosticado por medio de la detección de un anticuerpo en una muestra (por ejemplo, sangre, tejido), que utiliza una proteína o un péptido (polipéptido) de la presente invención. El método para la preparación de la proteína de la presente invención y los péptidos son tal como se describe con antelación.

Los métodos para el diagnóstico del cáncer de la presente invención pueden ser llevados a cabo mediante la determinación de la diferencia entre la cantidad de anticuerpo anti-ECT2 y la de la correspondiente muestra control como se describe anteriormente. El sujeto es sospechoso de sufrir cáncer, si las células o tejidos del sujeto contienen anticuerpos en contra de los productos de expresión (ECT2) del gen y la cantidad del

000085

anticuerpo anti-ECT2 es determinada por ser mayor que el valor de corte en el nivel comparado con el del control normal.

En otra aplicación, un equipo de diagnóstico de la presente invención puede incluir el péptido de la presente invención y una molécula HLA acoplado al mismo. El método para la detección del CTLs antígeno específicos que utilizan péptidos antigénicos y molécula HLAs han sido ya establecidos (por ejemplo, Altman JD y colaboradores, Science. 1.996, 274(5284): 94-6). Por ende, el complejo del péptido de la presente invención y la molécula HLA puede ser aplicado al método de detección para averiguar los CTLs antígeno específicos tumorales, permitiendo en consecuencia una más temprana detección de la recurrencia y/o metástasis del cáncer,. Adicionalmente, este puede ser utilizado para la selección de sujetos aplicables para los fármacos incluyendo el péptido de la presente invención, en la forma de un ingrediente activo, o la determinación del efecto del tratamiento con los fármacos.

Particularmente, de acuerdo con los métodos conocidos (véase, por ejemplo, Altman JD y colaboradores, Science. 1.996, 274(5284): 94-6), puede prepararse el complejo oligomérico, tal como el tetrámero, de la molécula HLA radiomarcada y el péptido de la presente invención. Cuando se utiliza el complejo, el diagnóstico puede ser hecho, por ejemplo, a través de la cuantificación de los CTLs específicos antígeno-péptido en los linfocitos de la sangre periférica derivados del sujeto sospechoso de sufrir cáncer.

La presente invención adicionalmente proporciona un método o agentes de diagnóstico para la evaluación de la respuesta

000086

inmunológica del sujeto, utilizando péptido epítomos tales como se describen en el presente documento. En una aplicación de la invención, los péptidos restringidos HLA-A02, tales como los descritos en el presente documento, pueden ser utilizados como reactivos para la evaluación o la predicción de la respuesta inmune de un sujeto. La respuesta inmune a ser evaluada puede ser inducida poniendo en contacto un inmunógeno con células inmunocompetentes *in vitro* o *in vivo*. En algunas aplicaciones, cualquiera de las sustancias o composiciones que puedan tener como resultado la producción de CTLs antígeno específicos que reconocen y se une al péptido epítopo(s), puede ser utilizada como el reactivo. Puede que no sea necesario utilizar los reactivos peptídicos como el inmunógeno. Los sistemas experimentales que son utilizados para estos análisis incluyen desarrollos técnicos relativamente recientes tales como tetrámeros, coloración para los experimentos de liberación de linfocinas intracelulares e interferón, o experimentos ELISPOT. En aplicaciones preferentes, las células inmunocompetentes para la evaluación de una respuesta inmunológica, pueden ser seleccionadas entre sangre periférica, linfocito de sangre periférica (PBL), y célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). Los métodos para la recolección de o el aislamiento de estas células inmunocompetentes son bien conocidos en el arte. En una aplicación preferente alternativa, las células inmunocompetentes a ser puesta en contacto con un péptido reactivo, incluyen el antígeno que presenta células tales como las células dendríticas.

Por ejemplo, los péptidos de la presente invención pueden

000087

ser utilizados en experimentos de coloración de tetramero para la determinación de células mononucleares de sangre periférica para la presencia de los CTLs antígeno-específicos que siguen a la exposición a un antígeno celular tumoral o un inmunógeno. El
5 complejo tetramérico HLA puede ser utilizado para visualizar directamente los antígenos específicos de los CTLs (véase, por ejemplo, Ogg y colaboradores, Science 279: 2103-2106, 1.998; y Altman y colaboradores, Science 174: 94-96, 1.996) y determinar la frecuencia de la población de CTLs antígeno-específicos en una
10 muestra de células mononucleares de sangre periférica. Un reactivo de tetramero que utiliza un péptido de la invención puede ser generado tal como se describe más adelante.

Un péptido que se acopla a una molécula HLA es replegado en la presencia de la correspondiente cadena pesada de HLA y de beta
15 2-microglobulina, para generar un complejo trimolecular. En el complejo, el carboxilo terminal de la cadena pesada es biotinilado en un sitio que fue previamente diseñado en la proteína. Posteriormente, la estreptavidina es añadida al
complejo para formar el tetramero constituido por el complejo
20 trimolecular y la estreptavidina. Por medio de estreptavidina marcado por fluorescencia, el tetramero puede ser utilizado para teñir células antigénicas específicas. Las células pueden entonces ser identificadas, por ejemplo, por medio de citometría de flujo. Estos análisis pueden ser utilizados con propósitos
25 diagnósticos o pronóstico. Las células identificadas utilizando el procedimiento pueden ser utilizado también con propósitos terapéuticos.

La presente invención igualmente proporciona reactivos para

000088

la evaluación de respuestas de recuerdo inmunes (véase, por ejemplo, Bertoni y colaboradores, J. Clin. Invest. 100: 503-513, 1.997 y Penna y colaboradores, J Exp. Med. 174: 1565-1570, 1.991) incluyendo los péptidos de la presente invención. Por ejemplo, 5 muestras PBMC del paciente de individuos con cáncer a ser tratado, puede ser analizado para averiguar la presencia de CTLs antígeno-específicos que utilizan péptidos específicos. Una muestra de sangre que contiene células mononucleares puede ser evaluada por medio del cultivo de las PBMCs y estimulando las 10 células con un péptido de la invención. Luego de un período de cultivo apropiado, la población celular expandida puede ser analizada, por ejemplo, para averiguar la actividad de los CTL.

Los péptidos pueden ser igualmente utilizados como reactivos para la evaluación de la eficacia de una vacuna. Las PBMCs 15 obtenidas a partir de un paciente vacunado con un inmunógeno, pueden ser analizadas utilizando, por ejemplo, cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Se determina el HLA del paciente y los reactivos de péptido epítipo que reconocen a las moléculas alelo-específicas presentes en el paciente son 20 seleccionadas para el análisis. La inmunogenicidad de la vacuna puede ser indicada por la presencia de los CTLs epítipo-específicos en la muestra de PBMC. Los péptidos de la invención pueden ser igualmente utilizados para elaborar anticuerpos, que utilizan técnicas bien conocidas en el arte (véase, por ejemplo, 25 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; y Antibodies A Laboratory Manual, Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.989), que puede utilizarse como reactivos para diagnosticar, detectar o monitorear el cáncer. Estos anticuerpos

000089

pueden incluir aquellos que reconocen un péptido en el contexto de una molécula HLA, es decir, los anticuerpos que se une a un complejo péptido-MHC.

Los péptidos y composiciones de la presente invención tienen
5 un número de usos adicionales, algunos de ellos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico o la detección de un desorden caracterizado por la expresión de un polipéptido inmunogénico ECT2. Estos métodos involucran la determinación de
10 la expresión de un péptido de acoplamiento ECT2 HLA, o un complejo de un péptido de acoplamiento ECT2 HLA y una molécula HLA clase I en una muestra biológica. La expresión de un péptido o de una complejo de péptido y una molécula HLA clase I puede ser determinada o detectada por el experimento con un pareja de
15 acoplamiento para el péptido o complejo. En una aplicación preferente, una pareja de acoplamiento que se une con el péptido o complejo puede ser un anticuerpo que reconoce y específicamente se une al péptido. La expresión de ECT2 en una muestra biológica, tal como una biopsia de un tumor, puede ser igualmente
20 evaluada por protocolos convencionales de amplificación de PCR que utilizan cebadores ECT2. Un ejemplo de la expresión de un tumor es presentado en el presente documento y la descripción adicional de las condiciones ilustrativas y de los cebadores para la amplificación de ECT2, puede ser hallada en WO2003/27322,
25 cuyos contenidos son incorporados a título de referencia en el presente documento.

Preferiblemente, los métodos de diagnóstico involucran el contacto de una muestra biológica aislada de un sujeto con un

000090

agente específico para el péptido de acoplamiento ECT2 HLA, para detectar la presencia del péptido de acoplamiento ECT2 HLA en la muestra biológica. Tal como se utiliza en el presente documento, "el contacto de" significa la colocación de la muestra biológica en una proximidad suficiente con el agente y bajo las condiciones apropiadas de, por ejemplo, concentración, temperatura, tiempo, fuerza iónica, para permitir la interacción específica entre el agente y el péptido de acoplamiento ECT2 HLA que están presentes en la muestra biológica. En general, las condiciones para el contacto del agente con la muestra biológica son condiciones conocidas para aquellos expertos en el arte con el objeto de facilitar una interacción específica entre una molécula y su cognado (por ejemplo, una proteína y su receptor afín, un anticuerpo y su antígeno proteico afín, un ácido nucleico y su secuencia complementaria afín) en una muestra biológica. Las condiciones ilustrativas para facilitar una interacción específica entre una molécula y su cognado están descritas en la Patente de los Estados Unidos de América No. 5.108.921, otorgada a Low y colaboradores, cuyos contenidos son incorporados a título de referencia en el presente documento.

El método de diagnóstico de la presente invención puede ser llevado a cabo tanto *in vivo* como *in vitro*, así como en ambas. En conformidad, la muestra biológica puede ser ubicada *in vivo* o *in vitro* en la presente invención. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser un tejido *in vivo* y el agente específico para el polipéptido inmunogénico ECT2 puede ser utilizado para detectar la presencia de estas moléculas en el tejido. Alternativamente, la muestra biológica puede ser recolectada o

000091

aislada *in vitro* (por ejemplo, una muestra de sangre, una biopsia de un tumor, el extracto de un tejido). En una aplicación preferente particular, la muestra biológica puede ser una muestra que contiene células, idealmente una muestra que contiene células tumorales recolectadas de un sujeto a ser diagnosticado o tratado.

Alternativamente, el diagnóstico puede ser hecho, utilizando un método que permite la cuantificación directa de la células T antígeno-específicas por coloración con complejos multiméricos HLA marcados con fluoresceína (por ejemplo, Altman, J. D. y colaboradores, 1.996, Science 274: 94; Altman, J. D. y colaboradores, 1.993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10330). La coloración para la linfocinas intracelulares, y experimentos de liberación del interferón-gamma o experimentos ELISPOT se proporcionan igualmente. Parece que tanto la coloración multimérica, como la coloración de la linfocina intracelular como los experimentos ELISPOT son al menos 10 veces más sensibles que los experimentos más convencionales (Murali-Krishna, K. y colaboradores, 19.98, Immunity 8: 177; Lalvani, A. y colaboradores, 1.997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. y colaboradores, 1.998, Curr. Biol. 8: 413). Pentámeros (por ejemplo, US 2004-209295A), dextrámeros (por ejemplo, WO 02/072631), y estreptámeros (por ejemplo, Nature medicine 6. 631-637 (2.002)) pueden ser igualmente utilizados.

En conformidad, en algunas aplicaciones, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico o la evaluación una respuesta inmunológica de un sujeto, administrado al menos uno de los péptidos ECT2 de la presente invención,

000092

método éste que incluye los siguientes pasos:

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

5 (b) la detección de o la determinación del nivel de inducción del CTL inducido en el paso (a); y

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

En el contexto de la presente invención, el inmunógeno es al menos uno de (a) un péptido ECT2 seleccionado de entre las SEC ID
10 NO: 1 a 40 y (b) péptidos que presentan estas secuencia de aminoácidos, en las cuales estas últimas han sido modificadas con 1, 2 o más sustitución(s) de aminoácido. Entretanto, las condiciones utilizadas en la inducción del CTL específico del
15 inmunógeno son ampliamente conocidas en el arte. Por ejemplo, las células inmunocompetentes pueden ser cultivadas in vitro, bajo la presencia del inmunógeno(s) para inducir el inmunógeno CTL específico. A los fines de inducir a los CTLs específicos del inmunógeno, se puede añadir cualquiera de los factores de
20 estimulación al cultivo celular. Por ejemplo, el IL-2 es un factor de estimulación preferible para la inducción de los CTL.

En algunas aplicaciones, el paso del monitoreo o la evaluación de la respuesta inmunológica de un sujeto a ser tratado con terapia anticancerosa a base de péptidos puede ser
25 llevada a cabo antes de, durante y/o luego del tratamiento. En general, durante un protocolo de terapia anticancerosa, los péptidos inmunogénicos son administrados de forma repetida a un sujeto a ser tratado. Por ejemplo, los péptidos inmunogénicos

000093

pueden ser administrados cada semana durante 3-10 semanas. En conformidad, la respuesta inmunológica del sujeto puede ser evaluada o monitoreada durante el protocolo de terapia anticancerosa. Alternativamente, el paso de la evaluación o el monitoreo de la respuesta inmunológica a la terapia anticancerosa puede llevarse a cabo al final del protocolo de terapia.

De acuerdo a la presente invención, la inducción mejorada del inmunógeno CTL específico comparada con un control, indica que el sujeto a ser evaluado o diagnosticado respondió inmunológicamente al inmunógeno(s) que ha(n) sido administrado. Los controles adecuados para la evaluación de la respuesta inmunológica pueden incluir, por ejemplo, una inducción del nivel de CTL cuando las células inmunocompetentes entran en contacto con controles sin péptidos, o con péptido(s) que presentan una secuencia de aminoácidos distinto a cualquiera de los péptidos ECT2. (por ejemplo, una secuencia aleatoria de aminoácidos). En una aplicación preferente, la respuesta inmunológica del sujeto es evaluada con una forma específica de la secuencia, comparándola con una respuesta inmunológica entre cada inmunógeno administrado al sujeto. En particular, aún cuando la mezcla de algunos tipos de péptidos ECT2 es administrado al sujeto, la respuesta inmunológica puede variar dependiendo de los péptidos. En ese caso, comparando la respuesta inmunológica entre cada péptido, pueden identificarse los péptidos con los que el sujeto presenta una respuesta más alta.

XI. Anticuerpos

La presente invención adicionalmente proporciona anticuerpos

000094

que se acoplan a los péptidos de la presente invención. Los anticuerpos preferiblemente se acoplan de forma específica al péptido de la presente invención y no se acoplarán (o lo harán con debilidad) a los componentes no peptídicos de la presente invención. Alternativamente, los anticuerpos se acoplan al péptido de la invención, al igual que a los homólogos del mismo. Se puede utilizar anticuerpos contra el péptido de la invención en el diagnóstico del cáncer, en los experimentos de diagnóstico y en las metodologías de imagenología. De igual forma, estos anticuerpos pueden ser de utilidad en el tratamiento, diagnóstico y/o prognosis de otros cánceres, siempre que ECT2 igualmente se exprese o sobre exprese en el paciente con cáncer. Además, los anticuerpos intracelularmente expresados (por ejemplo, los anticuerpos de cadena única) pueden hallar una utilidad terapéutica en el tratamiento de los cánceres en los cuales la expresión de ECT2 se encuentra implicada, algunos ejemplos de los cuales entre otros incluyen el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC.

La presente invención igualmente proporciona varios experimento inmunológicos para la detección de y/o cuantificación de la proteína ECT2 (SEC ID NO: 42) o los fragmentos de los mismos incluyendo los polipéptidos que presentan un aminoácido seleccionado de entre las SEC ID NO: 1 a 40. Estos experimentos pueden incluir uno o más anticuerpos anti-ECT2 capaces de reconocer y acoplarse a la proteína ECT2 o a los fragmentos de la

000095

misma, en forma apropiada. En la presente invención, los anticuerpos anti-ECT2 acoplados al polipéptido ECT2 reconocen preferiblemente un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEC ID NO: 1 a 40. Se puede confirmar la especificidad de enlace de un anticuerpo con una evaluación de la inhibición. Es decir, cuando el acoplamiento de un anticuerpo a ser analizado y el polipéptido ECT2 longitud completa es inhibido bajo la presencia de cualquier fragmento de polipéptidos que presentan una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEC ID NO: 1 a 40, el anticuerpo se acopla específicamente al fragmento. En el contexto de la presente invención, estos experimentos inmunológicos son llevados a cabo dentro de diversos formatos de experimentos inmunológicos ampliamente conocidos en el arte, lo que entre otros incluye varios tipos de experimentos radioinmunológicos, técnicas inmuno-cromatográficas, enzima-enlazado ensayos de inmunoabsorción (ELISA), experimentos de inmunofluorescencia enlazado a la enzima (ELIFA), y similares.

Los ensayos inmunológicos mas que no utilizan anticuerpos relacionados con la invención pueden igualmente incluir ensayos de inmunogenicidad de las células T (de inhibición o estimulación), al igual que ensayos de acoplamiento de MHC. Adicionalmente, los métodos inmunológicos de imagenología capaces de detectar los cánceres que expresan a ECT2 son igualmente utilizados en la invención, lo que entre otros incluye los métodos radioescintigráficos de imagenología que utilizan los anticuerpos marcados de la presente invención. Se puede utilizar estos ensayos clínicamente en la detección, monitoreo y prognosis

000096

de los cánceres que expresan a ECT2, lo que entre otros incluye el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el
5 cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC.

La presente invención igualmente proporciona un anticuerpo que se acopla al péptido de la invención. El anticuerpo de la invención puede ser utilizado en cualquier forma, tal como anticuerpos policlonales o monoclonales, e incluyen antisuero
10 obtenido utilizando la inmunización de un animal tal como un conejo con el péptido de la invención, siendo producidos por recombinación genética, todas las clases de anticuerpos monoclonales y policlonales, de anticuerpos humanos y de anticuerpos humanizados.

15 Un péptido de la invención utilizado en la forma de un antígeno para obtener un anticuerpo, puede ser derivado de cualquiera de las especies de animales, pero preferiblemente se deriva de un mamífero tal como, un ser humano, ratón, o rata, idealmente de un ser humano. Un péptido derivado de un ser
20 humano puede ser obtenido a partir del nucleótido o secuencia de aminoácidos descritos en el presente documento.

De acuerdo a la presente invención, el péptido a ser utilizado en la forma de un antígeno de inmunización puede ser una proteína completa o un péptido parcial de la misma. Un
25 péptido parcial puede incluir, por ejemplo, el fragmento amino (N)-terminal o carboxi (C)-terminal de un péptido de la presente invención.

En el presente documento, un anticuerpo es definido como una

000097

proteína que reacciona ya sea con la longitud total o con un fragmento de un péptido ECT2. En una aplicación preferente, el anticuerpo de la presente invención puede reconocer fragmentos de péptidos de ECT2 que presentan una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEC ID NO: 1 a 40. Los métodos para la síntesis de oligopéptidos son bien conocidos en el arte. Luego de la síntesis, los péptidos pueden ser opcionalmente purificados previamente para utilizarlos como un inmunógeno. En la presente invención, el oligopéptido (por ejemplo, 9- o 10mer) puede ser conjugado o enlazado con transportadores para mejorar su inmunogenicidad. La hemocianina Keyhole-limpet (KLH) es bien conocida como el transportador. El método para la conjugación del KLH y del péptido es igualmente bien conocido en el arte.

Alternativamente, un gen que codifica un péptido de la invención o fragmento del mismo puede ser insertado en un vector de expresión conocido, que es posteriormente utilizado para transformar una célula huésped tal como se describe en el presente documento. El péptido o fragmento del mismo deseado puede ser recuperado del exterior o interior de las células huésped mediante cualquier método convencional, y puede ser utilizado posteriormente en la forma de un antígeno. Alternativamente, todas las células que expresan el péptido o sus lisados o un péptido químicamente sintetizado pueden ser utilizados como el antígeno.

Cualquier animal mamífero puede ser inmunizado con el antígeno, pero preferiblemente, la compatibilidad con las células parentales utilizadas para la fusión de las células es tomada en cuenta. En general, pueden utilizarse los animales de las

000098

familias Rodentia, Lagomorpha o de los primates. Los animales de la familia Rodentia incluyen, por ejemplo, el ratón, la rata y el hámster. Los animales de la familia Lagomorpha incluyen, por ejemplo, el conejo. Los animales de la familia de los primates incluyen, por ejemplo, un mono de Catarrhini (mono de viejo mundo) tal como el *Macaca fascicularis*, el mono Rhesus, el mandril sagrado y los chimpancés.

Los métodos para la inmunización de animales con antígenos son conocidos en el arte. La inyección intraperitoneal subcutánea de los antígenos es un método convencional para la inmunización de mamíferos. Más específicamente, los antígenos pueden ser diluidos y suspendidos en una cantidad de buffer fosfatado salino apropiada (PBS), solución fisiológica salina, etc. Si se desea, la suspensión del antígeno puede ser mezclada con una cantidad apropiada de adyuvantes convencionales, tales como el adyuvante completo de Freund, que es elaborado en una emulsión y posteriormente administrado a los animales mamíferos. Preferiblemente, esto es seguido por varias administraciones de antígenos mezclados con una cantidad de adyuvante incompleto de Freund, de forma apropiada, cada 4 a 21 días. También puede utilizarse un transportador apropiado para la inmunización. Luego de la inmunización descrita anteriormente, el suero puede ser examinado por medio de un método convencional para conocer si se incrementaron los anticuerpos en la cantidad deseada.

Los anticuerpos policlonales en contra de los péptidos de la presente invención pueden ser preparados recolectando sangre el mamífero inmunizado, examinado el incremento deseada de los anticuerpos en el suero, por medio de la separación del suero de

000099

la sangre utilizando cualquier método convencional. Los anticuerpos policlonales incluyen un suero que contiene los anticuerpos policlonales, así como también puede aislarse del suero la fracción que contiene los anticuerpos policlonales. Las inmunoglobulinas G o M pueden ser preparadas a partir de una fracción que reconozca únicamente el péptido de la presente invención, que utiliza, por ejemplo, una columna de afinidad acoplada con el péptido de la presente invención, y la purificación adicional de esta fracción que utiliza la columna de proteína A o de proteína G.

Para preparar los anticuerpos monoclonales, las células inmunes son recolectadas del mamífero inmunizado con el antígeno y se examinan para conocer el nivel de incremento deseado de los anticuerpos en el suero, tal como se describe con antelación, y son sometidas a la fusión de las células. Las células inmunes utilizadas para la fusión de las células pueden ser obtenidas preferiblemente del bazo. Otras células parentales preferentes a ser fundidas con el inmunocito descrito anteriormente incluyen, por ejemplo, células del mieloma de mamíferos, e idealmente células del mieloma que presentan una propiedad adquirida para la selección de las células fundidas por las drogas.

El inmunocito y las células de mieloma descritas anteriormente pueden ser fundidas de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein y colaboradores. (Galfre y Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1.981)).

Los hibridomas obtenidos resultantes utilizando la fusión de las células, pueden ser seleccionados por medio del cultivo de los mismos en un medio de selección convencional, tal como un

000100

medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina que contiene el medio). El cultivo celular es típicamente continuado en el medio HAT durante varios días a varias semanas, siendo el tiempo suficiente para permitir que mueran todas las demás células, con la excepción del hibridoma deseado (células no fundidas).
5 Posteriormente, puede llevarse a cabo la dilución de limitación convencional para monitorear y clonar una célula hibridoma que produce el anticuerpo deseado.

Adicionalmente el método descrito anteriormente, en el cual
10 un animal distinto al ser humano es inmunizado con un antígeno para la preparación del hibridoma, los linfocitos humano tales como aquellos infectados por el virus EB, pueden ser inmunizados con un péptido, péptido este que expresa las células o sus lisados *in vitro*. Posteriormente, los linfocitos inmunizados son
15 fundidos con un derivado de células de mieloma de un ser humano que son capaces de dividir indefinidamente, tal como en la U266, para conseguir un hibridoma que produzca un anticuerpo humano deseado capaz de unirse al péptido (La Solicitud de Patente Japonesa Publicada No examinada No. Sho 63-17688).

20 Los hibridomas obtenidos son posteriormente trasplantados a la cavidad abdominal de un ratón y se extraen los líquidos ascíticos. Los anticuerpos monoclonales obtenidos pueden ser purificados por, por ejemplo, precipitación de sulfato de amonio, una columna de proteína A o de proteína G, intercambio iónico
25 cromatográfico DEAE y o el acoplamiento de una columna de afinidad con el péptido de la presente invención. El anticuerpo de la presente invención puede ser utilizado no únicamente para la purificación y detección del péptido de la presente invención,

si no igualmente en la forma de un candidato para los agonistas y antagonistas del péptido de la presente invención.

Alternativamente, una célula inmune, tal como un linfocito inmunizado, que produce anticuerpos puede ser inmortalizados por un oncogén y utilizado para la preparación de anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos por ende, pueden ser igualmente preparados de forma recombinante, utilizando técnicas de ingeniería genética (véase, por ejemplo, Borrebaeck y Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1.990)). Por ejemplo, un ADN que codifica un anticuerpo puede ser clonado a partir de una célula inmune, tal como un hibridoma o un linfocito inmunizado que produce el anticuerpo, insertado en un vector apropiado, e introducido en las células huésped para preparar un anticuerpo recombinante. La presente invención igualmente proporciona anticuerpos recombinantes preparados tal como se describe con antelación.

Adicionalmente, un anticuerpo de la presente invención puede ser un fragmento de un anticuerpo o de un anticuerpo modificado, siempre que este se acople a uno o más de los péptidos de la invención. Por ejemplo, el fragmento del anticuerpo puede ser Fab, F(ab')₂, Fv o Fv de cadena individual (scFv), en el cual los fragmentos Fv de las cadenas H y L son ligados por un ligador apropiado (Huston y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1.988)). Más específicamente, un fragmento del anticuerpo puede ser generado por el tratamiento de un anticuerpo con una enzima, tal como papaína o pepsina. Alternativamente,

000102

puede construirse un gen que codifica el fragmento del anticuerpo, insertándolo en un vector de expresión que se expresa en una célula huésped apropiada (véase, por ejemplo, Co y colaboradores, J Immunol 152: 2968-76 (1.994); Better y Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1.989); Pluckthun y Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1.989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1.986); Rousseaux y colaboradores, Methods Enzymol 121: 663-9 (1.986); Bird y Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1.991)).

Un anticuerpo puede ser modificado por medio de la conjugación con una variedad de moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). La presente invención proporciona estos anticuerpos modificados. El anticuerpo modificado puede ser obtenido modificando químicamente un anticuerpo. Estos métodos de modificación resultan convencionales en el campo.

Alternativamente, se puede obtener un anticuerpo de la presente invención en la forma de un anticuerpo quimérico, entre una región variable derivada de un anticuerpo no humano y la región constante derivada del anticuerpo humano, o en la forma de un anticuerpo humanizado, incluyendo la región determinante de complementariedad (CDR) derivada del anticuerpo no humano, el región marco (FR) y la región constante derivada del anticuerpo humano. Estos anticuerpos pueden ser preparados utilizando la tecnología conocida. La humanización puede ser llevada a cabo por medio de la sustitución de CDRs de roedores o las secuencias CDR de las correspondiente secuencias de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Verhoeyen y colaboradores, Science 239:1534-1536 (1.988)). En conformidad, estos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, donde sustancialmente menos de un dominio

variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de las especies no humanas.

Igualmente pueden utilizarse los anticuerpos completamente humanos, incluyendo las regiones variables humanas adicionales a un marco humano y a las regiones constantes. Estos anticuerpos pueden ser producidos utilizando varias técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, los métodos *in vitro* involucran el uso de librerías recombinantes de fragmentos de anticuerpos humanos desplegados sobre el bacteriófago (por ejemplo, Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1.991). De igual forma, se puede producir anticuerpos humanos mediante la introducción de locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los cual los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Esta aproximación es descrita, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 6.150.584, 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016.

Se puede purificar los anticuerpos obtenidos conforme se indicó con anterioridad hasta su homogeneidad. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la separación y purificación del anticuerpo de acuerdo con los métodos utilizados en el caso de las proteínas en general. Por ejemplo, se puede separar el anticuerpo y aislarlo por medio de la selección apropiada y del uso combinado de cromatografías en columna tales como la cromatografía de afinidad, filtración, ultrafiltración, desalación, diálisis, electroforesis en geles de poliacrilamida SDS y el enfoque isoeléctrico (Anticuerpos: Un Manual Experimental. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1.988)), entre otros.

000104

Se puede utilizar una columna de proteína A y una columna de proteína G como la columna de afinidad. Algunos ejemplos de las columnas de proteína A que pueden ser utilizadas, por ejemplo, incluyen Hyper D, POROS y Sefarosa F.F. (Pharmacia).

5 A excepción de la afinidad, algunos ejemplos de cromatografías, por ejemplo, incluyen la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía hidrofóbica, la filtración en geles, la cromatografía en fase inversa, la cromatografía de adsorción y similares (Estrategias para la Caracterización y
10 Purificación de Proteínas: Un Manual de Uso Experimental. Ed Daniel R. Marshak y colaboradores, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1.996)). Se puede llevar a cabo los procedimientos cromatográficos por cromatografía en fase líquida, por ejemplo, por HPLC y FPLC.

15 Por ejemplo, se puede utilizar la medición de la absorbancia, el ensayo por inmunoabsorción enzimática (ELISA), el inmunoensayo enzimático (EIA), el radioinmunoensayo (RIA) y/o la inmunofluorescencia para medir la actividad antigénica de
20 acoplamiento del anticuerpo de la invención. En ELISA, el anticuerpo de la presente invención es inmovilizado sobre una placa, se aplica un péptido de la invención a la placa y luego se le aplica una muestra contentiva del anticuerpo apropiado, por ejemplo, el sobrenadante del cultivo de las células productoras del anticuerpo o los anticuerpos purificados. Luego, se aplica
25 un anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario y que está marcado con una enzima tal como una fosfatasa alcalina y se incuba la placa. Luego, después de lavarla, se agrega un sustrato enzimático tal como fosfato de *p*-nitrofenilo, a la placa.

y se mide la absorbancia con el objeto de evaluar la actividad antigénica de acoplamiento de la muestra. Se puede utilizar un fragmento del péptido, por ejemplo, un fragmento C-terminal o N-terminal, como el antígeno, a los efectos de evaluar la actividad de acoplamiento del anticuerpo. Se puede utilizar un BIAcore (Pharmacia) para evaluar la actividad del anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

Los métodos que anteceden hacen posible detectar o medir el péptido de la invención, mediante la exposición del anticuerpo de la invención a una muestra que se asume contiene el péptido de la invención y la detección o medición del complejo inmunológico formado por el anticuerpo y el péptido.

Dado que el método de detección o medición del péptido de acuerdo con la invención puede específicamente detectar o medir un péptido, el método puede ser de utilidad en una variedad de experimentos en los cuales se utiliza el péptido.

XII. Vectores y células huésped

La presente invención igualmente proporciona un vector y una célula huésped en la cual se introduce un nucleótido que codifica al péptido de la presente invención. Un vector de la presente invención puede ser de utilidad en el mantenimiento de un nucleótido, especialmente un ADN, de la presente invención en la célula huésped y así expresar al péptido de la presente invención o administrar el nucleótido de la presente invención como terapia genética.

Cuando *E. coli* es la célula huésped y el vector es ampliado y producido en una gran cantidad en *E. coli* (por ejemplo, JM109, DH5

000106

alfa, HB101 o XL1Blue), el vector debe tener "ori" para ser ampliado en *E. coli* y un gen marcador para la selección de la *E. coli* transformada (por ejemplo, un gen con resistencia farmacológica seleccionado con una droga tal como ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloramfenicol o similares). Por ejemplo, se puede utilizar los vectores de las series M13 y pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, etc. Adicionalmente, se puede igualmente utilizar pGEM-T, pDIRECT y pT7 en la subclonación y extracción del ADNc, al igual que los vectores anteriormente descritos. Cuando se utiliza un vector para producir la proteína de la presente invención, se puede utilizar un vector de expresión. Por ejemplo, un vector de expresión a ser expresado en *E. coli* debe tener las características que anteceden para ser ampliado en *E. coli*. Cuando se utiliza una *E. coli* tal como JM109, DH5 alfa, HB101 o XL1 Blue, como la célula huésped, el vector debe tener un promotor, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward y colaboradores, Naturaleza 341: 544-6 (1.989); FASEB J 6: 2.422-7 (1.992)), el promotor araB (Better y colaboradores, Ciencia 240: 1.041-3 (1.988)), el el promotor T7 o similares, que pueda eficientemente expresar al gen deseado en *E. coli*. En este sentido, se puede, por ejemplo, utilizar pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpres system" (Qiagen), pEGFP y pET (en este caso, el huésped preferiblemente es BL21, el cual expresa a la ARN polimerasa de T7), en lugar de los vectores que anteceden. Adicionalmente, el vector puede igualmente contener una secuencia de señal para la secreción del péptido. Un ejemplo de una secuencia de señales que dirige al péptido a ser secretado al periplasma de la *E. coli* es la secuencia de señales pelB (Lei y colaboradores, J Bacteriol 169: 4.379 (1.987)). Los medios para la

introducción de los vectores en las células huésped objetivo, por ejemplo, incluyen el método que utiliza cloruro de calcio y el método de electroporación.

Además de *E. coli*, se puede, por ejemplo, utilizar vectores
5 de expresión derivados de mamíferos (por ejemplo, pDNAC3
(Invitrogen) y pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5.322
(1.990)), pEF, pCDM8), vectores de expresión derivados de células
de insectos (por ejemplo, el sistema de expresión del baculovirus
"Bac-to-BAC" (GIBCO BRL), pBacPAK8), vectores de expresión
10 derivados de plantas (por ejemplo, pMH1, pMH2), vectores de
expresión derivados de virus animales (por ejemplo, pHSV, pMV,
pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (por
ejemplo, pZIpneo), un vector de expresión derivado de las
levaduras (por ejemplo, el Equipo de Expresión "Pichia"
15 (Invitrogen), pNV11, SP-Q01) y vectores de expresión derivados de
Bacillus subtilis (por ejemplo, pPL608, pKTH50), en la producción
del polipéptido de la presente invención.

Para poder expresar el vector en células animales tales
como las células CHO, COS o NIH3T3, el vector debe ser
20 portador de un promotor necesario para llevar a cabo su
expresión en estas células, por ejemplo, el promotor SV40
(Mulligan y colaboradores, Naturaleza 277: 108 (1.979)), el
promotor MMLV-LTR, el el promotor EF1 alfa (Mizushima y
colaboradores, Nucleic Acids Res 18: 5.322 (1.990)), el
25 promotor CMV y similares y preferiblemente de un gen marcador
para la selección de transformantes (por ejemplo, un gen con
resistencia farmacológica seleccionado con una droga (por
ejemplo, neomicina, G418)). Algunos ejemplos de vectores

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

Se incluyen los siguientes ejemplos con el propósito de ilustrar la presente invención y de ayudar a aquellos normalmente diestros en este arte a desarrollarla y utilizarla. No se prevé que los ejemplos de manera alguna limiten el alcance de la invención.

EJEMPLOS

10 Materiales y Métodos

Líneas celulares

Se adquirió T2 (HLA-A2), la línea de células humanas de B-linfoblastoide, y COS7, la línea de células renales del mono verde africano, de ATCC.

15

Selección de candidatos a partir de los péptidos derivados de ECT2

Se llevó a cabo el pronóstico de los péptidos 9-mer y 10-mer derivados de ECT2 que se acoplan a la molécula HLA-A*0201 utilizando el software de predicción del acoplamiento "BIMAS" (www-bimas.citdcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla_bindken_parker_comboform) (Parker y colaboradores. (J Immunol 1.994, 152(1): 163-75), Kuzushima y colaboradores. (Sangre 2.001, 98(6): 1.872-81)). Estos péptidos fueron sintetizados por Biosíntesis (Lewisville, Texas) de acuerdo con un método tradicional de síntesis en fase sólida y purificados por cromatografía líquida en fase inversa de alto rendimiento (HPLC). Se determinó la pureza (>90%) y la similitud de los

000109

péptidos por HPLC analítica y análisis espectrométrico de masas, respectivamente. Los péptidos fueron disueltos en sulfóxido de dimetilo a razón de 20 mg/ml y almacenados a una temperatura de -80 grados C.

5

Inducción in vitro de CTL

Se utilizaron células dendríticas derivadas de monocitos (DCs) como las células que presenta antígenos para inducir las respuestas de los linfocitos T citotóxicos (CTL) contra los péptidos presentes en el antígeno leucocitario humano (HLA). Las DCs fueron generadas *in vitro* conforme se describe en otra parte (Nakahara S y colaboradores, Cancer Res julio 15 de 2.003, 63(14): 4.112-8). Específicamente, se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) aisladas de un voluntario normal (HLA-A*0201 positivo) con la solución Ficoll-Plaque (Pharmacia) por adherencia a una placa plástica de cultivo tisular (Becton Dickinson), de forma tal de enriquecerlas como la fracción monocitaria. La población rica en monocitos fue cultivada en la presencia de 1.000 U/ml del factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos-macrófagos (R&D System) y de 1.000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D System) en Medio AIM-V (Invitrogen) contentivo de suero autólogo térmicamente inactivado (AS) al 2%. Luego de transcurridos 7 días de cultivo, las DCs inducidas con citocinas fueron cargadas con 20 micro-g/ml de cada uno de los péptidos sintetizados, en la presencia de 3 micro-g/ml de beta 2-microglobulina, durante un período de 3 horas y a una temperatura de 37 grados C, en Medio AIM-V. Las células

20

25

000110

generadas parecían expresar a las moléculas asociadas con las DCs tales como CD80, CD83, CD86 y HLA clase II, sobre sus superficies celulares (datos no ilustrados). Estas DCs cargadas con los péptidos fueron luego inactivadas por irradiación X (20 Gy) y mezcladas a razón de 1:20 con las células T autólogas CD8+, las cuales fueron obtenidas por selección positiva con el Equipo de Aislamiento CD8 Positivo (Dynal). Estos cultivos fueron colocados en placas de 48 compartimientos (Corning); cada compartimiento contenía $1,5 \times 10^4$ DCs cargadas con los péptidos, 3×10^5 células T CD8+ y 10 ng/ml de IL-7 (R&D System) en 0,5 ml de medio AIM-V/AS al 2%. Tres días más tarde, estos cultivos fueron complementados con IL-2 (CHIRON) a una concentración final de 20 IU/ml. En los días 7 y 14, las células T fueron además estimuladas con las DCs autólogas cargadas con los péptidos. En cada oportunidad, las DCs fueron preparadas de la misma manera anteriormente descrita. Se evaluaron los CTLs contra las células T2 cargadas con los péptidos luego de la 3ra ronda de estimulación con los péptidos del día 21 (Tanaka H y colaboradores, Br J Cancer enero 5 de 2.001, 84(1): 94-9; Umano Y y colaboradores, Br J Cancer abril 20 de 2.001, 84(8): 1.052-7; Uchida N y colaboradores, Clin Cancer Res diciembre 15 de 2.004, 10(24): 8.577-86; Suda T y colaboradores, Cancer Sci mayo 2.006, 97(5): 411-9; Watanabe T y colaboradores, Cancer Sci agosto 2005, 96(8): 498-506).

Procedimiento de Expansión de CTL

Los CTLs fueron expandidos en el cultivo utilizando un método similar a aquel descrito por Riddell y colaboradores.

(Walter EA y colaboradores, N Engl J Med octubre 19 1.995, 333(16): 1.038-44; Riddell SR y colaboradores, Nat Med Feb. 1.996, 2(2): 216-23). Se suspendió un total de 5×10^4 CTLs en 25 ml de medio AIM-V/AS al 5% con 2 tipos de líneas de células humanas de B-linfoblastoide, inactivadas con Mitomicina C, en la presencia de 40 ng/ml del anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingén). Un día luego de dar inicio a los cultivos, se añadieron 120 IU/ml de IL-2 a los cultivos. A los cultivos se les agregó medio AIM-V/AS al 5% fresco contentivo de 30 IU/ml de IL-2 en los días 5, 8 y 11 (Tanaka H y colaboradores, Br J Cancer enero 5 de 2.001, 84(1): 94-9; Umano Y y colaboradores, Br J Cancer abril 20 de 2.001, 84(8): 1.052-7; Uchida N y colaboradores, Clin Cancer Res diciembre 15 de 2.004, 10(24): 8.577-86; Suda T y colaboradores, Cancer Sci mayo 2.006, 97(5): 411-9; Watanabe T y colaboradores, Cancer Sci agosto 2.005, 96(8): 498-506).

Establecimiento de los clones CTL

Se prepararon diluciones que tuvieran 0,3, 1 y 3 CTLs/compartimiento en 96 placas de micro titulación de fondo curvo (Nalge Nunc International). Los CTLs fueron cultivados con 1×10^4 células/compartimiento de 2 tipos de líneas de células humanas de B-linfoblastoide, 30 ng/ml del anticuerpo anti-CD3 y 125 U/ml de IL-2 en un total de 150 micro-1/compartimiento de Medio AIM-V contentivo de AS al 5%. Se añadieron 50 μ l /compartimiento de IL-2 al medio 10 días más tarde para lograr una concentración final de 125 U/ml de IL-2. Se evaluó la actividad de CTL en el día 14 y los clones CTL fueron expandidos

utilizando el mismo método descrito con antelación (Uchida N y colaboradores, Clin Cancer Res diciembre 15 de 2.004, 10(24): 8.577-86; Suda T y colaboradores, Cancer Sci mayo 2.006, 97(5): 411-9; Watanabe T y colaboradores, Cancer Sci agosto 2.005, 96(8): 498-506).

Actividad CTL específica

Para evaluar la actividad CTL específica, se llevó a cabo un ensayo enzimático immunospot con interferón (IFN) (ELISPOT) y un ensayo de inmunoabsorción enzimática con IFN-gamma (ELISA). Específicamente, se prepararon células T2 cargadas con los péptidos (1×10^4 /compartimiento) como células estimuladoras. Se utilizaron las células cultivadas en 48 compartimientos como células respondedoras. Se llevaron a cabo los ensayos ELISPOT con IFN-gamma y ELISA con IFN-gamma de conformidad con el procedimiento del fabricante.

Establecimiento de las células que a la fuerza expresa a cualquiera o ambos del gen objetivo y HLA-A02

Se amplificó el marco de lectura abierta y codificación del ADNc de los genes objetivo o HLA-A*0201 por PCR. El producto amplificado por PCR fue clonado en un vector. Los plásmidos fueron transfectados en COS7, la línea de células de los genes objetivo y libre de HLA-A*0201, utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante. Luego de transcurridos 2 días de la transfección, las células transfectadas fueron cosechadas con versene (Invitrogen) y utilizadas como las células objetivo (5×10^4

células/ compartimiento) en la determinación de la actividad CTL.

Resultados

Expresión Incrementada de ECT2 en los cánceres

5 Los datos del perfil de expresión genética en su conjunto
obtenidos de diversos cánceres utilizando un micro-arreglo de
cADN revelan una elevación en la expresión de ECT2 (Acceso al
GenBank No. AY376439; por ejemplo, SEC ID No: 41). La expresión
de ECT2 estaba válidamente elevada en 17 de 19 cánceres
10 vesicales, 5 de 12 cánceres de mama, 14 de 14 cánceres
cervicales, 13 de 13 carcinomas colangiocelulares, 5 de 5 CML, 7
de 8 cánceres colorrectales, 12 de 16 cánceres esofágicos, 6 de
16 NSCLC, 8 de 10 linfomas, 1 de 1 cáncer pancreático, 10 de 13
cánceres prostáticos, 3 de 6 carcinomas renales y 12 de 13 SCLC
15 en comparación con el correspondiente tejido normal (Tabla 1).

Tabla 1

Índice de casos donde se observó una regulación en ascenso de
ECT2 en el tejido canceroso en comparación con el correspondiente
20 tejido normal.

Cáncer vesical	17/19
Cáncer de mama	5/12
Cáncer cervical	14/14
Carcinoma colangiocelular	13/13
CML	5/5
Cáncer colorrectal	7/8
Cáncer esofágico	12/16
NSCLC	6/16
Linfoma	8/10
Cáncer pancreático	1/1

000114

Cáncer prostático	10/13
Carcinoma renal	3/6
SCLC	12/13

Predicción de los péptidos derivados de ECT2 que se acoplan a HLA-A02

Las **Tablas 2a y 2b** ilustran a los péptidos 9mer y 10mer que se acoplan a HLA-A02 de ECT2 en el orden de alta afinidad de enlace. Se seleccionó y evaluó un total de 40 péptidos con posible capacidad de acoplamiento a HLA-A02 con la finalidad de identificar los péptidos epítopo.

Tabla 2a

Péptidos 9mer derivados de ECT2 que se acoplan a HLA-A02

SEC ID NO	Posición Inicial	Secuencia de Aminoácidos	Puntaje
1	34	LLIGSTSYV	650.311
2	619	QIFDVVYEV	333.677
3	664	FLFNDCLEI	177.566
4	662	TLFLFNDCL	147.174
5	634	LLSSHRSLV	118.238
6	145	MMNLVLCFT	115.74
7	561	LLIRPVQRL	83.527
8	98	VVTDFQDSV	78.982
9	575	LLNDLKKHT	51.94
10	240	FQDCILSFL	50.414
11	292	FEPSKKLYV	34.216
12	823	ALMTSHGSV	33.455
13	220	NEQDFYAAV	31.606
14	755	MLCRHVANT	29.137
15	357	AQLSRETDV	26.092
16	438	NILATIIQL	24.997
17	874	TLSRSTTHL	21.362

SEC ID NO	Posición Inicial	Secuencia de Aminoácidos	Puntaje
18	568	RLPSVALLL	21.362
19	166	TLVHHMGGV	20.796
20	443	IIQLFQVPL	18.975

La posición inicial indica el número de residuos de aminoácidos con respecto al extremo N de ECT2

El puntaje del acoplamiento se deriva de "BIMAS"

Tabla 2b Péptidos 10mer derivados de ECT2 que se acoplan a HLA-A02

SEC ID NO	Posición Inicial	Secuencia de Aminoácidos	Puntaje
21	33	NLLIgSTSYV	1.415,383
22	633	NLLSsHRSLV	257,342
23	144	SMMNlVLCFT	251,905
24	701	LMPLsQIKKV	196,407
25	754	KMLCrHVANT	160,303
26	557	SLVElLIRPV	131,175
27	191	TQGEkFRVAV	109,867
28	774	YTADpESFEV	105,669
29	428	ELYQtESNYV	91,809
30	618	KQIFdVVEV	56,767
31	97	FVVTdFQDSV	52,126
32	20	SIFDsKVTEI	50,051
33	574	LLLNdLKKHT	46,873
34	461	ILAPeEIKTI	40,792
35	664	FLFNdCLEIA	39,07
36	575	LLNDlKKHTA	34,627
37	430	YQTesNYVNI	29,924
38	511	DLVKtYPPFV	28,69
39	471	FGSIpDIFDV	27,86
40	87	GLDSpEFENV	25,901

La posición inicial indica el número de residuos de

SEC ID NO	Posición Inicial	Secuencia de Aminoácidos	Puntaje
-----------	---------------------	--------------------------------	---------

aminoácidos con respecto al extremo N de ECT2

El puntaje del acoplamiento se deriva de "BIMAS"

Inducción de CTL con los péptidos pronosticados de ECT2 restringidos con HLA-A*0201

5 Se generaron los CTLs de los péptidos derivados de ECT2 de acuerdo con los protocolos descritos en "Materiales y Métodos". Se determinó la actividad CTL específica de los péptidos de conformidad con un ensayo ELISPOT con IFN-gamma (**Figuras 1a-c**). El compartimiento número #6 estimulado con ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1) (a), el compartimiento #5 estimulado con ECT2-A02-9-664 (SEC ID NO: 3) (b) y el compartimiento #1 estimulado con ECT2-A02-10-33 (SEC ID NO: 21) (c) demostraron tener una potente producción de IFN-gamma en comparación con los compartimientos de control. En consecuencia, lo anterior es indicativo que ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1) (a), ECT2-A02-9-664 (SEC ID NO: 3) (b) y ECT2-A02-10-33 (SEC ID NO: 21) (c) derivado de ECT2 son los péptidos que pudiesen inducir a CTLs potentes.

20 **Establecimiento de las líneas de CTL y clones contra los péptidos derivados de ECT2**

Las células que presentaron una actividad CTL específica del péptido detectada de conformidad con el ensayo ELISPOT con IFN-gamma en el compartimiento número #6 estimulado con ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1) (a), #5 estimulado con ECT2-A02-9-664 (SEC ID NO: 3) (b) y #1 estimulado con ECT2-A02-10-33 (SEC ID NO: 21) (c)

fueron expandidas y se establecieron líneas de CTL de conformidad con el proceso limitado de dilución anteriormente descrito en la sección "Materiales y Métodos". Se determinó la actividad CTL de estas líneas de CTL de conformidad con el ensayo ELISA con IFN-
5 gamma (**Figuras 2a-c**). Las líneas de CTL demostraron tener una potente producción de IFN-gamma contra las células objetivo cargadas con el correspondiente péptido, en comparación con las células objetivo sin carga peptídica. Adicionalmente, se establecieron clones CTL mediante la limitación de la dilución de
10 las líneas de CTL conforme se describe en "Materiales y Métodos" y se determinó la producción de IFN-gamma de los clones CTL contra las células objetivo cargadas con los péptidos de conformidad con un ensayo ELISA con IFN-gamma. Se observaron potentes producciones de IFN-gamma en los clones CTL estimulados
15 con ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1) (a) y ECT2-A02-9-664 (SEC ID NO: 3) (b) en la **Figura 3**.

Actividad CTL específica contra las células objetivo que exógenamente expresan a ECT2 y HLA-A*0201

Se evaluó la capacidad que tienen las líneas de CTL y clones
20 establecidos contra estos péptidos de reconocer a las células objetivo que exógenamente expresan a ECT2 y la molécula HLA-A*0201. Se evaluó la actividad CTL específica contra las células COS7 transfectadas con tanto la longitud total de ECT2 como el gen de la molécula HLA-A*0201 (un modelo específico de las
25 células objetivo que exógenamente expresan a ECT2 y el gen HLA-A*0201), utilizando las líneas de CTL y clones contra el correspondiente péptido como células efectoras. Se prepararon células COS7 transfectadas con la longitud total de ECT2 o HLA-A*

0201 como controles. En la **Figura 4**, el clon CTL estimulado con ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1) (a) y la línea CTL estimulada con ECT2-A02-10-33 (SEC ID NO: 21) (b) demuestran tener una potente actividad CTL contra las células COS7 que expresan a tanto ECT2 como HLA- A* 0201. Por otro lado, no se detectó actividad CTL específica significativa alguna contra los controles. En consecuencia, estos datos claramente demuestran que ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1) (a), ECT2-A02-10-33 (SEC ID NO: 21) (b) se expresan naturalmente en las células objetivo con la molécula HLA-A*0201 y son reconocidos por los CTLs. Estos resultados indican que ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1) (a) y ECT2-A02-10-33 (SEC ID NO: 21) (b) derivados de ECT2 pudiesen ser utilizados como una vacuna anticancerosa en el tratamiento de los pacientes con tumores que expresan a ECT2.

Análisis de la homología de los péptidos antigénicos

Los CTLs estimulados con ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1), ECT2-A02-9-664 (SEC ID NO: 3) y ECT2-A02-10-33 (SEC ID NO: 21) demostraron tener una actividad CTL significativa y específica. Este resultado puede deberse al hecho que la secuencia de ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1), ECT2-A02-9-664 (SEC ID NO: 3) y ECT2-A02-10-33 (SEC ID NO: 21) es homóloga a la del péptido derivado de otras moléculas que se sabe sensibilizan al sistema inmunológico humano. Para excluir esta posibilidad, se llevaron a cabo análisis de la homología con estas secuencias de péptidos utilizando como interrogante el algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi), el cual no reveló secuencia alguna con una homología significativa. Los resultados

de los análisis de la homología indican que la secuencia de ECT2-A02-9-34 (SEC ID NO: 1), ECT2-A02-9-664 (SEC ID NO: 3) y ECT2-A02-10-33 (SEC ID NO: 21) es única y que, por ende, a nuestro mejor saber y entender, es poco probable que estas moléculas
5 conlleven a una respuesta inmunológica no intencional a algunas molécula no relacionadas.

En conclusión, se identificaron novedosos péptidos epítipo HLA-A2 derivados de ECT2. Adicionalmente, los resultados demuestran que los péptidos epítipo de ECT2 pueden ser utilizados
10 en la inmunoterapia del cáncer.

Aplicabilidad Industrial

La presente invención proporciona nuevos TAAs, en particular aquellos derivados de ECT2 que pueden inducir respuestas
15 inmunológicas anti-tumorales potentes y específicas y que tienen aplicabilidad en una amplia variedad de tipos de cáncer. Estos TAAs pueden ser de utilidad como vacunas peptídicas contra las enfermedades asociadas con ECT2, por ejemplo, el cáncer, más particularmente, el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer
20 cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer pancreático, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC.

Aun cuando aquí se describe en detalle la presente invención
25 haciendo referencia a sus aplicaciones específicas, se entenderá que la descripción que antecede es ilustrativa y de naturaleza explicativa y que se prevé que ilustre la presente invención y sus aplicaciones preferentes. A través de la experimentación de

rutina, aquellos con experiencia en este arte fácilmente apreciarán que se puede efectuar diversos cambios y modificaciones sin alejarse del espíritu y alcance de la presente invención, cuyos objetivos y límites son definidos por las
5 reivindicaciones adjuntas.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en
10 las siguientes:

000121

REIVINDICACIONES

1. Se reivindica un péptido aislado constituido por la
secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 42 o un fragmento
5 inmunológicamente activo del mismo, donde dicho péptido se acopla
a un antígeno HLA e induce a los linfocitos T citotóxicos (CTLs).

2. El péptido aislado de la reivindicación 1, donde el
antígeno HLA es HLA-A2.

3. El péptido aislado de la reivindicación 1 ó 2, donde
10 dicho péptido incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada a
partir del grupo constituido por las SEC ID NO: 1 a 40.

4. Un péptido aislado seleccionado a partir del grupo
constituido por:

(a) un péptido aislado que se acopla a un antígeno HLA e
15 induce a los linfocitos T citotóxicos (CTL) y que está
constituido por la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 42 o
un fragmento inmunológicamente activo del mismo,

(b) el péptido aislado de (a), donde el antígeno HLA es HLA-
A2,

20 (c) el péptido aislado de (a) o (b), el cual incluye una
secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo
constituido por las SEC ID NO: 1 a 40, y

(d) el péptido aislado de (a) o (b), el cual está
constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada a
25 partir del grupo constituido por las SEC ID NO: 1 a 40, donde 1,
2 o varios aminoácidos son sustituidos, eliminados, insertados o
añadidos, siempre que dicho péptido modificado conserve la
capacidad de inducción de los CTL del péptido original.

000122

5. El péptido aislado de la reivindicación 4, el cual está constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEC ID NO: 1 a 40, donde el péptido presenta una o ambas de las siguientes características:

5 (a) el segundo aminoácido del extremo N es seleccionado a partir del grupo constituido por leucina o metionina; y

(b) el aminoácido C-terminal es seleccionado a partir del grupo constituido por valina o leucina.

6. El péptido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 10 1 a 5, donde dicho péptido es un nonapéptido o un decapeptido.

7. Un polinucleótido aislado que codifica al péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Una composición para la inducción de CTL, composición ésta que incluye uno o más péptidos de cualquiera de las 15 reivindicaciones 1 a 6 o uno o más de los polinucleótidos de la reivindicación 7.

9. Una composición farmacéutica para el tratamiento y/o profilaxis y/o la prevención de la recurrencia post-operatoria del cáncer, composición ésta que incluye uno o más péptidos de 20 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o uno o más de los polinucleótidos de la reivindicación 7.

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, composición ésta que es formulada para ser administrada a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A2.

25 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 9 ó 10, composición ésta que es formulada para el tratamiento del cáncer.

12. Un método para la inducción de una célula presentadora de antígeno (APC) con capacidad de inducción de los CTL que

incluye un paso seleccionado a partir del grupo constituido por:

(a) el contacto de una APC con un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, y

(b) la introducción de un polinucleótido que codifique al péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en una APC.

13. Un método para la inducción de CTL de conformidad con un método que incluye un paso seleccionado a partir del grupo constituido por:

(a) el cultivo simultáneo de las células T CD8-positivas con las APCs que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;

(b) el cultivo simultáneo de las células T CD8-positivas con exosomas que presentan sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y

(c) la introducción de un gen que incluye un polinucleótido que codifica a un polipéptido de la subunidad de los receptores de células T (TCR) acoplado a un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en una célula T.

14. Una APC aislada que presenta sobre su superficie un complejo de un antígeno HLA y el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

15. La APC de la reivindicación 14, la cual es inducida de conformidad con el método de la reivindicación 12.

16. Un CTL aislado cuyo objetivo es cualquiera de los péptidos de las reivindicaciones 1 a 6.

17. El CTL de la reivindicación 16, el cual es inducido de

000124

conformidad con el método de la reivindicación 13.

18. Un método para la inducción de una respuesta inmunológica contra el cáncer en un sujeto que así lo requiere, método éste que incluye el paso que consiste en administrarle al
5 sujeto una composición que incluye un péptido de las reivindicaciones 1 a 6, un fragmento inmunológicamente activo del mismo o un polinucleótido que codifique al péptido o al fragmento.

19. Un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo
10 del mismo contra cualquiera de los péptidos de las reivindicaciones 1 a 6.

20. Un vector que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica a cualquiera de los péptidos de las reivindicaciones 1 a 6.

15 21. Un equipo de diagnóstico que incluye cualquiera de los péptidos de las reivindicaciones 1 a 6, el nucleótido de la reivindicación 7 o el anticuerpo de la reivindicación 19.

22. El péptido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el péptido codificado por el polinucleótido de la
20 reivindicación 7, donde el péptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEC ID No: 1, 3 y 21.

000125

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen péptidos aislados derivados de la SEC ID NO: 42 y sus fragmentos que se acoplan a un antígeno HLA e inducen a los linfocitos T citotóxicos (CTL) y que por ende pueden ser utilizados en el contexto de la inmunoterapia del cáncer, más particularmente en las vacunas anticancerosas. Los péptidos de la invención incluyen tanto las secuencias de aminoácidos citadas con anterioridad como sus versiones modificadas en las cuales uno, dos o varios aminoácidos son sustituidos, eliminados, insertados o añadidos, siempre que estas versiones modificadas conserven la necesaria capacidad de acoplamiento a HLA y/o de inducción de los CTL de las secuencias originales. Además se proporcionan ácidos nucleicos que codifican a cualquiera de los péptidos mencionados con anterioridad, al igual que agentes, sustancias y/o composiciones farmacéuticas que incluyen o incorporan cualquiera de los péptidos o ácidos nucleicos mencionados con anterioridad. Los péptidos, ácidos nucleicos, agentes farmacéuticos, sustancias y composiciones de la presente invención encuentran particular utilidad en el tratamiento de los cánceres y tumores, lo que, por ejemplo, incluye el cáncer vesical, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el carcinoma colangiocelular, la CML, el cáncer colorrectal, el cáncer esofágico, el NSCLC, el linfoma, el cáncer pancreático, el cáncer de próstata, el carcinoma renal y el SCLC.

000126

ECT2-A02-9-34

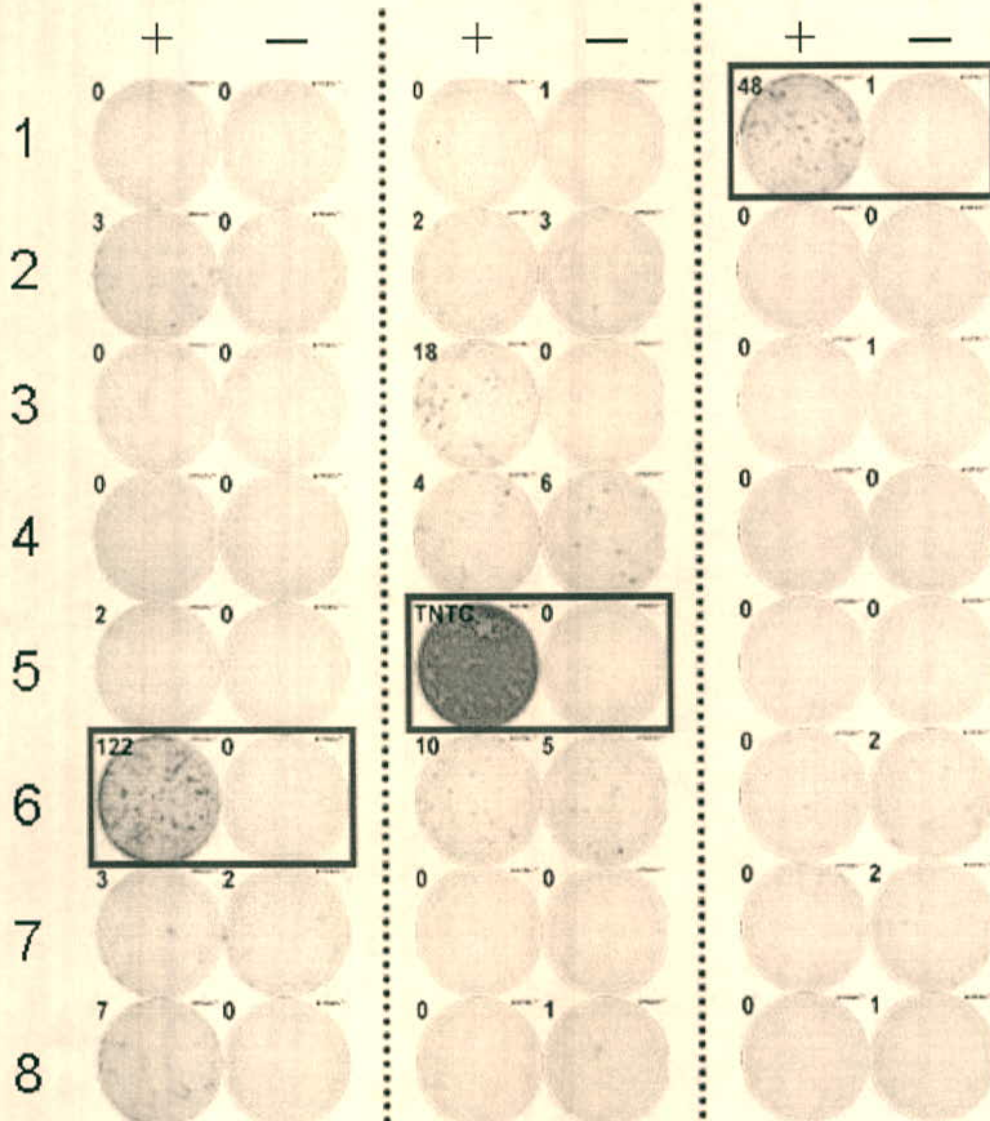
ECT2-A02-9-664

ECT2-A02-10-33

Figura 1a

Figura 1b

Figura 1c



000127

Figura 2a

ECT2-A02-0-34 #6

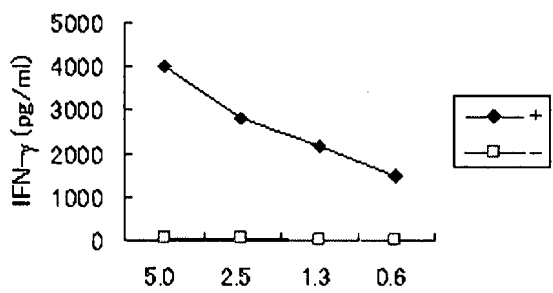


Figura 2b

ECT2-A02-9-664 #5

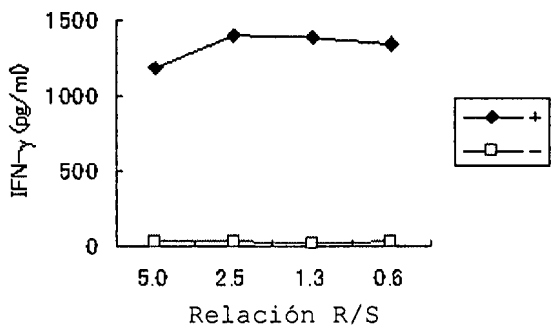


Figura 2c

ECT2-A02-10-33 #1

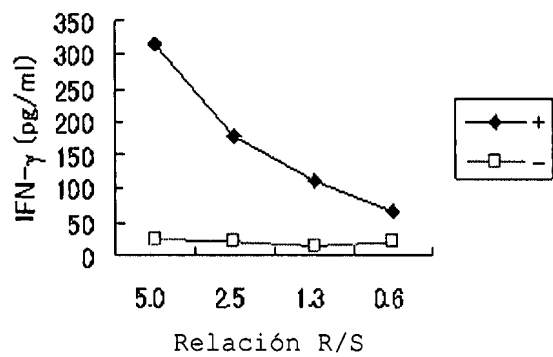


Figura 3a

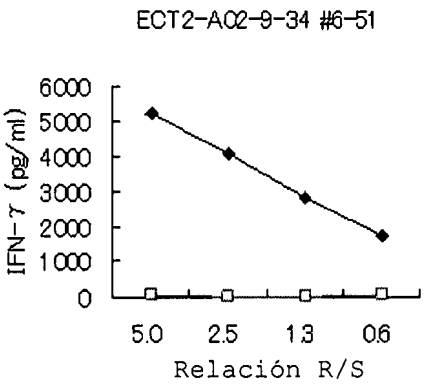


Figura 3b

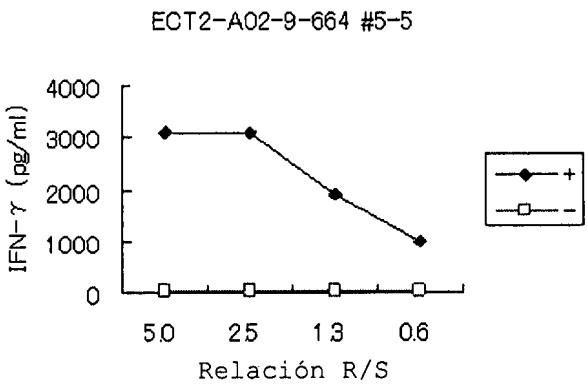


Figura 4a

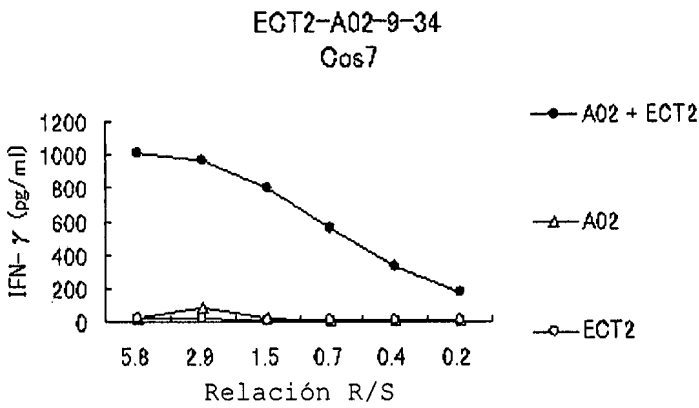
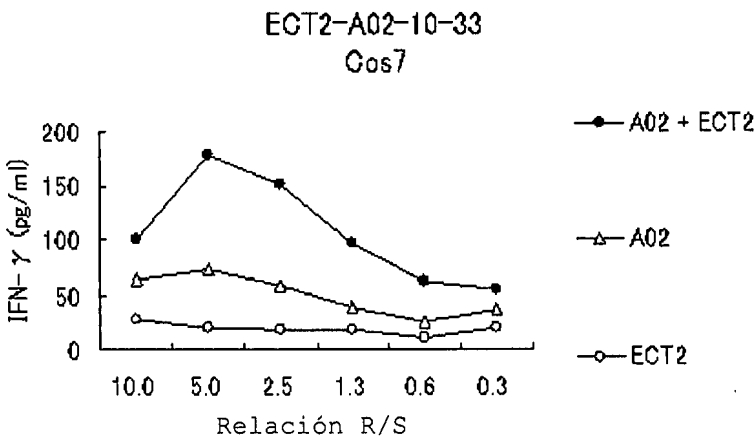


Figura 4b



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> PÉPTIDOS ECT2 Y VACUNAS QUE LOS INCLUYEN

<130> ONC-A1010P

<150> US 61/320,577

<151> 2010-04-02

<160> 46

<170> Patente En versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 1

Leu Leu Ile Gly Ser Thr Ser Tyr Val

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 2

Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr Glu Val

1

5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 3

Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile

1

5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

000130

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente
 <400> 4

Thr Leu Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente
 <400> 5

Leu Leu Ser Ser His Arg Ser Leu Val
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente
 <400> 6

Met Met Asn Leu Val Leu Cys Phe Thr
 1 5

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

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente
 <400> 7

Leu Leu Ile Arg Pro Val Gln Arg Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente
 <400> 8

000131

Val Val Thr Asp Phe Gln Asp Ser Val
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 9

Leu Leu Asn Asp Leu Lys Lys His Thr
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 10

Phe Gln Asp Cys Ile Leu Ser Phe Leu
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 11

Phe Glu Pro Ser Lys Lys Leu Tyr Val
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 12

Ala Leu Met Thr Ser His Gly Ser Val
1 5

000132

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente
 <400> 13

Asn Glu Gln Asp Phe Tyr Ala Ala Val
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente
 <400> 14

Met Leu Cys Arg His Val Ala Asn Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente
 <400> 15

Ala Gln Leu Ser Arg Glu Thr Asp Val
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente
 <400> 16

Asn Ile Leu Ala Thr Ile Ile Gln Leu
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

000133

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 17

Thr Leu Ser Arg Ser Thr Thr His Leu
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 18

Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Leu Leu
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 19

Thr Leu Val His His Met Gly Gly Val
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 20

Ile Ile Gln Leu Phe Gln Val Pro Leu
1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 21

000134

Asn Leu Leu Ile Gly Ser Thr Ser Tyr Val
 1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 22

Asn Leu Leu Ser Ser His Arg Ser Leu Val
 1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 23

Ser Met Met Asn Leu Val Leu Cys Phe Thr
 1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 24

Leu Met Pro Leu Ser Gln Ile Lys Lys Val
 1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 25

Lys Met Leu Cys Arg His Val Ala Asn Thr
 1 5 10

<210> 26

000135

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 26

Ser Leu Val Glu Leu Leu Ile Arg Pro Val
 1 5 10

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 27

Thr Gln Gly Glu Lys Phe Arg Val Ala Val
 1 5 10

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 28

Tyr Thr Ala Asp Pro Glu Ser Phe Glu Val
 1 5 10

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ELYQtESNYV

<400> 29

Glu Leu Tyr Gln Thr Glu Ser Asn Tyr Val
 1 5 10

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente 000136

<400> 30

Lys Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr Glu Val
1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 31

Phe Val Val Thr Asp Phe Gln Asp Ser Val
1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 32

Ser Ile Phe Asp Ser Lys Val Thr Glu Ile
1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 33

Leu Leu Leu Asn Asp Leu Lys Lys His Thr
1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 34

Ile Leu Ala Pro Glu Glu Ile Lys Thr Ile

000137

1 5 10

<210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 35

Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile Ala
 1 5 10

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 36
 Leu Leu Asn Asp Leu Lys Lys His Thr Ala
 1 5 10

<210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 37

Tyr Gln Thr Glu Ser Asn Tyr Val Asn Ile
 1 5 10

<210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 38

Asp Leu Val Lys Thr Tyr Pro Pro Phe Val
 1 5 10

<210> 39
 <211> 10
 <212> PRT

000138

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 39

Phe	Gly	Ser	Ile	Pro	Asp	Ile	Phe	Asp	Val
1				5					10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptidos sintetizada artificialmente

<400> 40

Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Glu	Phe	Glu	Asn	Val
1				5					10

<210> 41

<211> 4349

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 41

tttttgaatc	ggttggtggcg	gccgcggcga	ggaatggcgg	tatttgtgag	aggagtcggc
60					

gtttgaagag	gtggaactcc	tagggctttt	ttgagagtga	cggagtctac	ctcttggttac
120					

ctagactgga	gtgcagtggc	acgatctcgg	ctcactgcaa	cctctgcctc	ccgggttcaa
180					

gcgattctcc	tgcctcagcc	tcctgagtag	ctgggattac	aggtgcctgc	caccaagccc
240					

agctaatttt	tgtattttta	gtagagatgg	ggtttcattg	tgttggccag	gctgggtctcg
300					

aactcctgac	ctcgtgatcc	gccgccttg	gcctcccaaa	gtgctaggat	tacaagtgtg
360					

agccaccgcg	tccggccttt	caaatggtat	ttttgatttt	cctcttccag	tccttaaagc
420					

agctgattta	gaagaataca	aatcatggct	gaaaatagtg	tattaacatc	cactactggg
480					

aggactagct	tggcagactc	ttccattttt	gattctaaag	ttactgagat	ttccaaggaa
540					

aacttactta	ttggatctac	ttcatatgta	gaagagatgc	ctcagattga	aacaagagtg
600					

000139

atattggttc 660	aagaagctgg	aaaacaagaa	gaacttataa	aagccttaaa	ggacattaaa
gtgggctttg 720	taaagatgga	gtcagtggaa	gaatttgaag	gtttggattc	tccggaattt
gaaaatgtat 780	ttgtagtcac	ggactttcag	gattctgtct	ttaatgacct	ctacaaggct
gattgtagag 840	ttattggacc	accagttgta	ttaaattggt	cacaaaaagg	agagcctttg
ccattttcat 900	gtcgcccgtt	gtattgtaca	agtatgatga	atctagtact	atgctttact
ggatttagga 960	aaaaagaaga	actagtcagg	ttggtgacat	tgggccatca	catgggtgga
gttattcgaa 1020	aagactttaa	ttcaaaagtt	acacatttgg	tggcaaattg	tacacaagga
gaaaaattca 1080	gggttgctgt	gagtctaggt	actccaatta	tgaagccaga	atggatttat
aaagcttggg 1140	aaaggcggaa	tgaacaggat	ttctatgcag	cagttgatga	ctttagaaat
gaatttaaag 1200	ttcctccatt	tcaagattgt	attttaagtt	tcctgggatt	ttcagatgaa
gagaaaacca 1260	atatggaaga	aatgactgaa	atgcaaggag	gtaaatatat	accgcttgga
gatgaaagat 1320	gcactcacct	tgtagttgaa	gagaatatag	taaaagatct	tccctttgaa
ccttcaaaga 1380	aactttatgt	tgtcaagcaa	gagtggttct	ggggaagcat	tcaaattgat
gcccagagctg 1440	gagaaactat	gtatttatat	gaaaaggcaa	atactcctga	gctcaagaaa
tcagtgtcaa 1500	tgctttctct	aaatacccct	aacagcaatc	gcaaacgacg	tcgtttaaaa
gaaacacttg 1560	ctcagctttc	aagagagaca	gacgtgtcac	catttccacc	ccgtaagcgc
ccatcagctg 1620	agcattccct	ttccataggg	tcactcctag	atatctccaa	cacaccagag
tctagcatta 1680	actatggaga	caccccaaag	tcttgtacta	agtcttctaa	aagctccact
ccagttcctt 1740	caaagcagtc	agcaaggtgg	caagttgcaa	aagagcttta	tcaaactgaa
agtaattatg 1800	ttaatatatt	ggcaacaatt	attcagttat	ttcaagtacc	attggaagag
gaaggacaac	gtggtggacc	tatccttgca	ccagaggaga	ttaagactat	ttttggtagc

000140

1860

atcccagata	tctttgatgt	acacactaag	ataaaggatg	atcttgaaga	ccttatagtt
1920					

aattgggatg	agagcaaaag	cattggtgac	atTTTTctga	aatattcaaa	agatttggtgta
1980					

aaaacctacc	ctccctttgt	aaacttcttt	gaaatgagca	aggaaacaat	tattaaatgt
2040					

gaaaaacaga	aaccaagatt	tcatgctttt	ctcaagataa	accaagcaaa	accagaatgt
2100					

ggacggcaga	gccttggtga	acttcttatac	cgaccagtac	agaggttacc	cagtgttgca
2160					

ttacttttaa	atgatcttaa	gaagcataca	gctgatgaaa	atccagacaa	aagcacttta
2220					

gaaaaagcta	ttggatcact	gaaggaagta	atgacgcata	ttaatgagga	taagagaaaa
2280					

acagaagctc	aaaagcaaat	ttttgatggt	gtttatgaag	tagatggatg	cccagctaata
2340					

cttttatctt	ctcaccgaag	cttagtacag	cggttgaaa	caatttctct	aggtgagcac
2400					

ccctgtgaca	gaggagaaca	agtaactctc	ttcctcttca	atgattgcct	agagatagca
2460					

agaaaacggc	acaaggttat	tggcactttt	aggagtcctc	atggccaaac	ccgaccccca
2520					

gcttctctta	agcatattca	cctaatgcct	cttctcaga	ttaagaaggt	attggacata
2580					

agagagacag	aagattgcca	taatgctttt	gccttgcttg	tgaggccacc	aacagagcag
2640					

gcaaattgtgc	tactcagttt	ccagatgaca	tcagatgaac	ttccaaaaga	aaactggcta
2700					

aagatgctgt	gtcgacatgt	agctaacacc	atgtgtaaag	cagatgctga	gaatcttatt
2760					

tatactgctg	atccagaatc	ctttgaagta	aatacaaaaag	atatggacag	tacattgagt
2820					

agagcatcaa	gagcaataaa	aaagacttca	aaaaaggtta	caagagcatt	ctctttctcc
2880					

aaaactccaa	aaagagctct	tcgaagggtc	cttatgacat	cccacggctc	agtggaggga
2940					

agaagtcctt	ccagcaatga	taagcatgta	atgagtcgtc	tttctagcac	atcatcatta
3000					

gcaggtatcc	cttctccctc	ccttgctcagc	cttcttctct	tctttgaaag	gagaagtcata
3060					

000141

acgttaagta 3120	gatctacaac	tcatttgata	tgaagcgtta	ccaaaatctt	aaattataga
aatgtataga 3180	cacctcatac	tcaaataaga	aactgactta	aatggtactt	gtaattagca
cgttggtgaa 3240	agctggaagg	aagataaata	acactaaact	atgctatttg	atttttcttc
ttgaaagagt 3300	aagggtttacc	tgttacattt	tcaagttaat	tcatgtaaaa	aatgatagtg
attttgatgt 3360	aatttatctc	ttgtttgaat	ctgtcattca	aaggccaata	atttaagttg
ctatcagctg 3420	atattagtag	ctttgcaacc	ctgatagagt	aaataaat	tatgggtggg
tgccaaatac 3480	tgctgtgaat	ctatttgtat	agtatccatg	aatgaattta	tggaataga
tatttgtgca 3540	gctcaattta	tgcaagagatt	aaatgacatc	ataatactgg	atgaaaactt
gcatagaatt 3600	ctgattaaat	agtgggtctg	ttcacatgt	gcagtttgaa	gtatttaa
aaccactcct 3660	ttcacagttt	attttcttct	caagcgtttt	caagatctag	catgtggatt
ttaaaagatt 3720	tgccctcatt	aacaagaata	acatttaaag	gagattgttt	caaaatattt
ttgcaaattg 3780	agataaggac	agaaagattg	agaaacattg	tatatatttgc	aaaaacaaga
tgtttgtagc 3840	tgtttcagag	agagtacggg	atatttatgg	taattttatc	cactagcaaa
tcttgattta 3900	gtttgatagt	cgtcgtcgga	attttatttt	gaaggataag	accatgggaa
aattgtggta 3960	aagactgttt	gtacccttca	tgaaataatt	ctgaagttgc	catcagtttt
actaatcttc 4020	tgtgaaatgc	atagatatgc	gcatgttcaa	ctttttattg	tggtcttata
attaaatgta 4080	aaattgaaaa	ttcatttgct	gtttcaaagt	gtgatatctt	tcacaatagc
ctttttatag 4140	tcagtaattc	agaataatca	agttcatatg	gataaatgca	tttttatttc
ctatttcttt 4200	agggagtgc	acaaatgttt	gtcacttaaa	tttcaagttt	ctgtttta
agttaactga 4260	ctatagattg	ttttctatgc	catgtatgtg	ccacttctga	gagtagtaaa

000142

tgactctttg ctacatttta aaagcaattg tattagtaag aactttgtaa ataaatacct
4320

aaaacccaag tgtaaaaaaa aaaaaaaaaa
4349

<210> 42
<211> 882
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Ala Glu Asn Ser Val Leu Thr Ser Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu
1 5 10 15

Ala Asp Ser Ser Ile Phe Asp Ser Lys Val Thr Glu Ile Ser Lys Glu
20 25 30

Asn Leu Leu Ile Gly Ser Thr Ser Tyr Val Glu Glu Met Pro Gln Ile
35 40 45

Glu Thr Arg Val Ile Leu Val Gln Glu Ala Gly Lys Gln Glu Glu Leu
50 55 60

Ile Lys Ala Leu Lys Asp Ile Lys Val Gly Phe Val Lys Met Glu Ser
65 70 75 80

Val Glu Glu Phe Glu Gly Leu Asp Ser Pro Glu Phe Glu Asn Val Phe
85 90 95

Val Val Thr Asp Phe Gln Asp Ser Val Phe Asn Asp Leu Tyr Lys Ala
100 105 110

Asp Cys Arg Val Ile Gly Pro Pro Val Val Leu Asn Cys Ser Gln Lys
115 120 125

Gly Glu Pro Leu Pro Phe Ser Cys Arg Pro Leu Tyr Cys Thr Ser Met
130 135 140

Met Asn Leu Val Leu Cys Phe Thr Gly Phe Arg Lys Lys Glu Glu Leu
145 150 155 160

Val Arg Leu Val Thr Leu Val His His Met Gly Gly Val Ile Arg Lys
165 170 175

Asp Phe Asn Ser Lys Val Thr His Leu Val Ala Asn Cys Thr Gln Gly
180 185 190

000143

Glu Lys Phe Arg Val Ala Val Ser Leu Gly Thr Pro Ile Met Lys Pro
 195 200 205

Glu Trp Ile Tyr Lys Ala Trp Glu Arg Arg Asn Glu Gln Asp Phe Tyr
 210 215 220

Ala Ala Val Asp Asp Phe Arg Asn Glu Phe Lys Val Pro Pro Phe Gln
 225 230 235 240

Asp Cys Ile Leu Ser Phe Leu Gly Phe Ser Asp Glu Glu Lys Thr Asn
 245 250 255

Met Glu Glu Met Thr Glu Met Gln Gly Gly Lys Tyr Leu Pro Leu Gly
 260 265 270

Asp Glu Arg Cys Thr His Leu Val Val Glu Glu Asn Ile Val Lys Asp
 275 280 285

Leu Pro Phe Glu Pro Ser Lys Lys Leu Tyr Val Val Lys Gln Glu Trp
 290 295 300

Phe Trp Gly Ser Ile Gln Met Asp Ala Arg Ala Gly Glu Thr Met Tyr
 305 310 315 320

Leu Tyr Glu Lys Ala Asn Thr Pro Glu Leu Lys Lys Ser Val Ser Met
 325 330 335

Leu Ser Leu Asn Thr Pro Asn Ser Asn Arg Lys Arg Arg Arg Leu Lys
 340 345 350

Glu Thr Leu Ala Gln Leu Ser Arg Glu Thr Asp Val Ser Pro Phe Pro
 355 360 365

Pro Arg Lys Arg Pro Ser Ala Glu His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Leu
 370 375 380

Leu Asp Ile Ser Asn Thr Pro Glu Ser Ser Ile Asn Tyr Gly Asp Thr
 385 390 395 400

Pro Lys Ser Cys Thr Lys Ser Ser Lys Ser Ser Thr Pro Val Pro Ser
 405 410 415

Lys Gln Ser Ala Arg Trp Gln Val Ala Lys Glu Leu Tyr Gln Thr Glu
 420 425 430

000144

Ser Asn Tyr Val Asn Ile Leu Ala Thr Ile Ile Gln Leu Phe Gln Val
 435 440 445

Pro Leu Glu Glu Glu Gly Gln Arg Gly Gly Pro Ile Leu Ala Pro Glu
 450 455 460

Glu Ile Lys Thr Ile Phe Gly Ser Ile Pro Asp Ile Phe Asp Val His
 465 470 475 480

Thr Lys Ile Lys Asp Asp Leu Glu Asp Leu Ile Val Asn Trp Asp Glu
 485 490 495

Ser Lys Ser Ile Gly Asp Ile Phe Leu Lys Tyr Ser Lys Asp Leu Val
 500 505 510

Lys Thr Tyr Pro Pro Phe Val Asn Phe Phe Glu Met Ser Lys Glu Thr
 515 520 525

Ile Ile Lys Cys Glu Lys Gln Lys Pro Arg Phe His Ala Phe Leu Lys
 530 535 540

Ile Asn Gln Ala Lys Pro Glu Cys Gly Arg Gln Ser Leu Val Glu Leu
 545 550 555 560

Leu Ile Arg Pro Val Gln Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Leu Leu Asn
 565 570 575

Asp Leu Lys Lys His Thr Ala Asp Glu Asn Pro Asp Lys Ser Thr Leu
 580 585 590

Glu Lys Ala Ile Gly Ser Leu Lys Glu Val Met Thr His Ile Asn Glu
 595 600 605

Asp Lys Arg Lys Thr Glu Ala Gln Lys Gln Ile Phe Asp Val Val Tyr
 610 615 620

Glu Val Asp Gly Cys Pro Ala Asn Leu Leu Ser Ser His Arg Ser Leu
 625 630 635 640

Val Gln Arg Val Glu Thr Ile Ser Leu Gly Glu His Pro Cys Asp Arg
 645 650 655

Gly Glu Gln Val Thr Leu Phe Leu Phe Asn Asp Cys Leu Glu Ile Ala
 660 665 670

000145

Arg Lys Arg His Lys Val Ile Gly Thr Phe Arg Ser Pro His Gly Gln
 675 680 685

Thr Arg Pro Pro Ala Ser Leu Lys His Ile His Leu Met Pro Leu Ser
 690 695 700

Gln Ile Lys Lys Val Leu Asp Ile Arg Glu Thr Glu Asp Cys His Asn
 705 710 715 720

Ala Phe Ala Leu Leu Val Arg Pro Pro Thr Glu Gln Ala Asn Val Leu
 725 730 735

Leu Ser Phe Gln Met Thr Ser Asp Glu Leu Pro Lys Glu Asn Trp Leu
 740 745 750

Lys Met Leu Cys Arg His Val Ala Asn Thr Ile Cys Lys Ala Asp Ala
 755 760 765

Glu Asn Leu Ile Tyr Thr Ala Asp Pro Glu Ser Phe Glu Val Asn Thr
 770 775 780

Lys Asp Met Asp Ser Thr Leu Ser Arg Ala Ser Arg Ala Ile Lys Lys
 785 790 795 800

Thr Ser Lys Lys Val Thr Arg Ala Phe Ser Phe Ser Lys Thr Pro Lys
 805 810 815

Arg Ala Leu Arg Arg Ala Leu Met Thr Ser His Gly Ser Val Glu Gly
 820 825 830

Arg Ser Pro Ser Ser Asn Asp Lys His Val Met Ser Arg Leu Ser Ser
 835 840 845

Thr Ser Ser Leu Ala Gly Ile Pro Ser Pro Ser Leu Val Ser Leu Pro
 850 855 860

Ser Phe Phe Glu Arg Arg Ser His Thr Leu Ser Arg Ser Thr Thr His
 865 870 875 880

Leu Ile

<210> 43
 <211> 22
 <212> ADN

000146

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 43

gtctaccagg

22

cattcgcttc

at

<210> 44

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 44

tcagctggac

24

cacagccgca

gcgt

<210> 45

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 45

tcagaaatcc

21

tttctcttga

c

<210> 46

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 46

ctagcctctg

24

gaatcctttc

tctt

000147

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 October 2011 (06.10.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/122022 A1

(51) International Patent Classification:
C12N 15/09 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/JP2011/001909

(22) International Filing Date:

30 March 2011 (30.03.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/320,577

2 April 2010 (02.04.2010)

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): 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). OHSAWA, Ryuji [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 2130012 (JP). YOSHIMURA, Sachiko [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa, 2130012 (JP). WATANABE, Tomohisa [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, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, 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, RS, 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: ECT2 PEPTIDES AND VACCINES INCLUDING THE SAME

(57) Abstract: Isolated peptides derived from SEQ ID NO: 42 and fragments thereof that bind to an HLA antigen and induce cytotoxic T lymphocytes (CTL) and thus are suitable for use in the context of cancer immunotherapy, more particularly cancer vaccines, are described herein. The inventive peptides encompass both the aforementioned amino acid sequences and modified versions thereof, in which one, two, or several amino acids are substituted, deleted, inserted or added, provided such modified versions retain the requisite HLA binding and/or CTL inducibility of the original sequences. Further provided are nucleic acids encoding any of the aforementioned peptides as well as pharmaceutical agents, substances and/or compositions that include or incorporate any of the aforementioned peptides or nucleic acids. The peptides, nucleic acids, pharmaceutical agents, substances and compositions of this invention find particular utility in the treatment of cancers and tumors, including, for example, bladder cancer, breast cancer, cervical cancer, cholangiocellular carcinoma, CML, colorectal cancer, esophageal cancer, NSCLC, lymphoma, pancreatic cancer, prostate cancer, renal carcinoma and SCLC.

000148



WO 2011/122022 A1

(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 13 April 2011 (13.04.2011)

Information valid as of: 23 March 2012 (23.03.2012)

Report generated on: 09 August 2012 (09.08.2012)

(10) Publication number: WO 2011/122022	(43) Publication date: 06 October 2011 (06.10.2011)	(26) Publication language: English (EN)
(21) Application number: PCT/JP2011/001909	(22) Filing date: 30 March 2011 (30.03.2011)	(25) Filing language: English (EN)
(31) Priority number(s): 61/320,577 (US)	(32) Priority date(s): 02 April 2010 (02.04.2010)	(33) Priority status: Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:
C12N 15/09 (2006.01)

(71) Applicant(s):
ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. [JP/JP]; 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 2130012 (JP) *(for all designated states except US)*
NAKAMURA, Yusuke [JP/JP]; c/o THE UNIVERSITY OF TOKYO, 3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 1138654 (JP) *(for US only)*
TSUNODA, Takuya [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 2130012 (JP) *(for US only)*
OHSAWA, Ryuji [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 2130012 (JP) *(for US only)*
YOSHIMURA, Sachiko [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 2130012 (JP) *(for US only)*
WATANABE, Tomohisa [JP/JP]; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 2130012 (JP) *(for US only)*

(72) Inventor(s):
NAKAMURA, Yusuke; c/o THE UNIVERSITY OF TOKYO, 3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 1138654 (JP)
TSUNODA, Takuya; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 2130012 (JP)
OHSAWA, Ryuji; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 2130012 (JP)
YOSHIMURA, Sachiko; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 2130012 (JP)
WATANABE, Tomohisa; c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 2130012 (JP)

(74) Agent(s):
SHIMIZU, Hatsushi; Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, Ibaraki 3000847 (JP)

(54) Title (EN): ECT2 PEPTIDES AND VACCINES INCLUDING THE SAME
(54) Title (FR): PEPTIDES D'ECT2 ET VACCINS LES COMPRENANT

(57) Abstract:
(EN): Isolated peptides derived from SEQ ID NO: 42 and fragments thereof that bind to an HLA antigen and induce cytotoxic T lymphocytes (CTL) and thus are suitable for use in the context of cancer immunotherapy, more particularly cancer vaccines, are described herein. The inventive peptides encompass both the afore- mentioned amino acid sequences and modified versions thereof, in which one, two, or several amino acids are substituted, deleted, inserted or added, provided such modified versions retain the requisite HLA binding and/or CTL inducibility of the original sequences. Further provided are nucleic acids encoding any of the aforementioned peptides as well as pharmaceutical agents, substances and/or compositions that include or incorporate any of the aforementioned peptides or nucleic acids. The peptides, nucleic acids, pharmaceutical agents, substances and compositions of this invention find particular utility in the treatment of cancers and tumors, including, for example, bladder cancer, breast cancer, cervical cancer, cholangiocellular carcinoma, CML, colorectal cancer, esophageal cancer, NSCLC, lymphoma, pancreatic cancer, prostate

cancer, renal carcinoma and SCLC.

(FR): L'invention concerne des peptides dérivés de SEQ ID NO : 42 et des fragments de ceux-ci qui se lient à un antigène de type HLA et induisent des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et sont donc adaptés pour une utilisation dans le contexte de l'immunothérapie du cancer, plus particulièrement dans des vaccins anticancéreux. Les peptides de l'invention englobent à la fois les séquences d'acides aminés susmentionnées et des versions modifiées de celles-ci, dans lesquelles un, deux ou plusieurs acides aminés sont substitués, supprimés, insérés ou ajoutés, à condition que de telles versions modifiées conservent la liaison nécessaire au HLA et/ou la capacité d'induction de CTL des séquences originales. L'invention concerne en outre des acides nucléiques codant pour l'un quelconque des peptides susmentionnés ainsi que des agents pharmaceutiques, des substances et/ou des compositions qui comprennent ou incorporent l'un quelconque des peptides ou acides nucléiques susmentionnés. Les peptides, acides nucléiques, agents pharmaceutiques, substances et compositions de cette invention trouvent une utilité particulière dans le traitement de cancers et de tumeurs comprenant, par exemple, le cancer de la vessie, le cancer du sein, le cancer du col de l'utérus, le carcinome cholangiocellulaire, la leucémie myéloïde chronique (LMC), le cancer colorectal, le cancer de l'œsophage, le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC), les lymphomes, le cancer du pancréas, le cancer de la prostate, le carcinome rénal et le cancer du poumon à petites cellules (SCLC).

International search report:

Received at International Bureau: 11 May 2011 (11.05.2011) [JP]

International preliminary examination report:

Not available

(81) Designated States:

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, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

European Patent Office (EPO) : AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR

African Intellectual Property Organization (OAPI) : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) : BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

Eurasian Patent Organization (EAPO) : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

Declarations:

Declaration made as applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate

Declaration made as applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application, 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 51bis.1(a)(iii))

000150

0-1-25 P. 2466

Clark, Modet & C^o
COLOMBIA

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.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 desleal, 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 substitutions.

Granted and signed at

on this 30 day of

Kanagawa, Japan

April

of 2010

000151


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 _____
_____ 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 those circumstances were exhibited to him.

LEGALIZATION BY THE COLOMBIAN CONSUL OR BY APOSTILLE.

000152

平成22年登簿第

943 号

認

証

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 一朗

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-N^o 024949

9. Seal/stamp:

10. Signature



K. Oyabe

Kazutoyo OYABE
For the Minister for Foreign Affairs

000153

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).

Jimena Escobar Uribe
JIMENA ESCOBAR URIBE

Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995

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 en su capacidad de Presidente y Director Ejecutivo de la persona jurídica ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

000154

RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

021662

Escobar

QUA FIRMA ADHIERE EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

7 JUN 1970 A 8:56

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

000155

(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

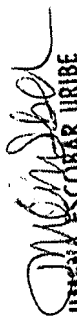
6. el 17 de mayo de 2010

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


JIMENA ESCOBAR URIBE
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995

000156

PCT

Paper Copy (NOT for submission)

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 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 61/320,577 by virtue of the following:
VIII-3-1(iv)		an assignment from NAKAMURA, Yusuke to THE UNIVERSITY OF TOKYO, dated 17 March 2010 (17.03.2010)
VIII-3-1(iv)		an assignment from THE UNIVERSITY OF TOKYO to ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., dated 02 April 2010 (02.04.2010)
VIII-3-1(ii)		ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. is entitled as employer of the inventor, TSUNODA, Takuya
VIII-3-1(ii)		ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. is entitled as employer of the inventor, OHSAWA, Ryuji
VIII-3-1(ii)		ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. is entitled as employer of the inventor, YOSHIMURA, Sachiko
VIII-3-1(ii)		ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. is entitled as employer of the inventor, WATANABE, Tomohisa

000157

PCT

Paper Copy (NOT for submission)

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 51bis.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 NAKAMURA, Yusuke to THE UNIVERSITY OF TOKYO, dated 17 March 2010 (17.03.2010)
VIII-2-1(iv)		an assignment from THE UNIVERSITY OF TOKYO to ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., dated 02 April 2010 (02.04.2010)
VIII-2-1(ii)		ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. is entitled as employer of the inventor, TSUNODA, Takuya
VIII-2-1(ii)		ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. is entitled as employer of the inventor, OHSAWA, Ryuji
VIII-2-1(ii)		ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. is entitled as employer of the inventor, YOSHIMURA, Sachiko
VIII-2-1(ii)		ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. is entitled as employer of the inventor, WATANABE, Tomohisa

000158

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0095612

Bogotá D.C., Septiembre 17 de 2012 - 17:39:48

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	353673386	17/09/2012	19.740.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-173572- -00000-0000

Fecha: 2012-10-03 14:48:15
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 160

000159

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

Septiembre 17 de 2012 - 17:39:52

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 103831

Bogotá D.C., Octubre 03 de 2012 - 09:53:05

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	95104	14/09/2012		750.000.00
RECIBO DE CA	999999999	95197	14/09/2012		30.000.00
RECIBO DE CA	999999999	95198	14/09/2012		30.000.00
RECIBO DE CA	999999999	95199	14/09/2012		30.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
12 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	360.000.00
			\$360.000.00

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

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-173572-00000-0000

Fecha: 2012-10-03 14:48:15
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 160

000160

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

Octubre 3 de 2012 - 09:53:07



No. 12-173572- -00000-0000

Fecha: 2012-10-03 14:48:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 160

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILI

☐
☐
☐
☐
☐

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 ☐