SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO4

No. 13-101077- -00000-0000

Fecha: 2013-04-19 15:15:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 145 109

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-023981- -00010-0000

Fecha: 2013-04-19 15:15:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 146 109

Industria y

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No. 10-023.981A**

54. **TITULO: PÉPTIDO DE CDH3 Y AGENTE MEDICINAL QUE COMPRENDE AL MISMO**

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL: C12N 15/00

71. SOLICITANTE: **ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.**

DOMICILIO: Kanagawa, Japón.

74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D´ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Reservado para el adhesivo de radicación

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO4
No. 13-101077- -00000-0000
Fecha: 2013-04-19 15:15:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 146 109

10-023.981 A

DIRECCIÓN DE NUEVAS CRE/
SOLICITUD FASE NACIONAI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-023981- -00010-0000
Fecha: 2013-04-19 15:15:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 146 109

1	**TIPO DE SOLICITUD**	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I
2	**DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)**	
	Solicitud Internacional No.	**PCT/JP2008/060381** **Fe**
	Publicación Internacional No.	**WO 2009/025116 A1** **Fecha** **26 de febrero de 2009**

3 **TÍTULO DE LA INVENCIÓN** (200 caracteres o espacios máximos)

PÉPTIDO DE CDH3 Y AGENTE MEDICINAL QUE COMPRENDE AL MISMO

4 **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C12N 15/00**

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 RESIDE NCIA: **Japón** LUGAR DE CONSTITUCIÓN: **Japón**

7 **INVENTOR (ES)**

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.NISHIMURA,	**Yasuharu**	**Japonés**
2.IMAI,	**Katsunori**	**Japonés**
3.TSUNODA,	**Takuya**	**Japonés**
4.NAKAMURA,	**Yusuke**	**Japonés**

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 **DATOS INVENTOR (ES)**

DIRECCIÓN	CIUDAD	PAÍS RESIDENCIA
1. c/o NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY, 1-1, Honjo 1-chome, Kumamoto-shi,	**Kumamoto 8608556,**	**Japón**
2. 1. c/o NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY, 1-1, Honjo 1-chome, Kumamoto-shi,	**Kumamoto 8608556,**	**Japón**
3. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,	**Kanagawa 2130012,**	**Japón**
4. c/o THE UNIVERSITY OF TOKYO, 3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku,	**Tokyo 1138654,**	**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.**

PAÍS **Colombia** CORREO ELECTRÓNICO **notificaciones@clarkemodet.com.co**

10 **DECLARACIONES DE PRIORIDAD** ☒ SI ☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA AAA/MM/DD
Japón	**JP**	**2007-213999**	**2007/08/20**

1

000038

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	N° 13-023053// 13-036876	Fecha 07/03/2013 19/04/2014

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

1. ☒ Descripción — N° de folios: 86
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 21
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios:5
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☐ Poderes, si fuera el caso.
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medinas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ 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.
18.

PEPTIDO DE CDH3 Y AGENTE MEDICINAL QUE COMPRENDE AL MISMO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con nuevos péptidos útiles como vacunas contra cánceres que presentan una expresión elevada de P-cadherina (CDH3), tales como cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon y cáncer de pulmón, y también con agentes farmacéuticos que incluyen al péptido para tratar y prevenir el cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer de páncreas da cuenta de aproximadamente entre 2 y 3% de la totalidad de los tumores malignos. Cada año, aproximadamente 200,000 personas en todo el mundo mueren de cáncer de páncreas, lo que lo transforma en el 5° tipo de tumor maligno más mortífero. En Japón, aproximadamente 20,000 personas mueren de cáncer de páncreas cada año. Los factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de páncreas incluyen diabetes, pancreatitis crónica, el hábito de fumar, y similares, y también se ha informado que la historia familiar es uno de los factores de riesgo. Se han hecho diversos

intentos de diagnosis temprana, incluyendo la mejora del diagnóstico por imágenes; sin embargo, la mayoría de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas cuando éstos presentan resistencia a la quimioterapia. Por consiguiente, su tasa de supervivencia a los 5 años es de aproximadamente 9.7%, y sólo de aproximadamente 13% incluso en casos de extirpación quirúrgica. El cáncer de páncreas tiene el pronóstico más desfavorable entre los cánceres del sistema digestivo. Debido a la dificultad del diagnóstico, existe un incremento gradual en la incidencia de cáncer de páncreas como causa de muerte por cáncer, especialmente en los países industrializados. Aunque se están llevando a cabo tratamientos multidisciplinarios, principalmente resección quirúrgica, y otros tratamientos tales como radioterapia y quimioterapia, éstos no han mejorado dramáticamente los efectos terapéuticos, y se necesitan urgentemente nuevas estrategias terapéuticas.

El carcinoma colangiocelular da cuenta de aproximadamente 10% de los cánceres de hígado primarios, y es el segundo tipo de cáncer más común, después del carcinoma hepatocelular. Carece de características clínicas distintivas, y en muchos casos, el cáncer es detectado en etapas avanzadas acompañado por metástasis en los nodos linfáticos, metástasis intrahepática, y similares. La tasa de

supervivencia a los 5 años es de aproximadamente 20%, y es de 35% en casos extirpados quirúrgicamente, pero es muy baja, solamente 7.4%, en casos no extirpados quirúrgicamente. Aunque la resección quirúrgica es la única terapia de la que se puede esperar que conduzca a supervivencia a largo plazo, muchos pacientes ya se hallan en un estado inoperable al momento de la detección (tasa de cirugía: 66%, tasa de resección no curativa: 20%). Tanto la sensibilidad a fármacos anti-cáncer como la radiosensibilidad de los pacientes son bajas, y se desea poder establecer una terapia para los casos no operables, incluyendo los casos de resección no curativa.

En comparación con los países occidentales, la tasa de morbilidad del cáncer gástrico es alta en las naciones asiáticas, tales como Japón y China. La detección temprana del cáncer gástrico ha sido posible merced a la mayor disponibilidad de exámenes médicos, y al progreso de instrumentos de endoscopía digestiva y de las técnicas de inspección, por lo que la cantidad de pacientes se está reduciendo. Sin embargo, el cáncer gástrico aún es la segunda causa de muerte más común entre los neoplasmas malignos para los japoneses, y su tasa como causa de muerte aún es alto. El cáncer de colon es el segundo cáncer más común en los países occidentales, y es la tercera causa de muerte más común entre los neoplasmas malignos en Japón. El cáncer gástrico y el

cáncer de colon se tratan principalmente mediante resección quirúrgica, y también con quimioterapia, radioterapia, y similares. La inmunoterapia que suprime el crecimiento del cáncer mejorando la inmunidad del paciente con cáncer contra el cáncer, está atrayendo la atención como una terapia novedosa para el cáncer metastásico y el cáncer intratable, contra los cuales es imposible aplicar las terapias mencionadas con anterioridad.

El cáncer de pulmón se ha incrementado continuamente en los últimos años en todo el mundo, y en la actualidad, aproximadamente un millón de personas mueren de cáncer de pulmón en un año. Las muertes debidas al cáncer de pulmón también presentan un incremento continuo en Japón, y se cree que alcanzarán las 123,000 en el año 2015. Es la causa principal de muerte en neoplasmas malignos en Japón. Se cree que el número de pacientes aumentará a medida que envejezca la población. La detección temprana y el tratamiento temprano son importantes en el tratamiento del cáncer de pulmón. Sin embargo, recientemente se indicó que los análisis de rayos X simples de pecho y las pruebas de esputo realizados en los exámenes de salud tienen muy poco efecto sobre la detección temprana del cáncer de pulmón, y no llevan a la reducción en las muertes por cáncer. Ya que se considera que el número de muertes atribuidas al cáncer de

pulmón está aumentando de manera continua, el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica es un desafío urgente.

Por otro lado, los desarrollos recientes en biología molecular e inmunología tumoral han permitido elucidar que las células T citotóxicas (asesinas) y las células T auxiliares reconocen péptidos generados por la degradación de proteínas que son específicamente y altamente expresados en las células cancerosas y los cuales son presentados sobre la superficie de células cancerosas o células presentadoras de antígeno a través de moléculas del HLA, y que provocan una inmunorreacción que destruye las células cancerosas. Además, se han identificado muchas proteínas de antígeno de tumor y péptidos derivados a partir de las mismas, que estimulan dichas inmunorreacciones que atacan a estos cánceres, y la aplicación clínica de inmunoterapias contra tumores específicas de antígeno está actualmente en progreso.

La molécula del HLA clase I es expresada sobre la superficie de todas las células nucleadas del cuerpo. Esta se expresa en la superficie celular al unirse a péptidos generados por la degradación intracelular de proteínas producidas en el citoplasma o el núcleo. En la superficie de una célula normal, los péptidos derivados de sus proteínas normales se unen a las moléculas del HLA clase I, y las

células T del sistema inmune no pueden identificarlas para destruir la célula. Por otro lado, en el proceso de transformación en células cancerosas, las células cancerosas algunas veces expresan una gran cantidad de proteínas que son dificilmente o muy poco expresadas en las células normales. Cuando las moléculas del HLA clase I se unen a los péptidos generados por la degradación intracelular de proteínas específicamente y altamente expresadas en células cancerosas, y que después son expresadas en la superficie de las células cancerosas, las células T asesinas pueden reconocerlas y destruyen solamente las células cancerosas. Asimismo, mediante administración de dichos antígenos o péptidos específicos del cáncer a un individuo, se puede inducir una respuesta inmune que destruye las células cancerosas y suprime el crecimiento del cáncer, sin dañar las células normales. Esto se denomina inmunoterapia contra el cáncer usando antígenos específicos del cáncer. Las moléculas del HLA clase II se expresan principalmente en la superficie de células presentadoras de antígeno. Las moléculas del HLA clase II se unen a los péptidos derivados de antígenos específicos del cáncer, los cuales son generados por la degradación intracelular de antígenos específicos del cáncer incorporados en las células presentadoras de antígeno desde el exterior de las células, y después se expresan en la

superficie de la célula. Las células T auxiliares al reconocerlos se activan, e inducen o incrementan una inmunorreacción contra los tumores produciendo diversas citoquinas que activan otras células inmunocompetentes.

Por consiguiente, si se desarrolla una inmunoterapia que elija como blanco a los antígenos altamente y específicamente expresados en estos cánceres, dicha terapia podría eliminar de manera efectiva solamente los cánceres, sin provocar ningún evento dañino en los propios órganos normales. También se espera que la terapia se pueda utilizar para cualesquiera pacientes con cáncer terminales a los cuales no puedan aplicarse otros tratamientos. Además, administrando con anticipación un antígeno y un péptido específico del cáncer como vacuna a aquellas personas con riesgo elevado de desarrollar dichos cánceres, se puede prevenir el desarrollo del cáncer.

Aunque existen varias terapias para el cáncer de páncreas, la prognosis del cáncer es muy baja en comparación con otros cánceres. Esto se debe a que el cáncer de páncreas es difícil de detectar tempranamente, avanza rápidamente, y por lo tanto comúnmente se detecta sólo en etapas muy avanzadas. Aunque la remoción quirúrgica es la cura radical más prometedora en la actualidad, los casos donde puede realizarse la resección solamente constituyen aproximadamente

20% de los casos totales. La cirugía del páncreas también es muy invasiva, y los casos avanzados muestran prognosis baja aún después de la resección quirúrgica. Los casos donde no puede realizarse la resección se tratan con quimioterapia, que principalmente utiliza gemcitabina, y radioterapia. Sin embargo, muchos casos presentan resistencia al tratamiento y tienen pocos efectos citoreductores, lo cual es una de las razones por las que el cáncer de páncreas is intratable. Por consiguiente, si se desarrolla una inmunoterapia que elija como blanco a un antígeno que sea específicamente y altamente expresado en el cáncer de páncreas, dicha terapia podría eliminar efectivamente solamente al cáncer sin provocar ningún evento dañino sobre los propios órganos normales. También se espera que se convierta en una terapia que se pueda aplicar para cualquier paciente con cáncer terminal. Además, como el cáncer de páncreas frecuentemente reaparece muy temprano después de la resección, también se espera que la terapia sea útil como terapia complementaria postoperatoria.

Los presentes inventores previamente realizaron un análisis de expresión de gen en todo el genoma de 27,648 genes humanos utilizando análisis de microarreglo de ADNc para examinar sus perfiles de expresión en 16 casos de cáncer de páncreas, órganos fetales y varios órganos normales de

adulto. Como resultado, los inventores descubrieron que la P-cadherina (CDH3) es altamente expresada en muchos cánceres de páncreas, mientras que ésta es díficilmente expresada en órganos normales de adulto. Además, se observó que CDH3 también es altamente expresada en la mayoría de los casos de carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer testicular, cáncer cervical, osteosarcoma, sarcoma de tejido blando, y similares. Este hecho sugiere que CDH3 puede ser un antígeno específico de cáncer en muchos cánceres.

HLA-A2 se observa frecuentemente en poblaciones humanas, independientemente de la raza, y aproximadamente 30% de los japoneses portan a HLA-A2. Por lo tanto, si se pudiera identificar un péptido presentado por HLA-A2 a las células T asesinas, éste se podría aplicar ampliamente no solamente a los japoneses, sino también a los caucásicos occidentales y similares. Por consiguiente, la identificación de péptidos de antígeno de cáncer presentados a las células T asesinas por HLA-A2 es una tarea importante. Podría ser altamente benéfico aplicar dichos péptidos de antígeno de cáncer a la inmunoterapia contra el cáncer de pulmón, cuyas tasas de morbilidad y mortalidad son elevadas en todo el mundo.

A continuación se presenta la información de

documentos de la técnica antecedente relevantes para la invención de la presente solicitud.

[Documento de tipo no patente 1] Nakamura, T., *et al.*, Oncogene 23: 2385-2400 (2004)

[Documento de tipo no patente 2] Obama, K., *et al.*, Hepatology 41: 1339-1348 (2005)

[Documento de tipo no patente 3] Taniuchi, K., *et al.*, Cancer Res 65: 3092-3099 (2005)

[Documento de tipo no patente 4] Soler, A. P., *et al.*, Cancer 86: 1263-1272 (1999)

[Documento de tipo no patente 5] Paredes, J., *et al.*, Clin. Cancer Res. 11: 5869-5877 (2005)

[Documento de tipo no patente 6] Ingunn, M., *et al.*, J Clin Oncol 22: 1242-1252 (2004)

[Documento de tipo no patente 7] Glenn, L., *et al.*, J Cell Biol 139: 1025-1032 (1997)

[Documento de tipo no patente 8] Bauer, R., *et al.*, Exp. Mol. Pathol. 81: 224-230, (2006)

[Documento de tipo no patente 9] Muzon-Guerra, M.F., *et al.* Cancer 103: 960-969 (2005)

[Documento de tipo no patente 10] Marck, V.V., *et al.*, Cancer Res. 65: 8774-8783 (2005).

SUMARIO DE LA INVENCION

Problemas que serán resueltos por la invención

Un objetivo que puede cumplirse con la presente invención es el desarrollo de medios para producir una inmunoterapia que suprima el crecimiento de cáncer mejorando la inmunidad contra el cáncer de los pacientes con cáncer, como una terapia novedosa para cánceres metastásicos o intratables que son difíciles de tratar mediante tratamientos quirúrgicos, quimioterapia y radioterapia, los cuales se utilizan para tratar cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de célula no pequeña, y similares. La presente invención provee péptidos identificados que se derivan de proteínas específicamente y altamente expresadas en cánceres, y que son presentadas a las células T asesinas por HLA-A2. Esto permite una inmunoterapia que se puede aplicar aproximadamente a 30% de los pacientes japoneses con diversos cánceres que expresan de manera muy alta a CDH3.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores identificaron a CDH3 (N° de Acceso GenBank NM_001793) como un gen altamente expresado en cáncer de páncreas, utilizando análisis con microarreglo

de ADNc de tejidos de cáncer de páncreas. Con el fin de examinar si la inmunidad antitumor es inducida o no por células T asesinas específicas para CDH3, se usan ratones transgénicos HLA-A2 que expresan a HLA-A2, el cual es portado por aproximadamente 30% de los japoneses. Específicamente, se inmunizan ratones transgénicos HLA-A2 con células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón pulsadas con un péptido de CDH3 de humano que tiene un motivo de unión a HLA-A2 para examinar si se pueden inducir o no células T asesinas específicas de péptido restringidas por HLA-A2. Se usó el método ELISPOT para detectar el γ-interferón (IFN-γ) producido por células T asesinas que se activaron al reconocer el péptido presentado por HLA-A2, y de esta manera examinar si se indujeron o no células T asesinas específicas para el péptido de CDH3 en células de bazo de los ratones inmunizados. Como resultado, los presentes inventores identificaron dos péptidos de CDH3 novedosos que pueden ser aplicados a la inmunoterapia para pacientes de cáncer HLA-A2-positivos. Además, se descubrió que los CTL que respondían a CDH3 que se indujeron usando estos péptidos tienen citotoxicidad específica para células cancerosas que expresaban moléculas de CDH3 y HLA-A2 endógenas, y que los CTL reconocen las células blanco en una manera restringida por HLA clase I. Asimismo, también se descubrió que el

crecimiento de tumores transplantados a ratones NOD/SCID se suprime significativamente inyectando por vía intravenosa células CD8-positivas inducidas por los péptidos (método de inmunidad adoptiva de CTL).

Más específicamente, la presente invención provee:

(1) un péptido de los siguientes (A) o (B):

(A) un péptido que incluye una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2,

(B) un péptido que incluye una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2, en la cual se han sustituido, suprimido, insertado y/o agregado uno, dos o varios aminoácidos, y en la cual el péptido tiene una actividad para inducir una célula T citotóxica (asesina);

(2) el péptido de (1), en el cual el segundo aminoácido desde el extremo N-terminal es leucina o metionina;

(3) el péptido de (1), en el cual el aminoácido C-terminal es valina o leucina;

(4) un agente para inducir inmunidad contra cáncer, que incluya uno o más péptidos de (1) como un ingrediente activo;

(5) un agente para tratar y/o prevenir cáncer, que incluya uno o más péptidos de (1) como un ingrediente activo;

(6) un agente para inducir una célula presentadora

de antígeno que tenga actividad inductora de célula T citotóxica (asesina), que incluya uno o más péptidos de (1) como un ingrediente activo;

(7) un agente para inducir una célula presentadora de antígeno que tenga actividad inductora de célula T citotóxica (asesina), que incluya uno o más polinucleótidos que codifiquen para los péptidos de (1) como un ingrediente activo;

(8) un agente para inducir una célula T citotóxica (asesina), que incluya uno o más péptidos de (1) como un ingrediente activo;

(9) un anticuerpo contra el péptido de (1);

(10) una célula T auxiliar, una célula T citotóxica (asesina), o un grupo de inmunocitos que incluya estas células, que se inducen usando el péptido de (1);

(11) una célula presentadora de antígeno que presenta un complejo que incluye el péptido de (1) y un antígeno HLA;

(12) la célula presentadora de antígeno de (11), la cual es inducida por el agente de (6) o (7);

(13) un exosoma que presenta un complejo que incluye el péptido de (1) y un antígeno HLA;

(14) el exosoma de (13), en el cual el antígeno HLA es HLA-A2 (HLA-A2*0201);

(15) un método para inducir una célula presentadora de antígeno que tenga actividad inductora de célula T citotóxica (asesina), que incluye un paso de poner en contacto la célula presentadora de antígeno con el péptido de (1);

(16) un método para inducir una célula presentadora de antígeno que tenga actividad inductora de célula T citotóxica (asesina), que incluye un paso de transfectar un polinucleótido que codifique para el péptido de (1) en una célula presentadora de antígeno;

(17) un método para inducir una célula T citotóxica (asesina), que incluye un paso de poner en contacto una célula T con el péptido de (1);

(18) un método para inducir inmunidad contra cáncer, que incluye un paso de administrar el péptido de (1) a un individuo;

(19) un método para tratar y/o prevenir cáncer, que incluye un paso de administrar el péptido de (1) a un individuo;

(20) el uso del péptido de (1) en la fabricación de un agente para inducir inmunidad contra cáncer; y

(21) el uso del péptido de (1) en la fabricación de un agente para tratar y/o prevenir cáncer.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra el protocolo para identificar péptidos de CDH3 reconocidos por células T asesinas restringidas por HLA-A2. (El día en que las células de bazo se aislan a partir de ratones inmunizados se fija como "Día 0").

La figura 2 representa una gráfica que muestra el resultado de la prueba ELISPOT para 18 péptidos de CDH3. Se utiliza la prueba ELISPOT para examinar si las células T asesinas obtenidas a partir de ratones inmunizados pueden o no reaccionar específicamente con células pulsadas con péptidos de CDH3 y producir IFN-γ. Las células T asesinas inducidas con los péptidos CDH3-4 o CDH3-7 reconocieron específicamente BM-DC pulsadas con péptidos de CDH3 y producen INF-γ. Sin embargo, las células T asesinas inducidas con otros péptidos no presentan respuesta inmune de CTL específica para CDH3. Por lo tanto, se confirmó que los péptidos CDH3-4 y CDH3-7 son péptidos de epítope que pueden inducir células T asesinas restringidos por HLA-A2 y específicas para CDH3. Los números de péptido de CDH3 mostrados en la Figura 2 corresponden a los números de péptido mostrados en la columna "posiciones de los peptidos" en la Tabla 2, y no a los SEQ ID NOs descritos en la presente solicitud.

Las figuras 3A-3C presentan fotografías que muestran los resultados de la prueba ELISPOT que detecta el INF-γ producido proveniente de células T asesinas activadas a través de reconocimiento específico de péptidos de CDH3. Las células de bazo CD4-negativas muestran 283.7 ± 40.0 manchas/cavidad, en respuesta a BM-DC pulsadas con péptido CDH3-$4_{655-663}$ (izquierda en la figura 3A y parte superior en la figura 3B), mientras que éstas muestran 48.7 ± 11.9 manchas/cavidad, en respuesta a BM-DC sin pulsación de péptido (derecha en la figura 3A e hilera inferior en la figura 3B) ($P < 0.05$). De manera similar, las células de bazo CD4-negativas muestran 79.3 ± 3.2 manchas/cavidad, en respuesta a BM-DC pulsadas con el péptido CDH3-$7_{757-765}$ (hilera superior en la figura 3C), mientras que muestran 42.7 ± 2.5 manchas/cavidad, en respuesta a BM-DC sin pulsación de péptido (hilera inferior en la figura 3C) ($P < 0.05$). La prueba se realiza dos veces y arroja los mismos resultados.

Las figuras 4A-4D presentan gráficas de líneas que muestran el resultado de la inducción de CTLs de humano específicos de CDH3 provenientes de PBMCs de donadores sanos HLA-A2-positivos y pacientes con cáncer. Figura 4A: se indujeron CTLs reactivos a péptido de CDH3 a partir de PBMCs de donadores sanos HLA-A2-positivos. Después de estimular tres veces con DCs derivadas de monocito autólogas pulsadas

con péptido CDH3-$4_{655-663}$ (gráfica superior) o péptido CDH3-$7_{757-765}$ (gráfica inferior), se evalúa la citotoxicidad contra células T2 (HLA-A2-positivas, deficientes en TAP) pulsadas o no pulsadas con cada péptido utilzando una prueba de liberación de ^{51}Cr convencional. Los CTL presentan toxicidad para células T2 pulsadas con el péptido CDH3-$4_{655-663}$ (gráfica superior) o con el péptido CDH3-$7_{757-765}$ (gráfica inferior), pero no para células T2 no pulsadas con péptido. Figura 4B: Los CTL muestran citotoxicidad para la línea de células HCT116 de cáncer de colon $CDH3^-$ $HLA\text{-}A2^+$ de humano y la línea de células de cáncer escamoso oral HSC3, así como para PANC1/CDH3, la cual es una línea de células PANC1 de cáncer de páncreas humano $CDH3^-$ $HLA\text{-}A2^+$ transformadas con el gen *CDH3*. Sin embargo, los CTL no presentan citotoxicidad para la línea de células SKHep1 de cáncer de hígado humano $CDH3^-$ $HLA\text{-}A2^+$, PANC1, y la línea de células de cáncer de páncreas humano $CDH3^+$ $HLA\text{-}A2^-$ PK8. Figura 4C: Los CTL reactivos a CDH3 inducidos a partir de PBMCs de pacientes con cáncer de páncreas (PC) HLA-A2-positivos y pacientes con cáncer gástrico (GC) presentaron citotoxicidad para HCT116 y PANC1/CDH3, pero no para PANC1 y PK8. Figura 4D: se muestra la inhibición de la citotoxicidad por un anticuerpo monoclonal anti-HLA clase I. Después de incubar las células blanco, SKHep1/CDH3 y HSC3, con anticuerpo monoclonal anti-

HLA clase I (W6/32, IgG_{2a}) o anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR (H-DR-1, IgG_{2a}) durante una hora, se agregaron CTLs inducidos a partir de PBMCs de donadores sanos estimulados con el péptido CDH3-$4_{655-663}$ (izquierda, centro) o el péptido CDH3-$7_{757-765}$ (derecha). La producción de INF-γ (izquierda y derecha, prueba ELISPOT para IFN-γ) y la citotoxicidad (centro, prueba de liberación de ^{51}Cr) fueron marcadamente inhibidas por W6/32, pero no por H-DR-1.

La figura 5 muestra la actividad antitumoral *in vivo* de CTLs humanos inducidos por CDH3 contra células de cáncer de humano transplantadas en ratones NOD/SCID. Figura 5A: Inhibición de crecimiento de una línea de célula de cáncer colorrectal humano, HCT116 ($CDH3^+$, $HLA\text{-}A2^+$), injertadas en ratones NOD/SCID después de la transferencia de los CTL. Cuando el tamaño de los tumores alcanza los 25 mm^2 el día 7 después de la implantación subcutánea del tumor, se inoculan por vía intravenosa CTLs humanos reactivos al péptido CDH3-$4_{655-663}$ (□) y al péptido CDH3-$7_{757-765}$ (■). El día 14, los CTLs se inoculan nuevamente de la misma manera. Las células T $CD8^+$ de control estimuladas con el péptido de VIH restringido por HLA-A2 no muestran citotoxicidad (◊). Se muestran los volúmenes de los tumores en ratones NOD/SCID a los que se les aplicaron dos administraciones de CTLs reactivos a CDH3 (n = 7), células T $CD8^+$ de control (n = 7) o PBS sola (o, n = 7)

000057

el día 7 y el día 14. Los tamaños de los tumores se expresan en milímetros cuadrados. Figura 5B: Se muestra el tamaño de tumor en cada grupo con ± desviación estándar (n = 7).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Los términos "un", uno/una" y "el/la", tal como se utilizan en la presente solicitud, significan "por lo menos uno/una", a menos que se indique específicamente lo contrario.

A menos que se los defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente solicitud tienen el mismo significado que comúnmente le dan los expertos en la técnica a la cual pertenece la presente invención.

El péptido de conformidad con la presente invención es un epítope restringido por HLA-A2 el cual es un alelo de HLA generalmente encontrado en las poblaciones japonesa y caucásica. Específicamente, los candidatos de péptidos de unión a HLA-A2 derivados de CDH3 se seleccionan usando como un ínidice su afinidad de unión a HLA-A2. Los péptidos seleccionados se evaluan analizando si se pueden inducir o no células T asesinas en el cuerpo de ratones transgénicos HLA-A2 utilizando células dendríticas

derivadas de células de médula ósea (BM-DCs) de ratones transgénicos HLA-A2 pulsadas con un péptido seleccionado. Las células T asesinas fueron inducidas por CDH3-4 (FILPVLGAV (SEQ ID NO: 1)) y CDH3-7 (FIIENLKAA (SEQ ID NO: 2)) en el cuerpo de los ratones transgénicos HLA-A2. Las células T asesinas inducidas por estos péptidos muestran una respuesta inmune contra las BM-DC a las cuales se agregaron estos péptidos. Sin embargo, estas células T asesinas no muestran ninguna respuesta inmune contra las BM-DC a las que no se les agregaron péptidos. Estos resultados demuestran que los péptidos derivados de CDH3 son útiles como péptidos para inducir una reacción inmune contra células presentadoras de CDH3, y que los péptidos derivados de CDH3 son péptidos de epítope restringidos por HLA-A2. CDH3 es altamente expresado en la mayoría de casos con enfermedades tales como cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer testicular, cáncer cervical, osteosarcoma y tumores de tejido blando. Este hecho indica que CDH3 es útil como un blanco para la inmunoterapia en muchos cánceres.

(1) Péptidos de conformidad con la presente invención y agentes para inducir inmunidad contra cáncer que contiene a dichos péptidos

Un péptido de conformidad con la presente invención es cualquiera de los siguientes péptidos:

(A) Un péptido que incluye una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2;

(B) Un péptido que incluye una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2, en la cual se han sustituido, suprimido, insertado y/o agregado uno, dos o varios aminoácidos, y en el cual el péptido tiene una actividad para inducir células T asesinas;

(C) El péptido de (B), en el cual el segundo aminoácido desde el extremo N-terminal es leucina o metionina; y

(D) El péptido de (B), en el cual el aminoácido C-terminal es valina o leucina.

Un péptido de conformidad con la presente invención es un péptido de epítope que tiene menos de 40 aminoácidos, de preferencia menos de 20 aminoácidos, más preferido menos de 15 aminoácidos, el cual incluye la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2, y tiene actividad para inducir células T asesinas. De manera alternativa, el péptido de epítope puede incluir un péptido que incluya una secuencia de aminoácido de

SEQ ID NO: 1 ó 2, en la cual se han sustituido, suprimido, insertado y/o agregado uno, dos o varios aminoácidos, siempre y cuando se conserve la actividad inductora de células T asesinas. El número de residuos sustituidos, suprimidos, insertados y/o agregados generalmente es de 5 aminoácidos o menos, de preferencia 4 aminoácidos o menos, más preferido 3 aminoácidos o menos, más preferido aún 1 aminoácido o 2 aminoácidos.

Se sabe que los péptidos variantes (es decir, péptidos que incluyen secuencias de aminoácido que se obtienen alterando las secuencias de aminoácido originales por medio de sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno, dos o varios residuos de aminoácido) retienen las actividades biológicas originales (Mark DF *et al.*, (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:5662-6; Zoller MJ y Smith M, (1982) Nucleic Acids Res 10:6487-500; Dalbadie-McFarland G *et al.*, (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79:6409-13). Las alteraciones de aminoácidos de preferencia retienen propiedades de las cadenas laterales de aminoácido originales. Los ejemplos de propiedades de las cadenas laterales de aminoácido son los aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), los aminoácidos hidrofílicos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) y las cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: cadenas laterales

alifáticas (G, A, V, L, I, P); cadenas laterales que contienen grupos hidroxilo (S, T, Y); cadenas laterales que contienen átomos de azufre (C, M); cadenas laterales que contienen ácidos carboxílicos y amidas (D, N, E, Q); cadenas laterales que contienen bases (R, K, H); y cadenas laterales que contienen grupos aromáticos (H, F, Y, W), en donde los caracteres entre paréntesis se refieren a los códigos de una letra de los aminoácidos.

En una modalidad preferida, los péptidos de la presente invención (péptidos inmunogénicos) son nonapéptidos (nonámeros) o decapéptidos (decámeros).

En la presente solicitud, un péptido que tiene actividad inductora de célula T asesina significa un péptido que tiene actividad inductora de célula T que estimula las células T asesinas (células T citotóxicas/CTLs).

Con el fin de obtener péptidos con alta afinidad de unión y actividad inductora de célula T asesina, se puede alterar la secuencia de aminoácido de un péptido parcial de CDH3 de origen natural mediante sustitución, deleción o adición de uno, dos o varios aminoácidos. En la presente solicitud, el término "varios" hace referencia a 5 o menos, de preferencia 3 o menos, más preferido 2 o menos. Además, debido a que se conoce la regularidad en las secuencias de péptido que tienen una afinidad elevada para antígenos HLA

(Kubo RT, *et al.*, (1994) J. Immunol., 152, 3913-24; Rammensee HG, *et al.*, (1995) Immunogenetics. 41:178-228; Kondo A, *et al.* (1995) J.Immunol. 155:4307-12), los péptidos de la presente invención (péptidos de epítope) se pueden alterar con el fin de mejorar su afinidad hacia los antígenos HLA con base a la regularidad. Por ejemplo, los péptidos con alta afinidad de unión para HLA-2 se pueden obtener reemplazando el segundo aminoácido desde el extremo N-terminal con leucina o metionina. De manera similar, los péptidos con alta afinidad de unión para HLA-2 también se pueden obtener reemplazando el aminoácido C-terminal con valina o leucina.

Cuando la secuencia de un péptido de epítope es la misma que la de una parte de una secuencia de aminoácido de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, se pueden ocasionar efectos secundarios, tales como trastornos autoinmunes o síntomas de alergia contra una sustancia específica. Con el fin de evitar dichos efectos secundarios, un péptido de epítope alterado no debe ser idéntico a las secuencias de aminoácido de proteínas conocidas. Para este propósito, es necesario realizar una búsqueda de homología usando bases de datos disponibles para confirmar que no haya una proteína endógena o exógena con una función diferente que muestra 100% de homología con el péptido de epítope alterado. Mediante este procedimiento, se

pueden evitar los riesgos causados por la alteración de la secuencia de aminoácido antes mencionada para incrementar la afinidad de unión con el antígeno HLA y/o para incrementar la actividad inductora de células T asesinas.

Aunque se espera que los péptidos antes descritos que tienen alta afinidad de unión para los antígenos HLA sean altamente efectivos como vacunas contra el cáncer, se deben examinar los péptidos candidatos seleccionados usando alta afinidad como un índice para ver si éstos realmente tienen o no actividad inductora de células T asesinas. La actividad inductora de células T asesinas se puede confirmar: induciendo células presentadoras de antígeno que tienen el antígeno del MHC humano (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas), o más específicamente, induciendo células dendríticas derivadas de leucocitos mononucleados de sangre periférica humana; estimulándolas con un péptido de interés; luego mezclándolas con células CD8-positivas; y midiendo la actividad citotóxica contra la célula blanco. Como un sistema de reacción, se pueden utilizar animales transgénicos que expresen el antígeno HLA humano (como se describe, por ejemplo, en BenMohamed L, *et al.* (2000) Hum. Immunol. 61(8):764-79, artículos relacionados, libros y vínculos electrónicos (Linkout)). Por ejemplo, las células blanco se pueden radiomarcar con ^{51}Cr, o

similares, y se puede calcular la actividad citotóxica a partir de la radiactividad liberada desde las células blanco. De manera alternativa, las células blanco se pueden examinar: midiendo el IFN-γ producido y liberado a partir de las células T asesinas en presencia de las células presentadoras de antígeno que tienen el péptido inmovilizado; y visualizando la zona de producción de IFN-γ en el medio de cultivo usando un anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ.

Como se muestra en los ejemplos, el resultado del examen de la actividad inductora de célula T asesina de los péptidos muestra que los péptidos que tienen una afinidad de unión elevada para el antígeno HLA no necesariamente tienen actividad inductora de célula T asesina alta. Sin embargo, los péptidos que contienen las secuencias de aminoácido de CDH3-4 (FILPVLGAV (SEQ ID NO: 1)) o CDH3-7 (FIIENLKAA (SEQ ID NO: 2)) muestran actividad inductora de célula T asesina especialmente alta.

Como se describió con anterioridad, la presente invención provee péptidos que tienen actividad inductora de célula T asesina, más específicamente, péptidos que incluyen la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2, o variantes de las mismas (es decir, secuencias de aminoácido en las cuales se han sustituido, suprimido, insertado y/o agregado uno, dos o varios aminoácidos). Las secuencias de aminoácido

de los péptidos que contienen los nueve aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ó 2, o variantes de las mismas, de preferencia no son idénticas a las de otras proteínas endógenas. Especialmente, se puden obtener péptidos con alta afinidad de unión para HLA-2 reemplazando el segundo aminoácido desde el extremo N-terminal con leucina o metionina, y/o reemplazando el aminoácido C-terminal con valina o leucina.

Los péptidos de la presente invención pueden incluir modificaciones tales como glucosilación, oxidación de las cadenas laterales, y fosforilación, a menos que los péptidos pierdan su actividad inductora de célula T asesina. Otras modificaciones incluyen, por ejemplo, D-aminoácidos u otros análogos de aminoácido que se puedan utilizar para incrementar el tiempo de vida media de los péptidos en suero.

Los métodos para obtener y fabricar los péptidos de la presente invención no están particularmente limitados. Estos pueden ser péptidos químicamente sintetizados o péptidos recombinantes producidos mediante tecnología de recombinación de gen.

Los péptidos químicamente sintetizados de la presente invención se pueden sintetizar utilizando métodos de síntesis química, tales como el método Fmoc (método de fluorenilmetiloxicarbonilo) y el método t-Boc (método de t-butiloxicarbonilo). Los péptidos de la presente invención

también se pueden sintetizar utilizando diversos sintetizadores de péptido disponibles comercialmente.

Los péptidos de la presente invención se pueden fabricar como proteínas recombinantes mediante obtención de moléculas de ADN que tengan las secuencias de nucleótido que codifican para los péptidos, o variantes u homólogos de las mismas, e introducción de las mismas en un sistema de expresión apropiado.

Los vectores de expresión usados de preferencia pueden ser cualesquiera vectores que se puedan duplicar de manera autónoma en las células hospederas o que se puedan incorporar en un cromosoma de la célula hospedera, y que contenga un promotor en un locus apropiado para permitir la expresión de un gen que codifique para un péptido. Los transformantes que tienen un gen que codifica para el péptido de la presente invención se pueden producir introduciendo el vector de expresión antes mencionado en el hospedero. El hospedero puede ser cualquiera de células de bacteria, de levadura, o de animal y células de insecto, y la introducción del vector de expresión al hospedero se puede efectuar utilizando cualesquiera técnicas conocidas dependiendo del hospedero.

En la presente invención, el péptido recombinante de la presente invención se puede aislar cultivando el

transformante producido como se describió anteriormente, produciendo y acumulando el péptido en el cultivo, y recolectando el péptido a partir de dicho cultivo.

Cuando el transformante es un procariota, tal como *E. coli*, o un eucariota tal como una levadura, el medio de cultivo para cultivar estos microorganismos puede ser un medio natural o un medio sintético, en tanto que éste contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, minerales, y similares, que puedan ser utilizadas por los microorganismos y permita el cultivo eficiente del transformante. Las condiciones de cultivo pueden ser aquellas usadas comúnmente para cultivar los microorganismos. Después del cultivo, el péptido de la presente invención se puede aislar y purificar a partir del cultivo del transformante usando métodos convencionales para aislamiento y purificación de péptidos.

Los péptidos que incluyen una secuencia de aminoácido en la cual se han sustituido o agregado uno, dos o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2 pueden ser producidos u obtenidos apropiadamente por el experto en la técnica tomando como base la información sobre la secuencia de nucleótido que codifica para la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2. Específicamente, el gen que codifica para un péptido que contiene una

secuencia de aminoácido en la cual se han sustituido, suprimido, insertado y/o agregado uno, dos o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2, y tiene actividad inductora de célula T asesina, también se puede producir utilizando cualquier método conocido por el experto en la técnica, tal como síntesis química, técnicas de ingeniería genética o mutagénesis. Por ejemplo, el método de mutagénesis dirigida a sitio, uno de los procedimientos de ingeniería genética, es útil porque éste puede introducir una mutación específica en una posición específica. Esta se puede efectuar de conformidad con los métodos descritos en Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989 (abreviado de aquí en adelante como Molecular Cloning, 2ª edición), Current Protocols in Molecular Biology, Suplementos 1-38, John Wiley & Sons (1987-1997) (abreviado de aquí en adelante como Current Protocols in Molecular Biology), y similares.

Los péptidos de la presente invención descritos con anterioridad pueden inducir inmunidad contra el cáncer, como también se muestra más adelante en los ejemplos. Por lo tanto, de conformidad con la presente invención, se proveen agentes para inducir inmunidad contra cáncer que contiene los péptidos de la presente invención. Los agentes para inducir

inmunidad de la presente invención también se pueden preparar como una formulación mixta combinando dos o más péptidos de epítope. Los agentes para inducir inmunidad que se formulan combinando tipos múltiples de péptidos pueden ser un cóctel, o se pueden ligar mutuamente usando técnicas convencionales. Los péptidos de epítope a combinar pueden ser péptidos que tienen diferentes secuencias de aminoácido derivadas del mismo gen, o pueden ser péptidos que tienen secuencias de aminoácido derivadas de genes diferentes. Cuando los péptidos de la presente invención se administran a un individuo, los péptidos administrados son presentados con una densidad elevada en los antígenos HLA de células presentadoras de antígeno, y posteriormente, se inducen células T asesinas, las cuales reaccionan específicamente con los complejos formados entre los péptidos administrados y los antígenos HLA. De manera alternativa, al poner en contacto células dendríticas recolectadas a partir de un individuo con los péptidos de la presente invención (o al pulsar células dendríticas recolectadas de un individuo con los péptidos de la presente invención), se pueden obtener las células presentadoras de antígeno que presentan los péptidos de la presente invención en su superficie. Al administrar estas células presentadoras de antígeno de vuelta a cada individuo, se inducen células T asesinas en el cuerpo del individuo, y

como resultado, se pueden incrementar las respuestas de inmunidad a las células blanco que presentan los péptidos de la presente invención.

Cuando se utilizan *in vitro* o *in vivo*, de preferencia *in vitro*, los agentes para inducir inmunidad contra cáncer de conformidad con la presente invención pueden inducir células T auxiliares, células T asesinas, o grupos de inmunocitos que incluyan estas células, con lo cual se confiere inmunidad contra el cáncer.

(2) Agentes farmacéuticos para tratar y/o prevenir cáncer de conformidad con la presente invención (vacunas contra cáncer)

En los ejemplos se muestra que los péptidos de la presente invención pueden inducir células T asesinas específicas de célula de cáncer *in vivo*. Asimismo, en la invención precedente se muestra que CDH3 es altamente expresado en la mayoría de casos tales como cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer testicular, carcinoma cervical, osteosarcoma, sarcoma de tejido blando, o similares. Por consiguiente, se espera que los agentes para inducir inmunidad que incluyen los péptidos de la presente invención sean efectivos como agentes para

tratar y/o prevenir cáncer. Es decir, al inyectar los péptidos de la presente invención, junto con un coadyuvante apropiado en el cuerpo, o después de pulsar con los péptidos las células presentadoras de antígeno, tal como células dendríticas, se inducen y activan células T asesinas que atacan al tumor, y como resultado, se pueden esperar efectos anti-tumor. Además, los genes que codifican para los péptidos de la presente invención se pueden incorporar en vectores apropiados. Las células presentadoras de antígeno humanas (células dendríticas, etcétera) y las bacterias, tales como *Mycobacterium tuberculosis* de BCG, que son transformadas mediante ADN recombinante o virus tales como virus vaccinia, que tienen ADN integrado en el genoma, que codifica para el péptido de la presente invención, se pueden utilizar efectivamente como vacunas vivas para tratar y/o prevenir cáncer humano. Las dosis y los métodos de administración para las vacunas contra el cáncer son los mismos que para las vacunas contra la viruela o las vacunas BCG usuales.

Con relación a la presente invención, el término "vacuna" (también denominada composición inmunogénica) se refiere a una sustancia que induce inmunidad antitumoral o suprime diversos cánceres cuando se inocula en un animal. De conformidad con la presente invención, se sugiere que el péptido que incluye la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:

1 ó 2 es un péptido de epítope restringido por HLA-A2 que puede inducir respuestas inmunes fuertes y específicas contra células que presentan CDH3. Por consiguiente, la presente invención también incluye métodos para inducir inmunidad antitumoral usando los péptidos que incluyen la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2, o variantes de las mismas que incluyen sustituciónes, deleciones o adiciones de uno, dos o más aminoácidos. En general, inmunidad antitumoral incluye las siguientes respuestas inmunes:

(1) inducción de células T asesinas contra tumores que contienen células que expresan CDH3;

(2) inducción de anticuerpos que reconocen tumores que contienen células que expresan CDH3, y

(3) inducción de la producción de citoquinas contra el cáncer.

Cuando un péptido particular induce cualquiera de estas respuestas inmunes a través de inoculación a un animal, se determina que dicho péptido tienen un efecto inductor de inmunidad antitumoral. La inducción de inmunidad antitumoral por el péptido se puede detectar observando la respuesta *in vivo* o *in vitro* del sistema inmune contra el péptido en un hospedero.

Por ejemplo, los métodos para detectar la inducción de células T asesinas son bien conocidos. Una sustancia

extraña que invade un cuerpo vivo es presentada a las células T y las células B por la acción de las células presentadoras de antígeno (APC). Las células T que responden a los antígenos presentados por las células presentadoras de antígeno en una manera específica de antígeno se diferencian en células T asesinas (también denominadas linfocitos T citotóxicos o CTLs) a través de estimulación por antígenos, y luego proliferan. En la presente solicitud, este proceso se denomina "activación" de células T. La inducción de célula T asesina mediante un péptido específico se puede evaluar presentando el péptido en las células T usando células presentadoras de antígeno pulsadas con el péptido, y luego detectando la inducción de células T asesinas. Asimismo, las células presentadoras de antígeno tienen efectos de activación de células T $CD4^+$, las células T $CD8^+$, macrófagos, eosinófilos, y células NK. Debido a que las células T $CD4^+$ son importantes en la inmunidad antitumoral, se puede evaluar el efecto inductor de inmunidad antitumoral del péptido utilizando los efectos de activación de estas células como indicadores.

Los métodos para evaluar los efectos de inducción de célula T asesina, en los cuales las células T asesinas se inducen utilizando células dendríticas (DCs) como células presentadoras de antígeno son bien conocidos en la técnica.

Entre las células presentadoras de antígeno, las DC tienen el efecto más fuerte de inducción de célula T asesina. Este método implica, primero poner en contacto un péptido de prueba con las DC, y luego poner en contacto las DC con células T. Las células T que tienen efectos citotóxicos sobre las células blanco se detectan a partir de células T que han estado en contacto con las DC. Si las células T muestran actividad citotóxica contra las células blanco, esto significa que el péptido de prueba tiene una actividad para inducir células T citotóxicas. La actividad de las células T asesinas contra las células blanco, tales como células tumorales, se puede detectar, por ejemplo, usando lisis de células tumorales marcadas con ^{51}Cr como un indicador. De manera alternativa, el grado de daño a las células tumorales se puede evaluar usando la actividad de captación de ^{3}H-timidina o liberación de lactosa deshidrogenasa (LDH) como un índice.

Los péptidos de prueba cuya actividad inductora de célula T asesina ha sido confirmada con estos métodos son péptidos que tienen efectos de activación de DC, y actividad actividad inductora de célula T asesina subsiguiente. Por lo tanto, los péptidos que inducen células T asesinas contra células tumorales pueden ser útiles como vacunas contra cánceres que presenten CDH3. Asimismo, las células

presentadoras de antígeno que han adquirido la capacidad de inducir células T asesinas contra cánceres a través del contacto con el péptido pueden ser útiles como vacunas contra cáncer. De manera adicional, las células T asesinas que han adquirido citotoxicidad mediante presentación de péptidos por células presentadoras de antígeno también se pueden utilizar como vacunas contra cánceres que presentan CDH3. El método para tratar cáncer usando inmunidad antitumoral por parte de células presentadoras de antígeno y células T asesinas se denomina citoinmunoterapia.

En general, cuando se utilizan péptidos para citoinmunoterapia, la eficiencia de la inducción de células T asesinas se puede incrementar combinando una pluralidad de péptidos que tengan estructuras diferentes. Por lo tanto, cuando se estimulan las DC con fragmentos de proteína, es conveniente utilizar una mezcla de más de un tipo de fragmentos de péptido.

La inducción de inmunidad antitumoral mediante péptidos también se puede evaluar observando la inducción de la producción de anticuerpos contra tumores. Por ejemplo, cuando los anticuerpos contra los péptidos se inducen en animales de laboratorio inmunizados con los péptidos, y cuando el crecimiento, proliferación y/o metástasis de las células tumorales son suprimidos por estos anticuerpos, se

determina que los péptidos inducen inmunidad antitumoral.

La inmunidad antitumoral se puede inducir administrando una vacuna de la presente invención, y la inducción de inmunidad antitumoral permite el tratamiento y prevención del cáncer. Los efectos del tratamiento del cáncer o la prevención de la incidencia del cáncer pueden incluir inhibición del crecimiento de las células cancerosas, regresión de las células cancerosas, y supresión del desarrollo de las células cancerosas. La disminución en la tasa de mortalidad de los individuos que tienen cáncer, la disminución de los marcadores tumorales en sangre, y la reducción de los síntomas detectables que acompañan el cáncer también se incluyen en los efectos de tratamiento o prevención del cáncer. Dichos efectos terapéuticos o preventivos de la vacuna contra el cáncer de preferencia son estadísticamente significativos en comparación con los de un control sin la administración de una vacuna. Por ejemplo, los efectos se observan con un nivel de significacncia de 5% o menos. Los métodos estadísticos que se pueden utilizar para determinar la significancia estadística son, por ejemplo, la prueba t de Student, la prueba U de Mann-Whitney o el ANOVA.

En la presente invención, el individuo de preferencia es un mamífero. Los ejemplos incluyen seres humanos, primates no humanos, ratones, ratas, perros, gatos,

caballos o ganado bovino, pero no se limitan a los mismos.

Los péptidos de la presente invención se pueden administrar a un individuo *in vivo* o *ex vivo*. Asimismo, para producir una composición inmunogénica para tratar o prevenir cáncer, se puede usar un péptido inmunogénico de la presente invención, es decir, la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2, o nanopéptidos que se seleccionan a partir de péptidos variantes de los mismos.

Más específicamente, la presente invención provee agentes farmacéuticos para tratar un tumor o para prevenir el crecimiento, metástasis y similares de los tumores, que incluyan uno o más péptidos de la presente invención como ingredientes activos. Los péptidos de la presente invención son particularmente útiles para tratar cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer testicular, cáncer cervical, y tumores tales como osteosarcoma y sarcoma de tejido blando.

Los péptidos de la presente invención se pueden administrar directamente a un individuo como un agente farmacéutico formulado utilizando métodos de formulación convencionales. Además de los péptidos de la presente invención, dicha formulación puede incluir vehículos, excipientes, y similares farmacéuticamente aceptables, según

sea necesario. Los agentes farmacéuticos de la presente invención se pueden utilizar para tratar y prevenir diversos tumores.

Asimismo, para establecer efectivamente la inmunidad celular, se pueden mezclar coadyuvantes con los agentes farmacéuticos para tratar y/o prevenir tumores que incluyan uno o más péptidos de la presente invención como ingredientes activos. De manera alternativa, esta composición se puede co-administrar con otros ingredientes activos, tales como agentes antitumorales. Las formulaciones apropiadas también incluyen gránulos. Los coadyuvantes apropiados se describen en la literatura (Johnson AG. (1994) Clin. Microbiol. Rev., 7:277-89). Los ejemplos de coadyuvantes incluyen, pero sin limitarse a los mismos, coadyuvante incompleto de Freund, BCG, dimicolato de trehalosa (TDM), lipopolisacárido (LPS), coadyuvante de alumbre, coadyuvante de sílice, fosfato de aluminio, hidróxido de alumbre, y sulfato de aluminio y potasio. Asimismo, se pueden utilizar de manera conveniente formulaciones liposómicas, formulaciones granuladas en las cuales un fármaco está unido a glóbulos que tienen un diámetro de varios µm, y formulaciones en las cuales los lípidos están unidos a los péptidos antes mencionados. Los métodos de administración pueden ser administración por vía oral, inyección

intradérmica, inyección subcutánea, inyección intravenosa, o similares, y puede incluir administración sistémica o administración local cerca del tumor objetivo.

La dosis de los péptidos de la presente invención se puede ajustar apropiadamente de conformidad con la enfermedad a ser tratada, la edad y peso corporal del paciente, el método de administración, y similares. La dosis normalmente es de 0.001 mg a 1,000 mg, de preferencia de 0.01 mg a 100 mg, y más preferido de 0.1 mg a 10 mg. De preferencia, ésta se administra una vez cada unos pocos días a una vez cada unos pocos meses, pero los expertos en la técnica pueden seleccionar fácilmente las dosis y métodos de administración apropiados, y la selección y optimización de estos parámetros están completamente dentro del alcance de la técnica convencional. La forma de la formulación tampoco está particularmente limitada, y ésta se puede liofilizar, o se puede granular agregando excipientes tales como azúcar.

Los coadyuvantes para incrementar la actividad inductora de células T que responda a tumor que se pueden agrega a los agentes farmacéuticos de la presente invención incluyen componentes de bacterias de BCG y similares, incluyendo muramil-dipéptido (MDP), ISCOM al que se hace referencia en Nature, vol. 344, p873 (1990), QS-21 de la serie de la saponina, descrita en, J. Immunol. vol. 148

000080

(1992), liposomas, e hidróxido de aluminio. Asimismo, también se pueden utilizar como coadyuvantes, inmunoestimulantes tales como lentinan, sizofiran y picibanil. También se pueden utilizar como coadyuvantes citoquinas y similares que incrementen la proliferación y diferenciación de células T, tales como IL-2, IL-4, IL-12, IL-1, IL-6 y TNF, así como CpG y lipopolisacáridos (LPS) que activen el sistema inmune natural al unirse a receptores tipo Toll, y α-galactosilceramida la cual activa las células NKT.

Las composiciones de vacuna de la presente invención incluyen un componente que ceba las células T asesinas. Los lípidos han sido identificados como sustancias que ceban contra antígenos virales *in vivo*. Por ejemplo, se pueden unir residuos de ácido palmítico al grupo ε-amino y al grupo α-amino de un residuo lisina, y después se une a un péptido inmunogénico de la presente invención. Después, el péptido modificado con lípido se puede administrar directamente mediante cualquiera de incorporación en una micela o partícula, encapsulación en un liposoma, o emulsificación en un coadyuvante. Otro ejemplo posible de cebado con lípido es cebar con una lipoproteína de Escherichia coli (*E. coli*), tal como tripalmitoil-S-gliceril-cisteinil-seril-serina (P3CSS), cuando se forma un enlace covalente con un péptido apropiado (Deres K., *et al.*, (1989)

000081

Nature 342:561-4).

Los péptidos inmunogénicos de la presente invención también se pueden expresar utilizando vectores virales o vectores bacterianos. Los ejemplos de vectores de expresión apropiados incluyen hospederos virales con virulencia atenuada, tales como vaccinia o viruela aviar. Por ejemplo, se puede usar un virus vaccinia como un vector para expresar una secuencia de nucleótido que codifique para el péptido. Mediante la introducción de virus vaccinia recombinante en las células hospederas, se expresan péptidos inmunogénicos, y esto induce una respuesta inmune. El método de inmunización utilizando vectores de vaccinia se describe, por ejemplo, en la patente E.U.A. No. 4,722,848. También se puede utilizar el Bacilo de Calmette y Guerin (BCG). Los vectores basados en BCG se describen en Stover CK, *et al.*, (1991) Nature 31:456-60. En la técnica se conoce una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración o inmunización terapéutica, incluyendo vectores de adenovirus y virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores basados en el bacilo de la tifoidea (*Salmonella typhi*), y vectores de toxina de ántrax destoxificado. Véase, por ejemplo, Shata MT, *et al.*, (2000) Mol. Med. Today 6:66-71; Shedlock DJ y Weiner DB., *et al.*, (2000) J. Leukoc. Biol. 68:793-806; y Hipp JD, *et al.*, (2000) In Vivo 14:571-85.

Asimismo, para inducir de manera efectiva células T asesinas en el cuerpo de un paciente, el péptido antigénico se agrega *in vitro* para presentar el antígeno a las células recolectadas a partir de un paciente o a células de otra persona que comparte una parte de un alelo(alo) de HLA, y después las células se administran al paciente por vía intravascular o localmente al tumor. De manera alternativa, después de la inducción de células T asesinas *in vivo* mediante adición del péptido a linfocitos de sangre periférica del paciente y de cultivarlas in vivo, las células se pueden administrar al paciente por vía intravascular o localmente al tumor. Dicho tratamiento mediante transferencia celular ya ha sido puesto en práctica como terapia para el cáncer, y es un método bien conocido entre los expertos en la técnica.

Los tipos de cánceres en la presente invención no están particularmente limitados, y los ejemplos específicos incluyen cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de la tiroides, cáncer de colon, cáncer de páncreas, melanoma maligno, linfoma maligno, osteosarcoma, feocromocitoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de útero, cáncer de ovario, tumores cerebrales, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de

vesícula biliar, cáncer testicular, cáncer de la tiroides, cáncer de vejiga, y sarcoma. Los ejemplos de cánceres para los cuales es apropiada la aplicación de la presente invención de preferencia son cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, o cáncer de pulmón.

(3) Los anticuerpos de la presente invención

La presente invención está dirigida a anticuerpos que reconocen una parte o un péptido completo de la presente invención, mencionado con anterioridad como un epítope (antígeno), y también está dirigida a las células T asesinas que son inducidas mediante estimulación *in vitro* utilizando las proteínas o los péptidos. En general, las células T asesinas demuestran actividad antitumoral más potente que los anticuerpos.

Además, de manera similar a los péptidos de la presente invención, los anticuerpos de la presente invención son útiles como un agente para prevenir y/o tratar cánceres que expresan CDH3, en tanto que éstos puedan inhibir la actividad del antígeno de cáncer CDH3. En un uso práctico, los péptidos o los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar por sí solos o con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, con un coadyuvante si

fuera necesario, mediante inyección o mediante absorción transdérmica a través de las membranas mucosas mediante asperjado o método similar. Más específicamente, la seroalbúmina de humano se puede ejemplificar como un vehículo mencionado en la presente solicitud, y PBS, agua destilada y similares se pueden ejemplificar como un diluyente.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales, y se pueden producir utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, los anticuerpos policlonales se pueden obtener inmunizando especies de mamíferos o aves con un péptido de la presente invención como un antígeno, recolectando sangre de las especies de mamíferos o aves, y separando y purificando los anticuerpos de la sangre recolectada. Por ejemplo, se pueden inmunizar especies de mamíferos, tales como ratones, hámsters, cobayos, ratas, conejos, perros, cabras, ovejas y bovinos, o especies de aves, tales como el pollo. Los métodos de inmunización son conocidos por los expertos en la técnica, y el antígeno se puede administrar, por ejemplo, dos o tres veces a intervalos de 7 a 30 días. La dosis puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0.05 mg a 2 mg de antígeno por administración. La ruta de administración se puede

seleccionar apropiadamente a partir de administración por vía subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, y similares, pero sin estar limitado a ninguna de las mismas. Asimismo, el antígeno se puede usar después de disolverlo en una solución amortiguadora apropiada, por ejemplo, una solución amortiguadora que contenga un coadyuvante convencional, tal como el coadyuvante completo de Freund o hidróxido de aluminio.

Las especies de mamíferos o aves inmunizadas se pueden criar durante un cierto período de tiempo y, cuando se haya incrementado el título de anticuerpos, éstos se pueden inmunizar adicionalmente, por ejemplo, con 100 µg a 1,000 µg del antígeno. La sangre se recolecta de las especies de mamíferos o aves inmunizadas uno a dos meses después de la última administración, y la sangre se puede separar y purificar utilizando métodos convencionales, tales como centrifugación, precipitación utilizando sulfato de amonio o polietilenglicol, y cromatografía, tal como cromatografía por filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía por afinidad, para obtener los anticuerpos policlonales que reconocen los péptidos de la presente invención como un antisuero policlonal.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener preparando hibridomas. Por ejemplo, los hibridomas se pueden

obtener por medio de fusión celular de células productoras de anticuerpo con líneas de célula de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden obtener mediante métodos de fusión celular como los que se indican más adelante.

Como células productoras de anticuerpos se usan células de bazo, células de nodos linfáticos, linfocitos B, y similares, obtenidos de los animales inmunizados. Los péptidos de la presente invención se usan como un antígeno. Se pueden utilizar animales tales como ratón y rata como animales inmunizados, y la administración de antígenos a estos animales se puede realizar utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, los animales se inmunizan administrando varias veces por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, y similares, una suspensión o una emulsión de un péptido de la presente invención, el cual es un antígeno, y un coadyuvante, tal como coadyuvante completo de Freund o coadyuvante incompleto de Freund. Las células productoras de anticuerpo tales como células de bazo se obtienen a partir de animales inmunizados y se puden fusionar con células de mieloma utilizando métodos conocidos (G. Kohler *et al.*, Nature, 256, 495 (1975)) para generar hibridomas.

Los ejemplos de líneas de células de mieloma que se

pueden utilizar para la fusión celular incluyen las células P3X63Ag8, P3U1 y Sp2/0 de ratón, y similares. Para la fusión celular se usa un agente promotor de fusión tal como polietilenglicol y virus Sendai, y se usa un medio de hipoxantina/aminopterina/timidina (HAT) para seleccionar los hibridomas después de la fusión celular utilizando un método convencional. Los hibridomas obtenidos por fusión celular se clonan con un método tal como el método de dilución limitante. Según se necesite, las líneas de células que producen anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente los péptidos de la presente invención se pueden obtener mediante tamizaje utilizando un método de inmunoensayo con enzima usando los péptidos de la presente invención.

Además de los métodos anteriores, las células inmunizadas se pueden preparar estimulando linfocitos humanos, tales como linfocitos infectados con el virus EB, *in vitro,* usando los péptidos de la presente invención, células que expresan los péptidos, o lisados de las mismas. Los anticuerpos humanos que se unen a los péptidos de la presente invención también se pueden obtener fusionando dichos linfocitos inmunizados con células de médula ósea derivadas de humano, tales como U266 (Publicación de Solicitud de Patente Japonesa *Kokai* N° (JP-A) S63-17688 (solicitud de

patente japonesa publicada no examinada)).

Con el fin de producir los anticuerpos monoclonales deseados a partir de los hibridomas obtenidos de esta manera, los hibridomas se pueden cultivar utilizando métodos de cultivo convencionales o con métodos formadores de ascitis, y los anticuerpos monoclonales se pueden purificar a partir del sobrenadante de cultivo o los ascitis. La purificación de los anticuerpos monoclonales a partir de los sobrenadantes de cultivo o ascitis se puede realizar mediante los métodos convencionales. Por ejemplo, se puede utilizar fraccionamiento con sulfato de amonio, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por afinidad, y similares, en combinación según sea necesario.

Asimismo, también se pueden inmunizar animales transgénicos que tengan un grupo de genes de anticuerpos humanos usando los péptidos de la presente invención, células que expresan los péptidos, o lisados de las mismas. Las células productoras de anticuerpos se pueden recolectar a partir de los animales transgénicos inmunizados para obtener hibridomas mediante fusión con las líneas de células de mieloma antes descritas. Después se pueden producir los anticuerpos monoclonales deseados a partir de los hibridomas (WO92-03918; WO94-02602; WO94-25585; WO94-33735; WO96-34096).

De manera alternativa, las células inmunes

000089

productoras de anticuerpos, tales como los linfocitos inmunizados, también se pueden inmortalizar usando oncogenes para preparar anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos de esta manera también se pueden modular usando una tecnología de manipulación de genes (Borrbaeck y Larrick, (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies). Por ejemplo, los anticuerpos recombinantes se pueden preparar clonando un ADN que codifica para un anticuerpo proveniente de células productoras de anticuerpos, tales como hibridomas y linfocitos inmunizados, insertándolo en un vector apropiado, e transfectando dicho vector en células hospederas.

Los anticuerpos de la presente invención también puede ser fragmentos de anticuerpo o anticuerpos modificados en tanto que éstos se unan a los péptidos de la presente invención. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser Fab, F(ab')2, Fv, o Fv de cadena individual (scFv), en el cual los fragmentos Fv derivados de las cadenas H y L están unidos entre sí con un enlazador apropiado (Huston *et al.*, (1998) Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83). Más específicamente, los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar tratando los anticuerpos con una enzima tal como papaína y pepsina (Co *et al.*, (1994) J Immunol 152:2968-76; Better y Horwitz, (1989) Methods Enzymol 178: 476-96; Pluckthun y Skerra, (1989)

000090

Métodos Emzymol 178:497-515; Lamoyi (1986) Methods Enzymol 121:652-63; Rousseaux *et al.*, (1986) Methods Enzymol 121:663-9; Bird y Walker, (1991) Trends Biotech 9:132-7).

Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos modificados que se obtienen ligando diversas moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). Los anticuerpos se pueden modificar utilizando métodos convencionales de modificación química conocidos en el campo técnico.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos que incluyen una región variable obtenida a partir de un anticuerpo no humano y una región constante obtenida a partir de un anticuerpo humano, y anticuerpos humanizados que incluyen una región determinante de complementariedad (CDR) obtenida a partir de un anticuerpo no humano, una región de marco (FR) obtenida a partir de un anticuerpo humano y una región constante obtenida a partir de un anticuerpo humano. Dichos anticuerpos se pueden preparar mediante métodos convencionales conocidos en el campo técnico. Los anticuerpos humanizados se obtienen sustituyendo la región de la secuencia de CDR de un anticuerpo humano con una región CDR de roedor que tiene la actividad de unión deseada (Verhoeyen *et al.*, (1988) Science 239:1534-6). Por consiguiente, comparados con los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados son anticuerpos en los cuales una

000091

región más pequeña del anticuerpo de humano se sustituye con una región correspondiente de origen no humano.

También se puede preparar un anticuerpo humano completo que tenga una región variable humana además de la región de marco y la región constante humanas. Por ejemplo, en un método *in vitro*, el tamizaje se puede realizar usando una genoteca recombinante de bacteriófagos que despliegan fragmentos de anticuerpo humano (Hoogenboom y Winter, (1992) J Mol Biol 227:381-8). De manera similar, se pueden producir anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos cuyos genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados (US6,150,584, US5,545,807, US5,545,806, US5,569,825, US5,625,126, US5,633,425, US5,661,016).

Los anticuerpos obtenidos como se mencionó con anterioridad se pueden purificar hasta homogeneidad utilizando métodos convencionales conocidos en el campo técnico. Por ejemplo, se pueden utilizar métodos comunes de separación y purificación de proteínas. Los anticuerpos se pueden separar y purificar mediante una combinación de cromatografía en columna, tal como cromatografía de afinidad, filtración, ultrafiltración, desalado, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, electroforesis de enfoque isoeléctrico, y similares; sin

000092

embargo, los métodos de separación y purificación no están limitados a estos métodos (Antibodies: A Laboratory Manual, Editado por Harlow y David Lane, (1988) Cold Spring Harbor Laboratory). Pueden usarse columnas de proteína A y columnas de proteína G como columnas de afinidad. La columna de proteína A puede ser, por ejemplo, HyperD, POROS y Sefarosa F.F (Pharmacia).

La cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía hidrofóbica, la filtración en gel, la cromatografía de fase inversa, la cromatografía de adsorción, y similares, son ejemplos de métodos de cromatografía alternativos a la cromatografía de afinidad (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Editado por Daniel R. *et al.*). Como cromatografía también puede usarse cromatografía líquida tal como HPLC y FPLC.

La afinidad de unión a antígeno de los anticuerpos de la presente invención puede medirse usando, por ejemplo, determinación de absorbancia, prueba de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) y prueba de inmunofluorescencia; sin embargo, los métodos no se limitan a estos métodos. Para la prueba ELISA, los anticuerpos de la presente invención se inmovilizan en una placa, se agregan los péptidos de la

presente invención, y luego se agrega una muestra que contiene un sobrenadante de cultivo de células productoras de anticuerpo o anticuerpos purificados. En el siguiente paso, se agrega un anticuerpo secundario que tiene una marca detectable y que reconoce al anticuerpo cuya afinidad de unión a antígeno ha de medirse. Después de lavar la placa, se agregan reactivos para detectar la marca en el anticuerpo secundario y se determina la absorbancia o similares. Por ejemplo, se pueden utilizar enzimas tales como fosfatasa alcalina, como una marca para el anticuerpo secundario, y se pueden utilizar substratos para enzima, tales como fosfato de *p*-nitrofenilo, como un reactivo para la detección. También se puede itilizar BIAcore (Pharmacia) para evaluar la actividad de los anticuerpos.

Los anticuerpos de la presente invención pueden detectar los péptidos de la presente invención contenidos en las muestras. En específico, se puede confirmar la presencia de los péptidos de la presente invención en tejidos cancerosos, por ejemplo, exponiendo especímenes de biopsias de tejidos cancerosos a los anticuerpos de la presente invención.

Antes del paso de tratamiento y/o prevención del cáncer mediante el uso de los péptidos de la presente invención, es posible predecir cuáles individuos podrán ser

000094

tratados efectivamente antes de iniciar el tratamiento, confirmando la expresión de los péptidos de la presente invención en el cáncer que ha de tratarse utilizando los anticuerpos de la presente invención.

Asimismo, debido a que los anticuerpos de la presente invención reconocen fragmentos de péptido de CDH3 cuya expresión se halla incrementada en diversas células cancerosas, se espera que éstos se puedan aplicar no solamente para diagnóstico, sino también para tratamiento.

(4) Células T auxiliares, células T asesinas o grupos de inmunocitos que las comprenden

La presente invención también está dirigida a células T auxiliares, células T asesinas o grupos de inmunocitos que las comprenden, inducidas por medio de una estimulación *in vitro* usando los péptidos de la presente invención. Por ejemplo, las células T activadas reactivas contra el tumor se inducen cuando se estimulan *in vitro* linfocitos de sangre periférica o linfocitos capaces de infiltrar el tumor utilizando los péptidos de la presente invención, y estas células T activadas se pueden utilizar de manera efectiva para la inmunoterapia adoptiva. Además, las células dendríticas las cuales son células presentadoras de antígeno potentes, se pueden pulsar con los péptidos de la

presente invención o pueden transformarse genéticamente para que los expresen, y luego se pueden utilizar para estimular las células T *in vivo* o *in vitro* e inducir respuestas inmunes antitumorales.

De preferencia, las células T auxiliares, las células T asesinas o los grupos de inmunocitos que las comprenden se pueden inducir por medio de una estimulación *in vitro* usando los péptidos de la presente invención y un inmuno-estimulador. El inmuno-estimulador de la presente solicitud incluye factores de crecimiento celular o citoquinas.

Los tumores se pueden suprimir y los cánceres se pueden evitar y/o tratar mediante la transfusión en el cuerpo de células T auxiliares, células T asesinas o los grupos de inmunocitos que las comprenden, obtenidos como se describió con anterioridad.

Las células T auxiliares, las células T asesinas o los grupos de inmunocitos que las comprenden, que pueden suprimir tumores como se describió con anterioridad, también se pueden preparar usando los péptidos de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención provee un medio de cultivo para células que contiene los péptidos de la presente invención. Las células T auxiliares, las células T asesinas o los grupos de inmunocitos que las comprenden, que

pueden suprimir tumores, se pueden preparar usando este medio de cultivo para células. Asimismo, la presente invención provee un estuche de cultivo celular que contiene el medio de cultivo para células descrito con anterioridad y un recipiente para el cultivo de las células para producir células T auxiliares, células T asesinas o grupos de inmunocitos que las incluyen.

(5) Exosoma presentador de antígenos

La presente invención también provee vesículas endocíticas denominadas "exosomas" las cuales presentan en su superficie un complejo formado entre un péptido de la presente invención y un antígeno HLA. Los exosomas se pueden preparar, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en detalle en la traducción japonesa, por ejemplo, de la Publicación de Solicitud de Patente Japonesa Kohyo N° (JP-A) H11-510507 (publicación japonesa en fase nacional no examinada que corresponde a una publicación internacional no japonesa) y JP-A (Kohyo) 2000-512161. De preferencia, éstos se pueden preparar usando células presentadoras de antígeno obtenidas de un individuo objetivo para tratamiento y/o prevención. Los exosomas de la presente invención se pueden inyectar como una vacuna contra el cáncer, de manera similar a los péptidos de la presente invención.

El tipo de antígeno HLA usado en la presente invención debe coincidir con el tipo de antígeno HLA del individuo que necesita del tratamiento y/o prevención. Un ejemplo es HLA-A2, y de preferencia, es HLA-A2 (HLA-A*0201). "HLA-A2" significa una proteína, mientras que "HLA-A*0201" significa un gen que corresponde a un segmento de la proteína (este término se usa porque no hay términos disponibles en la actualidad que representen segmentos de la proteína).

(6) Métodos para inducir células presentadoras de antígeno y células T asesinas

La presente invención provee métodos para inducir células presentadoras de antígeno usando uno o más péptidos de la presente invención. Las células presentadoras de antígeno pueden inducirse pulsando células dendríticas inducidas a partir de monocitos de sangre periférica con uno o más péptidos de la presente invención para estimular las células. Cuando los péptidos de la presente invención se administran a un individuo, se pueden inducir células presentadoras de antígeno que presenten los péptidos de la presente invención en sus superficies en el cuerpo del individuo. De manera alternativa, después de poner en contacto las células presentadoras de antígeno con los péptidos de la presente invención (o después de pulsar las

células presentadoras de antígeno con los péptidos de la presente invención), las células se pueden administrar al individuo como una vacuna usando un método *ex vivo*. Por ejemplo, la administración *ex vivo* puede incluir los siguientes pasos:

(1) recolectar las células presentadoras de antígeno a partir de un individuo; y

(2) poner en contacto las células presentadoras de antígeno del paso (1) con los péptidos de la presente invención (o pulsar las células presentadoras de antígeno del paso (1) con los péptidos de la presente invención).

Las células presentadoras de antígeno obtenidas en el paso (2) se pueden administrar a un individuo como una vacuna.

La presente invención también provee métodos para inducir células presentadoras de antígeno que tienen un nivel elevado de actividad inductora de células T asesinas. Los métodos incluyen un paso de transfectar *in vitro* un gen que incluye un polinucleótido que codifica para uno o más péptidos en células presentadoras de antígeno. El gen a transfectar puede ser ADN o ARN. Como método para la transfección, se pueden utilizar apropiadamente varios métodos, los cuales se utilizan convencionalmente en la técnica, tales como, sin limitaciones, lipofección,

electroporación y una método del fosfato de calcio. Más específicamente, la transfección puede realizarse como se describe en Reeves ME, *et al.*, (1996) Cancer Res., 56:5672-7; Butterfield LH, *et al.*, (1998) J. Immunol., 161:5607-13; Boczkowski D, *et al.*, (1996) J Exp. Med., 184:465-72; y en la traducción japonesa publicada del documento WO2000-509281. Cuando los genes se transfectan a las células presentadoras de antígeno, éstos se transcriben y se traducen en las células. Posteriormente, las proteínas obtenidas de este modo se procesan a lo largo de las rutas del MHC clase I o clase II y son presentadas, mediante la ruta de presentación de antígeno, sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno, como péptidos parciales.

La presente invención también provee métodos para inducir células T asesinas usando uno o más péptidos de la presente invención. Al administrarle al individuo uno o más péptidos de la presente invención, pueden inducirse células T asesinas en el cuerpo del individuo, incrementando de esta manera el sistema inmune, el cual elige como blanco células cancerosas que presentan CDH3 en los tejidos tumorales. De manera alternativa, pueden inducirse células T asesinas activadas poniendo en contacto células presentadoras de antígeno provenientes de un individuo y células CD8-positivas con uno o más péptidos de la presente invención *in vitro*, y

poniendo en contacto posteriormente leucocitos mononucleados de sangre periférica con las células presentadoras de antígeno *in vitro* para estimular las células. En los métodos de tratamiento *ex vivo*, el sistema inmune que ataca las células cancerosas que presentan CDH3 en los tejidos tumorales del individuo puede potenciarse reintroduciendo las células T asesinas activadas en el individuo. Por ejemplo, los métodos incluyen los siguientes pasos:

(1) recolectar células presentadoras de antígeno de un individuo;

(2) poner en contacto las células presentadoras de antígeno del paso (1) con los péptidos de la presente invención (o pulsar las células presentadoras de antígeno del paso (1) con los péptidos de la presente invención);

(3) mezclar y co-cultivar las células presentadoras de antígeno del paso (2) con células T $CD8^+$ para inducir células T citotóxicas; y

(4) recolectar células T $CD8^+$ a partir del co-cultivo del paso (3).

Las células T $CD8^+$ que tienen actividad citotóxica obtenidas en el paso (4) se pueden administrar a un individuo como una vacuna.

La presente invención también provee células T asesinas aisladas que han sido inducidas usando uno o más

péptidos de la presente invención. De preferencia, las células T asesinas inducidas con el método de la presente invención se obtienen a partir del individuo que ha de recibir el tratamiento y/o la prevención. Estas se pueden administrar en combinación con otros agentes incluyendo células presentadoras de antígeno, o exosomas que presentan uno o más péptidos de la presente invención. Las células T asesinas obtenidas son específicas para las células blanco que presentan un péptido que es igual al usado para la inducción. Las células blanco son aquellas que expresan CDH3 de manera endógena, o aquellas transfectadas con el gen de CDH3. Las células que presentan los péptidos de la presente invención en sus superficies mediante estimulación con los péptidos de la presente invención, tales como las células cancerosas de cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer testicular, cáncer cervical, osteosarcoma y sarcoma de tejido blando, pueden ser blancos de los ataques.

La presente invención también provee células presentadoras de antígeno que presentan un complejo formado entre el antígeno HLA y uno o más péptidos de la presente invención. Las células presentadoras de antígeno que expresan uno o más péptidos de la presente invención, o nucleótidos

que codifican para dichos péptidos, de preferencia se recolectan a partir del individuo que ha de recibir el tratamiento y/o la prevención. Los péptidos de la presente invención, las células presentadoras de antígeno que presentan los péptidos, los exosomas o las células T asesinas activadas se pueden administrar como una vacuna en combinación con otros agentes.

Las presentes invenciones se explican con mayor detalle en los ejemplos descritos a continuación. Sin embargo, éstas no están limitadas a dichos ejemplos.

Todas las referencias de técnica antecedente citadas en la presente descripción quedan incorporadas en la misma para referencia.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Expresión de CDH3 en tumores malignos

De conformidad con análisis de microarreglo de ADNc realizados con anterioridad, la expresión de CDH3 se incrementó en diversos tumores malignos, incluyendo cáncer gástrico, cáncer de intestino grueso, y similares, en comparación con la expresión en los tejidos normales

adyacentes (Tabla 1) (Nakamura T, *et al.*, Oncogene 2004;23:2385-2400., Kitahara O, Cancer Res 2001;61:3544-3549., Obama K, *et al.* Hepatology 2005;41:1339-1348.).

TABLA 1

	n	Tasa positiva* (%)	Relación de expresión relativa (promedio)
Cáncer de páncreas	16/16	100	1,900,000
Cáncer testicular	10/10	100	396,000
Tumor de tejido blando	21/21	100	248,000
Carcinoma colangiocelular	19/19	100	3,600
Cáncer de pulmón de célula no pequeña	35/37	95	73,000
Cáncer colorrectal	31/34	91	84,000
Cáncer cervical	14/19	74	1,500
Cáncer gástrico	20/28	71	35,000
Cáncer de vejiga urinaria	24/34	71	30
Cáncer de pulmón de célula pequeña	3/14	21	7
Cáncer de mama	5/81	6	1
Cáncer de próstata	2/57	4	1,500
Carcinoma de célula renal	0/20	0	0
Cáncer de esófago	0/19	0	2

*"Positivos" quiere decir cuando la relación de expresión relativa (cáncer/tejido normal) es > 5.

EJEMPLO 2

Selección de un repertorio de péptidos de CDH3 con afinidad de unión para HLA-A2

Se investiga la secuencia de aminoácido de CDH3 humano usando el sistema BIMAS, y se seleccionan 18 péptidos en orden descendiente de afinidad de unión para HLA-A2 esperada (Tabla 2).

TABLA 2

Posiciones de los Péptidos	Secuencias de aminoácidos de los péptidos	Calificaciones de afinidad de unión
659-667 de CDH3-1	VLGAVLALL	(SEQ ID NO: 3)
629-637 de CDH3-2	QLTVIRATV	(SEQ ID NO: 4)
602-610 de CDH3-3	VVLSLKKFL	(SEQ ID NO: 5)
655-663de CDH3-4	**FILPVLGAV**	(SEQ ID NO: 1)
419-427 de CDH3-5	KLPTSTATI	(SEQ ID NO: 6)
564-572 de CDH3-6	VLNITDKDL	(SEQ ID NO: 7)
757-765 de CDH3-7	**FIIENLKAA**	(SEQ ID NO: 2)
187-195 de CDH3-8	AVSENGASV	(SEQ ID NO: 8)
152-160 de CDH3-9	SPPEGVFAV	(SEQ ID NO: 9)
228-237 de CDH3-10	VLPGTSVMQV	(SEQ ID NO: 10)
500-509 de CDH3-11	TLDREDEQFV	(SEQ ID NO: 11)
419-428 de CDH3-12	KLPTSTATIV	(SEQ ID NO: 12)
440-449 deCDH3-13	FVPPSKVVEV	(SEQ ID NO: 13)
66-75 de CDH3-14	FSTDNDDFTV	(SEQ ID NO: 14)
2-11 de CDH3-15	GLPRGPLASL	(SEQ ID NO: 15)

Tabla 2 (cont.)

Posiciones de los Péptidos	Secuencias de aminoácidos de los péptidos		Calificaciones de afinidad de unión
101-110 de CDH3-16	ILRRHKRDWV	(SEQ ID NO: 16)	24
223-232 de CDH3-17	SVLEGVLPGT	(SEQ ID NO: 17)	23
655-664 deCDH3-18	FILPVLGAVL	(SEQ ID NO: 18)	20

Los epítopes de las células T asesinas restringidos por HLA-A2 identificados en la presente invención se muestran subrayados.

EJEMPLO 3

Primero, se inducen células dendríticas (DC) provenientes de células de médula ósea de ratones transgénicos HLA-A2 usando el método descrito con anterioridad (Komori H *et al.* Clinical Cancer Research 12: 2689-2697, 2006). Posteriormente, las BM-DC obtenidas de esta manera se pulsan con péptidos de CDH3 (10 µM), y después se administran por vía intraperitoneal a ratones transgénicos HLA-A2 a 5 x 10^5 células/ratón. Después de la inmunización, que se efectuó con dos administraciones a intervalos semanales, se recolectan las células de bazo de ratón y se utilizan para detección de células T asesinas. Con el fin de detectar exactamente la inducción de células T asesinas

derivadas de células T CD8+, se usaron células de bazo que se preparan eliminando las células T CD4+ utilizando glóbulos MACS después de la remoción del bazo.

La Figura 1 muestra el protocolo para determinar los péptidos de CDH3 reconocidos por células T asesinas restringidas por HLA-A2 en ratones transgénicos HLA-A2 . El día en que se recolectan las células de bazo a partir de los ratones inmunizados se fija como "Día 0".

Día 21: (1) La inducción de células dendríticas derivadas de médula ósea (denominadas de aquí en adelante "BM-DC") se inicia con la adición de GM-CSF a células de médula ósea de ratones transgénicos HLA-A2.

Día 14: (2) Se agrega una mezcla de tres tipos de péptidos de CDH3 a las BM-DC inducidas. Después de dos horas, las BM-DC se administran por vía intraperitoneal a razón de 5 x 10^5 células/ratón.

Se repiten (1) y (2) dos veces a intervalo semanales.

Día 0: Las células de bazo se recolectan a partir de ratones transgénicos HLA-A2 inmunizados y se co-cultivan con las BM-DC, las cuales se incuban nuevamente con péptido de CDH3 durante dos horas, y se cultivan durante seis días.

Día 6: Para detectar las células T asesinas que reconocen específicamente los péptidos de CDH3, las células T

que producen interferón gamma (INF-γ) se cuantifican con una prueba ELISPOT después de la estimulación antigénica. Las BM-DC pulsadas con péptidos de CDH3 y las BM-DC no pulsadas se utilizan como células blanco.

Investigación de la actividad de células T asesinas específicas para CDH3 con la prueba ELISPOT

Para confirmar que realmente existen células T asesinas que reaccionan específicamente con CDH3 para producir IFN-γ entre estas células, se efectúa una investigación utilizando una prueba ELISPOT. El IFN-γ se detecta usando un conjunto de elementos ELISPOT para IFN-γ de ratón (BD Biosciences). Cuando las células T asesinas (efectoras) responden a las células estimuladoras (blancos) y producen INF-γ, el IFN-γ se puede detectar como manchas rojas. Se utilizan como células blanco BM-DCs o BM-DCs pulsadas con péptido de CDH3. Primero, se reviste una placa ELISPOT (BD Biosciences) con un anticuerpo anti-IFN-γ de ratón durante 18 horas, y después se bloquea utilizando 10% de FCS/RPMI durante dos horas. Las células efectoras (100 µl/cavidad) y las células blanco (100 µl/cavidad) se mezclan y cultivan durante 22 horas a 37°C. El experimento se efectúa a una relación efector/blanco (relación E/T) de 10:1. Después, se

daba la placa con agua esterilizada, se hace reaccionar con con anticuerpo anti-IFN-γ de ratón conjugado con biotina durante dos horas, y y después se hace reaccionar con estreptavidina-HRP durante una hora. Las manchas positivas para IFN-γ se detectan en solución de substrato. Se utiliza el software de auto-análisis de MINERVA TECH para contar las manchas. Como resultado, se observa la respuesta inmunológica de célula T asesina específica para CDH3 para las células T asesinas inducidas con los péptidos CDH3-4 o CDH3-7, mientras que no se observa una respuesta inmunológica específica para CDH3 para las células T asesinas inducidas con otros péptidos (figura 2 y figuras 3A-3C).

Los resultados de la prueba ELISPOT en células T asesinas inducidas con el péptido CDH3-4 (SEQ ID NO: 1) y el péptido CDH3-7 (SEQ ID NO: 2) se muestran en las figuras 3A-3C.

Las células T asesinas muestran 283.7 ± 40.0 manchas/cavidad en respuesta a las BM-DC pulsadas con el péptido CDH3-4 (SEQ ID NO: 1), mientras que éstas muestran 48.7 ± 11.9 manchas/cavidad en presencia de BM-DCs sin pulsación de péptido ($P < 0.05$). Del mismo modo, las células T asesinas muestran 79.3 ± 3.2 manchas/cavidad en respuesta a las BM-DC pulsadas con el péptido CDH3-7 (SEQ ID NO: 2), mientras que éstas muestran 42.7 manchas/cavidad en presencia

de BM-DC sin pulsación de péptido ($P < 0.05$).

Análisis estadístico

Se utiliza una prueba *t* de Student de dos colas para evaluar la significancia estadística en los datos obtenidos con la prueba ELISPOT y en el tamaño de los tumores entre los grupos de tratamiento. Se considera que un valor de $P < 0.05$ es significativo. El análisis estadístico se efectúa usando un paquete de software estadístico disponible comercialmente (SPSS para Windows (TM), versión 11.0, Chicago, IL, EEUU).

EJEMPLO 4

Líneas celulares y expresión de HLA

La línea de células de cáncer de páncreas humano PANC1, la línea de células de cáncer oral HSC3 y la línea de células deficientes en TAP y positivas para HLA-A2 (A*0201) T2 usadas para la evaluación de la actividad citotóxica se adquirieron en Riken Cell Bank (Tsukuba, Japón). La línea de células de cáncer de páncreas humano PK8 fue proporcionada gentilmente por el Centro de Recursos Celulares para Investigación Biomédica, Instituto del Desarrollo, Envejecimiento y Cáncer, Universidad de Tohoku. La línea de células de cáncer de colon humano HCT116 fue proporcionada

gentilmente por el Dr. B. Vogelstein, Universidad Johns Hopkins (Baltimore, MD, EEUU). La línea de células de cáncer de hígado humano SKHep1 fue proporcionada gentilmente por el profesor Kyogo Ito, Universidad de Kurume (Kurume, Japón). La expresión de HLA-A2 se examina mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-HLA-A2, BB7.2 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, EEUU) para seleccionar los donadores de sangre HLA-A2-positios y las líneas de células blanco para las pruebas de citotoxicidad. Estas células se mantuvieron en medio RPMI 1640 o DMEM complementado con 10% de suero fetal de bovino (FCS) en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C.

Transferencia del gen lentiviral

La transferencia de gen mediada por vector lentiviral se efectúa como se describió con anterioridad (Tahara-Hanaoka S, *et al.* Exp Hematol 2002;30:11-17). Brevemente, se transfectan 17 µg de vectores auto-inactivantes CSII-CMV-RfA y CSIIEF-RfA (Miyoshi H, *et al.* J Virol 1998; 72:8150-8157) que portan moléculas de ADNc de CDH3 y 10 µg de pCMV-VSV-G-RSV-Rev y pCAG-HIVgp al interior de células 293T cultivadas en una placa de cultivo de 10 cm utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EEUU). Después de 60 horas, se recupera el

medio de cultivo y las partículas virales se transforman en comprimidos mediante ultracentrifugación (50000 x g, dos horas). El comprimido se suspende en 50 µl de medio RPMI 1640 y se agregan 10 µl de suspensión viral a células PANC1 o células SKHep1, las cuales se sembraron en una placa de 96 cavidades de fondo plano a razón de 5 x 10^4 células por cavidad. La expresión de CDH3 transfectado se confirma mediante análisis de Western blot.

Inducción de CTLs humanos reactivos contra CDH3

Se aislan PBMCs derivadas de sangre heparinizada de pacientes con cáncer de páncreas, pacientes con cáncer gástrico, pacientes con cáncer colorrectal o donadores sanos HLA-A2-positivos mediante centrifugación con gradiente de densidad de Ficoll-Conray. Las DCs derivadas de células mononucleadas periféricas (monocitos) se preparan utilizando el método previamente reportado (Yoshitake Y, *et al.* Clin. Cancer Res. 2004; 10:6437-6448, Komori H, *et al.* Clin. Cancer Res. 2006; 12:2689-2697). Las DCs se pulsan con 20 µg/ml de un péptido candidato en presencia de 4 µg/ml de β2-microglobulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) durante dos horas a 37°C, en AIM-V (Invitrogen) que contiene 2% de plasma autólogo inactivado con calor. Después, estas DCs se irradian (40 Gy) y se incuban con células T CD8-positivas.

000112

La incubación se lleva a cabo en placas de 24 cavidades, las cuales se preparan de modo tal que cada una contenga en cada cavidad 2 ml de AIM-V complementado con 2% de plasma autólogo, 1 x 10^5 DCs pulsadas con péptido, 2 x 10^6 células T CD8+ y 5 ng/ml de IL-7 recombinante de humano (Wako, Osaka, Japón). Después de dos días, estos cultivos se complementan con IL-2 recombinante de humano (PeproTec Inc.) hasta una concentración final de 20 IU/ml. El día 7 y el día 14, se efectúan dos estimulaciones semanales adicionales con las mismas DCs autólogas pulsadas con péptido utilizando el mismo procedimiento. Seis días después de la última estimulación, se evalúan las respuestas específicas de antígeno de los CTLs inducidos utilizando una prueba de liberación de ^{51}Cr y una prueba ELISPOT para INF-γ. Varias células de cáncer o células T2 pulsadas con péptido (5 x 10^3 células/cavidad) utilizadas como células blanco se co-cultivan con los CTLs a una relación efector/blanco apropiada para efectuar la prueba de liberación de ^{51}Cr utilizando un método conocido (Komori H, *et al.*, Clin. Cancer Res. 2006; 12:2689-2697).

Se intenta la inducción de CTL específico de CDH3 a partir de PBMCs de donadores sanos HLA-A2-positivos y diversos pacientes con cáncer mediante estimulación con los péptidos CDH3-$4_{655-663}$ y CDH3-$7_{757-765}$. Las células T CD8+

seleccionadas entre las PBMC se incuban con DCs derivadas de células mononucleadas autólogas (monocitos) pulsadas con cada péptido. Después de tres estimulaciones, se evalúa el efecto citocida contra las células T2 pulsadas con péptido utilizando una prueba de liberación de ^{51}Cr (Figura 4A) y una prueba ELISPOT para INF-γ. Los CTLs inducidos a partir de PBMCs de donadores sanos presentan un efecto citocida contra las células T2 pulsadas con péptido CDH3-$4_{655-663}$ o péptido CDH3-$7_{757-765}$, pero no contra las células T2 sin pulsación de péptido. Se observan respuestas similares con respecto a otros donadores. Estos resultados indican que estos CTLs tienen citotoxicidad específica de péptido.

Después, se evalúa la actividad citotóxica de estos CTLs contra líneas de células cancerosas humanas que expresan CDH3 y HLA-A2. Como se muestra en la Figura 4B, los CTLs reactivos contra CDH3 estimulados con el péptido CDH3-$4_{655-663}$ presentaron citotoxicidad en donadores sanos contra HCT116 (CDH3+, HLA-A2+), HSC3 (CDH3+, HLA-A2+) y PANC1/CDH3 (CDH3+, HLA-A2+), en los cuales el gen de CDH3 se transfectó en células PANC1; sin embargo, éstos no presentan el mismo efecto hacua PANC1 (CDH3-, HLA-A2+), SKHep1 (CDH3-, HLA-A2+) y PK8 (CDH3+, HLA-A2-). De manera similar, los CTLs estimulados con el péptido CDH3-$7_{757-765}$ presentan citotoxicidad hacia HSC3, pero no hacia PANC1, PK8 o SKHep1.

000114

Estas actividades citotóxicas se observan para CTLs derivados de pacientes afectados por diversos cánceres (Figura 4C).

Con el objeto de confirmar si estos péptidos pueden ser procesados o no a partir de la proteína CDH3 bajo condiciones naturales, se utilizan PANC1/CDH3 y SKHep1/CDH3 (CDH3+, HLA-A2+), an las cuales el gen de CDH3 se transfecta en células SKHep1, como células blanco. Como se muestra en la Figura 4C, los CTLs inducidos mediante estimulación con el péptido CDH3-$4_{655-663}$ o con el péptido CDH3-$7_{757-765}$ presentan citotoxicidad contra HCT116, PANC1/CDH3 y SKHep1/CDH3, pero no contra PANC1, SKHep1 y PK8. Los resultados anteriores sugieren que estos péptidos son procesados y presentados sobre la superficie de las células cancerosas con moléculas HLA-A2 bajo condiciones naturales. Los CTLs reactivos contra CDH3 tienen citotoxicidad específica para las células cancerosas que expresan ambas moléculas CDH3 y HLA-A2 endógenas.

Confirmación de la restricción por HLA clase I

Para confirmar si los CTLs inducidos pueden reconocer o no las células blanco en una manera restringida por HLA clase I, se incuban células cancerosas blanco con 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-HLA clase I (W6/32) o con

10 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR (H-DR-1) durante una hora, antes del co-cultivo de los CTLs y una línea de células cancerosas para la prueba de liberación de ^{51}Cr o la prueba ELISPOT, y se examinan los efectos de los anticuerpos monoclonales sobre la actividad citotóxica de los CTL o la producción de IFN-γ utilizando un método conocido (Gomi S, *et al.* J Immunol 1999; 163:4994-5004). Como resultado, el anticuerpo anti-HLA clase I puede inhibir la producción de IFN-γ con significancia estadística en la prueba ELISPOT para CTLs generados mediante estimulación con el péptido CDH3-$4_{655-663}$ contra SKHep1/CDH3 (Figura 4D, izquierda, $P < 0.01$). Este también puede inhibir la actividad citotóxica contra HCT116 en la prueba de liberación de ^{51}Cr (Figura 4D, centro). De manera similar, el anticuerpo anti-clase I puede inhibir la producción de INF-γ con significancia estadística en la prueba ELISPOT para CTLs generados mediante estimulación con el péptido CDH3-$7_{757-765}$ contra células HSC3 (Figura 4D, derecha, $P < 0.01$). Estos resultados indican que los CTLs inducidos reconocen las células blanco que expresan CDH3 en una manera restringida por HLA clase I.

000116

EJEMPLO 5

Inmunoterapia adoptiva

Actividad anti-cáncer *in vivo* de CTL humanos inducidos por CDH3 utilizados para la inmunización adoptiva de ratones NOD/SCID

Con el fin de evaluar el efecto terapéutico de la administración de CTL reactivos contra CDH3 para ratones que habían recibido un transplante de células cancerosas humanas CDH3-positivas, se realiza una inmunoterapia adoptiva experimental como se describió con anterioridad (Komori H, *et al*. Clin. Cancer Res. 2006; 12:2689-2697). Brevemente, se inoculan células HCT116 (4 x 10^6 células) positivas tanto para HLA-A2 como para CDH3 endógeno en ratones NOD/SCID mediante inyección hipodérmica en el flanco derecho. Cuando el tamaño del tumor alcanza los 25 mm^2 en el día 7 después de la inoculación del tumor en los ratones, se inyecta por vía intravenosa (4 x 10^6) una línea de CTL específico para el péptido CDH3-$4_{655-663}$ o el péptido CDH3-$7_{757-765}$, o como control negativo, una línea de células T $CD8^+$ estimuladas con el péptido del VIH restringido por HLA-A2 (SLYNTYATL, SEQ ID NO: 19) derivadas de cinco donadores sanos, y se suspendida en 100 µl de PBS. Las células T se inyectan nuevamente por vía

000117

intravenosa el día 14. Los tamaños de los tumores se miden dos veces por semana y se evaluan midiendo dos diámetros perpendiculares entre sí usando calibradores. Se utiliza una prueba *t* de Student de dos colas para evaluar la significancia estadística en los tamaños de los tumores. Se considera que un valor de $P < 0.05$ es significativo. El análisis estadístico se efectúa utilizando un paquete de software estadístico disponible comercialmente (SPSS para Windows (TM), versión 11.0, Chicago, IL, EEUU).

Las células T CD8+ estimuladas con el péptido del VIH de control no presentan citotoxicidad contra las células HCT116 *in vitro*. Se evalúan los tamaños de los tumores de siete ratones individuales en cada grupo (Figura 5A) y el promedio ± la desviación estándar de los tamaños de los tumores en cada grupo (Figura 5B). La línea de células T de control y el PBS sola no presentan efecto inhibidor sobre el crecimiento del tumor. El tamaño del tumor en los ratones inoculados con los CTL estimulados con CDH3 es significativamente menor que el de los tumores en ratones inoculados con células T CD8+ de control inducidas con el péptido del VIH o con PBS sola ($P < 0.001$). Estos resultados indican la eficacia de la terapia de transferencia adoptiva de CTL humanos reactivos a CDH3 contra tumores humanos CDH3+ en ratones NOD/SCID.

000118

Discusión

En este estudio, los presentes inventores identificaron la Cadherina 3 (CDH3)/P-cadherina como un nuevo TAA por medio de un análisis de micoarreglo de ADNc de cáncer de páncreas. Sobre la base de dicho análisis de micoarreglo de ADNc, CDH3 es expresado fuertemente en las células de cáncer de páncreas y débilmente expresado en ovario y glándulas mamarias. La expresión de CDH3 apenas se puede detectar en otros órganos vitales. Asimismo, los datos de los microarreglos y de RT-PCR muestran que CDH3 se expresa en cánceres gástricos y colorrectales al igual que en el cáncer de páncreas, pero difícilmente es expresado en los tejidos normales correspondientes. Ya se sabía reportado que CDH3 se sobreexpresa en la mayoría de los tejidos de cáncer de páncreas, mientras que las células de los conductos y los acinos normales en el páncreas casi no presentan expresión de CDH3 mediante tinción inmunohistoquímica (Taniuchi K, *et al.* Cancer Res. 2005;65:3092-3099). Estos resultados sugieren que CDH3 podría ser un nuevo blanco de inmunoterapia para los cánceres anteriores, cuyo blanco presenta un riesgo bajo de inducir una respuesta autoinmune.

La familia de la cadherina está dividida en varias subfamilias, incluyendo Cadherina 1 (CDH1)/E-cadherina,

Cadherina 2 (CDH2)/N-cadherina y Cadherina 3 (CDH3)/P-cadherina, de conformidad con su distribución en los tejidos. CDH1 es el miembro predominante de la familia de la cadherina que es expresado en todos los tejidos epiteliales. Se presume que CDH1 actúa como factor supresor de tumor que regula negativamente la invasión y metástasis de las células de cáncer (Frixen U H, *et al.* J Cell Biol 1991; 113:173-185, Berx G, *et al.* Genomics 1995; 26:281-289, Oka H, *et al.* Cancer Res. 1993; 53:1696-1701). La expresión de CDH2 está incrementada en cánceres invasivos, y CDH2 contribuye al fenómeno invasivo interactuando con el receptor del factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) y a través de señalización corriente abajo (Suyama K, *et al.* Cancer Cell 2002; 2:301-314). Aún no se comprende bien la expresión y la función de CDH3 en los cánceres. En un estudio previo, Taniuchi K *et al.* sugieren que la expresión incrementada de CDH3 probablemente sea un factor que refuerza la invasividad del cáncer de páncreas al interactuar con p120ctn, la GTPasa de la familia Rho, Rac1, y Cdc42 (Taniuchi K, *et al.* Cancer Res. 2005; 65:3092-3099). Otros estudios previos sugieren que CDH3 también es un factor de invasividad incrementada y pronóstico pobre en el cáncer de mama (Palacios J, *et al.* Am J Pathol 1995; 146:605-612, Paredes J, *et al.* Clin. Cancer Res. 2005; 11:5869-5877, Peralta Soler A, *et al.* Cancer 1999; 86:1263-

1272) y en cáncer de endometrio (Stefansson I M, *et al.* J Clin Oncol 2004; 22:1242-1252.).

Cuando los reportes previos se toman juntos, la tasa de respuesta objetiva de vacunas contra el cáncer en pruebas clínicas era tan baja como 2.6% (Rosenberg S A, *et al.* Nat Med 2004; 10:909-915). Una posibilidad es que las células de cáncer se escapan del sistema inmune debido a deleción, mutación, o regulación negativa de los TAA como consecuencia de terapia por inducción inmune. Tomando como base el postulado de que las células tumorales no pueden perder antígenos que sean necesarios para la tumorigénesis, CDH3 podría ser un TAA candidato útil para la inmunoterapia contra el cáncer.

En la presente invención, los presentes inventores identificaron, entre los 18 péptidos candidatos seleccionados con el algoritmo BIMAS, dos péptidos de epítope de CDH3 restringidos por HLA-A2, de los que se confirmó que inducen CTLs de ratón restringidos por HLA-A2 en ratones transgénicos HLA-A2.1 (HHD). Asimismo, los presentes inventores confirmaron que se generan CTLs reactivos a CDH3 a partir de PBMCs derivadas de donadores sanos y pacientes con cáncer utilizando estos péptidos (Figuras 4A-4D). Estos CTLs presentan efecto citocida no solamente hacia las células T2 pulsadas con su péptido correspondiente, sino también hacia

líneas de células cancerosas que expresan CDH3 y HLA-A2. A partir de lo anterior, se sugiere que los presentes péptidos de CDH3 (CDH3-$4_{655-663}$ y CDH3-$7_{757-765}$) son producidos naturalmente mediante procesamiento a partir de la proteína CDH3 en células cancerosas, son presentados sobre la superficie de la célula junto con moléculas HLA-A2, y luego son reconocidos por los CTLs.

La citotoxicidad los CTLs reactivos a CDH3 de la presente invención fue confirmada no solamente *in vitro* mediante la prueba de liberación de ^{51}Cr, sino también *in vivo* mediante inmunoterapia adoptiva con CTL. Como se ilustra en las figuras 5A-5B, la inyección intravenosa de células CD8+ inducidas por los péptidos de la presente invención inhibe significativamente el crecimiento de tumores injertados en ratones NOD/SCID, en comparación con las células CD8+ de control, y similares.

HLA-A2 (*A*0201*) es uno de los alelos más comunes del HLA en diversos grupos étnicos, incluyendo asiáticos, africanos, afroamericanos y caucásicos (Browning M. *et al.* Immunol Today 1996; 17:165-170). Por lo tanto, los péptidos identificados en la presente invención que son presentados a las células T asesinas a través de HLA-A2 tienen un potencial de aplicación clínica en todo el mundo si se demuestra su seguridad y su eficacia en la inmunoterapia del cáncer en

medicina exploratoria. Además, la identificación de péptidos que son presentados **a** células T asesinas a través de HLA-A2, cuyos portadores son frecuentes no solamente entre los japoneses, sino también en otros pueblos en el mundo, probablemente lleve al desarrollo de productos farmacéuticos para inmunoterapia del cáncer que se pueden aplicar aproximadamente al 30% de los pacientes con cáncer de páncreas en el mundo.

Aplicación Industrial

HLA-A2 es un alelo de HLA clase I que esportado por aproximadamente 30% de la población japonesa. Cuando se inmunizan ratones transgénicos que expresan HLA-A2 humano con los péptidos de CDH3 de la presente invención, los péptidos pueden inducir células T citotóxicas que reconocen los péptidos unidos a las moléculas HLA-A2 para provocar respuestas inmunes. Es muy posible que, también en humanos, estos péptidos puedan inducir células T citotóxicas humanas que dañen células de cáncer que expresan complejos complejos de los péptidos y moléculas HLA-A2. Por lo tanto, los péptidos de la presente invención se pueden aplicar a inmunoterapia para cáncer de páncreas, carcinoma colangiocelular, cáncer gástrico, cáncer de colon y cáncer de pulmón de célula no pequeña en pacientes HLA-A2-positivos.

Por ende, se espera que los péptidos mejoren la calidad de vida de los pacientes al suprimir la proliferación y/o el progreso de estos cánceres.

NOVEDAD DE LA INVENCION

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

REIVINDICACIONES

1.- Un péptido de los siguientes (A) o (B):

(A) un péptido que comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2;

(B) un péptido que comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO 1 ó 2, en el cual uno, dos o varios aminoácidos son sustituidos, suprimidos, insertados y/o agregado y en donde el péptido tiene una actividad para inducir una célula T citotóxica (asesina).

2.- El péptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el segundo aminoácido desde el extremo N-terminal es leucina o metionina.

3.- El péptido de conformidad con la reivindicación 1 **ó 2**, caracterizado porque el aminoácido C-terminal es valina o leucina.

4.- Un agente para inducir inmunidad contra el cáncer, que comprende uno o más péptidos de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como un ingrediente activo.

5.- Un agente para tratar y/o prevenir cáncer, que comprende uno o más péptidos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como un ingrediente activo.

6.- Un agente para inducir una célula presentadora de antígeno que tiene actividad inductora de célula T citotóxica (asesina), que comprende uno o más péptidos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como un ingrediente activo.

7.- Un agente para inducir una célula presentadora de antígeno que que tiene actividad inductora de célula T citotóxica (asesina), que comprende uno o más polinucleótidos que codifican para el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como un ingrediente activo.

8.- Un agente para inducir una célula T citotóxica (asesina), que comprende uno o más péptidos de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como un ingrediente activo.

9.- Un anticuerpo contra el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

10.- Una célula T auxiliar, una célula T citotóxica (asesina) o un grupo de inmunocitos que comprende estas células, la cual se induce utilizando el péptido de

conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

11.- Una célula presentadora de antígeno que presenta un complejo que comprende el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un antígeno HLA.

12.- La célula presentadora de antígeno de conformidad con la reivindicación 11, la cual es inducida utilizando el agente de conformidad con la reivindicación 6 ó 7.

13.- Un exosoma que presenta un complejo que comprende el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un antígeno HLA.

14.- El exosoma de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el antígeno HLA es HLA-A2 (HLA-A*0201).

15.- Un método para inducir una célula presentadora de antígeno que tiene actividad inductora de célula T citotóxica (asesina), que comprende el paso de poner en contacto una célula presentadora de antígeno con el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

16.- Un método para inducir una célula presentadora de antígeno que tiene actividad inductora de célula T citotóxica (asesina), que comprende el paso de transfectar un polinucleótido que codifica para el péptido de conformidad

con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una célula presentadora de antígeno.

17.- Un método para inducir una célula T citotóxica (asesina), que comprende el paso de poner en contacto una célula T con el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

18.- Un métodod para inducir una célulca T citotóxica (asesina) que comprende el paso de co-cultivar una célula presentadora de antígeno conactada con un péptido de cualuiera de las reivindicaciones 1 a 3 con una célula CD8+ T.

19.- Un método para tratar y/o prevenir el cáncer, que comprende el paso de administrar el péptido de conformidad con la reivindicación 1 a un individuo.

20.- El uso del péptido de conformidad con la reivindicación 1, en la fabricacón de un agente para inducir inmunidad contra el cáncer.

21.- El uso del péptido de conformidad con la rivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir el cáncer.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención provee un péptido de los siguientes (A) o (B):

(A) un péptido que incluye una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2,

(B) un péptido que incluye una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ó 2, en el cual se han sustituido, suprimido, insertado, y/o agregado uno, dos, o varios aminoácidos, y en el cual el péptido tiene una actividad para inducir células T asesinas.

000129

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY
ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
THE UNIVERSITY OF TOKIO

<120> PEPTIDO DE CDH3 Y AGENTE MEDICINAL QUE COMPRENDE AL MISMO

<130> ONC-A0711P

<150> JP 2007-213999
<151> 2007-08-20

<160> 19

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 1

Phe Ile Leu Pro Val Leu Gly Ala Val

000128

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 2

Phe Ile Ile Glu Asn Leu Lys Ala Ala

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 3

Val Leu Gly Ala Val Leu Ala Leu Leu

1 5

000137

ac

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 4

Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 5

Val Val Leu Ser Leu Lys Lys Phe Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 6

Lys Leu Pro Thr Ser Thr Ala Thr Ile
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 7

Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu
1 5

<210> 8

000133

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 8

Ala Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 9

Ser Pro Pro Glu Gly Val Phe Ala Val

1 5

<210> 10

<211> 10

000134

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 10

Val Leu Pro Gly Thr Ser Val Met Gln Val
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 11

Thr Leu Asp Arg Glu Asp Glu Gln Phe Val
1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

000135

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 12

Lys Leu Pro Thr Ser Thr Ala Thr Ile Val
1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 13

Phe Val Pro Pro Ser Lys Val Val Glu Val
1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

000136

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 14

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

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 15

Gly Leu Pro Arg Gly Pro Leu Ala Ser Leu
1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

000137

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 16

Ile Leu Arg Arg His Lys Arg Asp Trp Val

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 17

Ser Val Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 18

Phe Ile Leu Pro Val Leu Gly Ala Val Leu
1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 19

Ser Leu Tyr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu
1 5

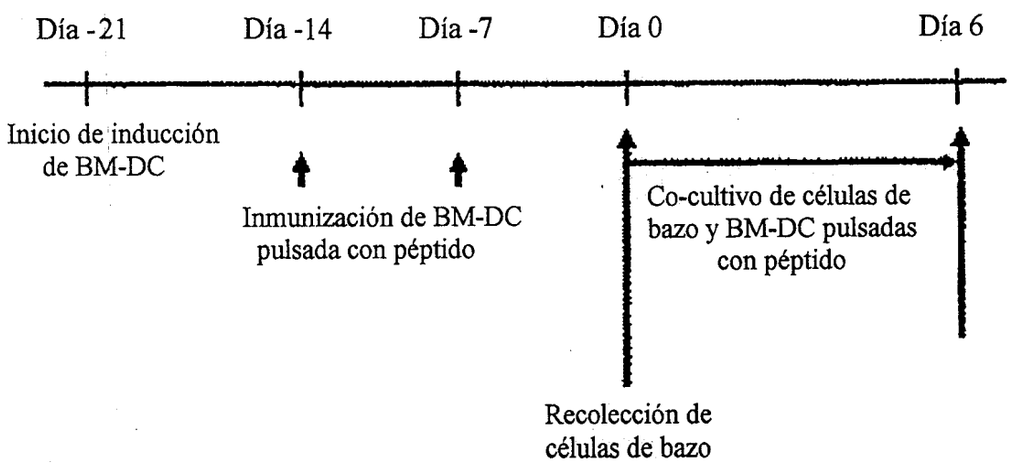


FIGURA 1

000140

102

108

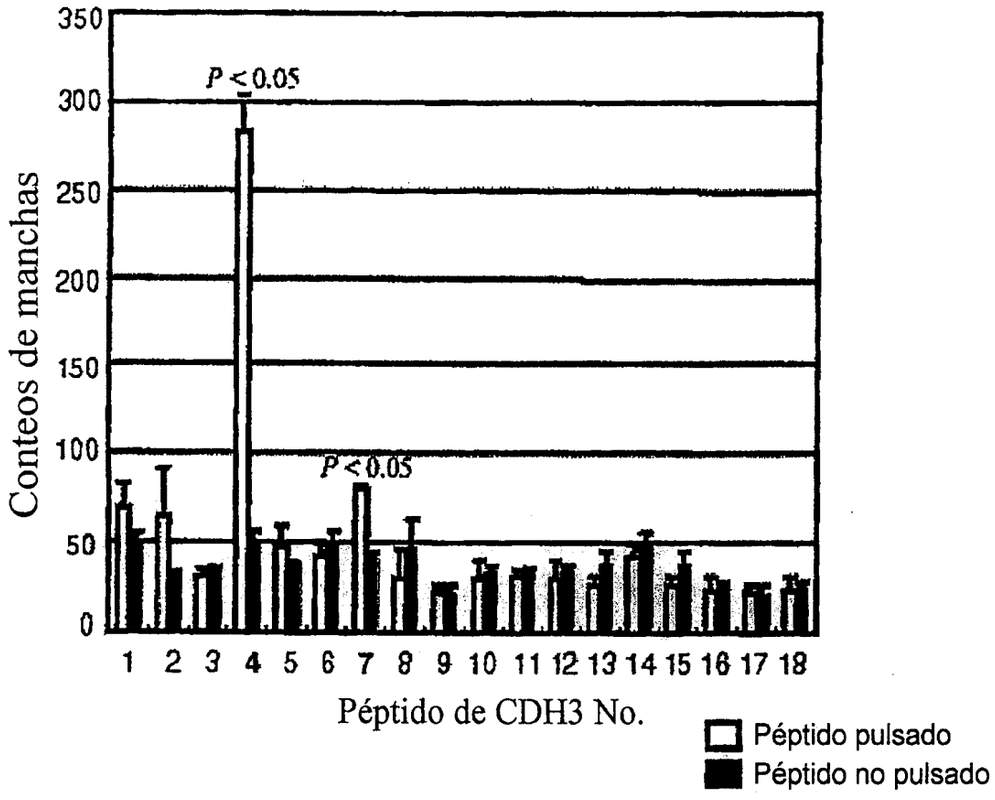

350
300
250
200
150
100
50
0
Conteos de manchas
P < 0.05
P < 0.05
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
Péptido de CDH3 No.
Péptido pulsado
Péptido no pulsado

FIGURA 2

Figura 3A

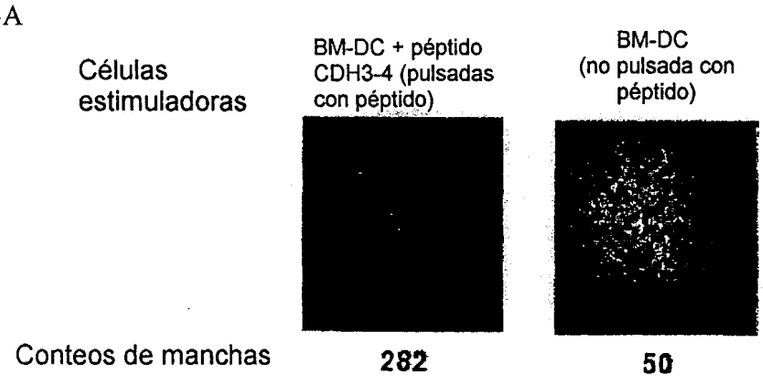


Figura 3B

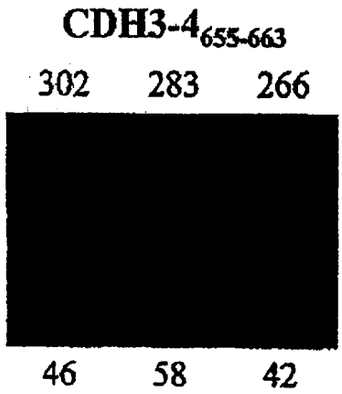
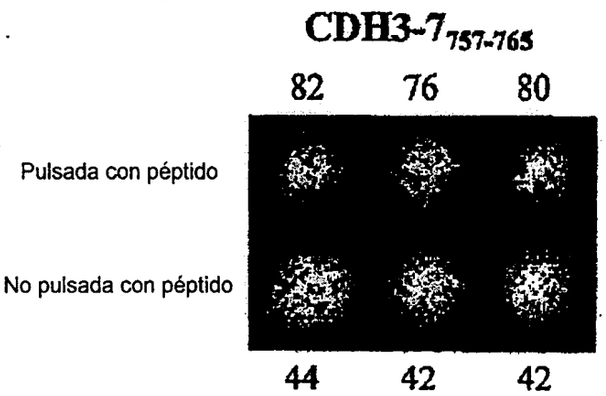


Figura 3C



000142

10

FIGURA 4A

FIGURA 4B

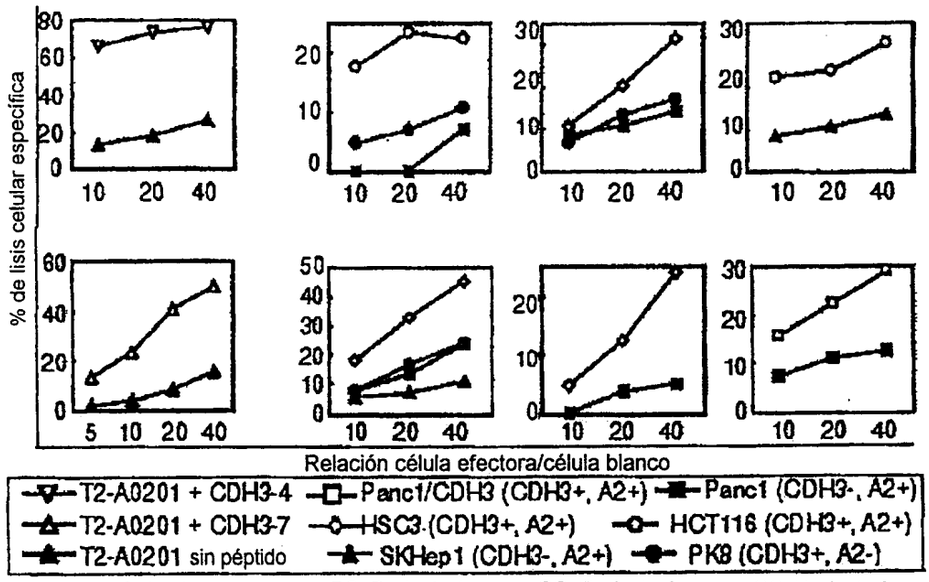


FIGURA 4C

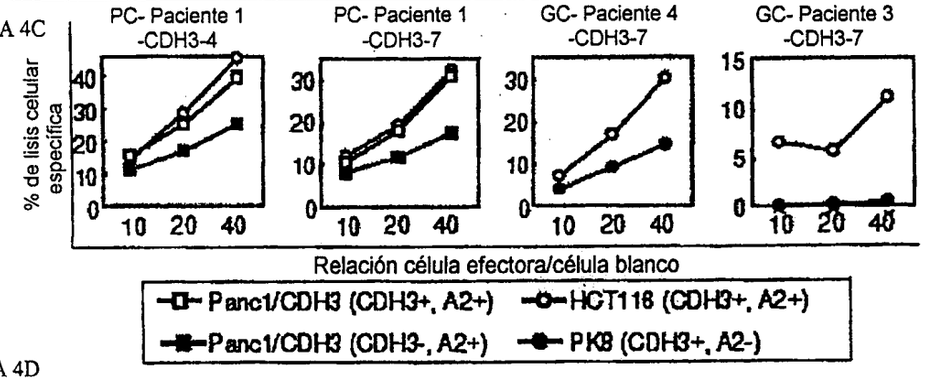
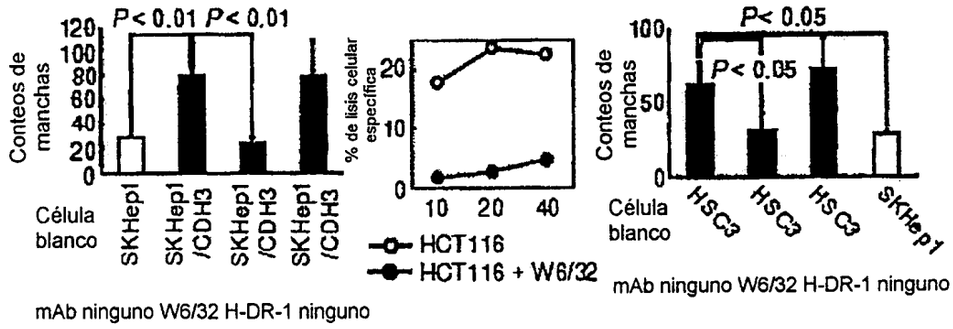


FIGURA 4D



000143 105

FIGURA 5A

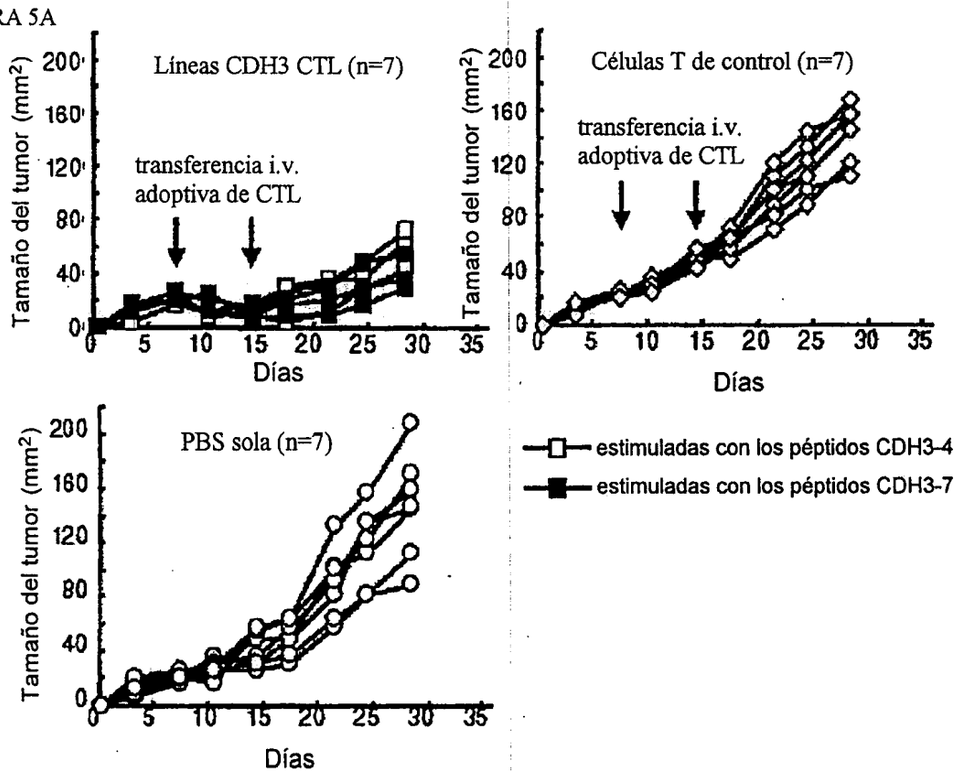
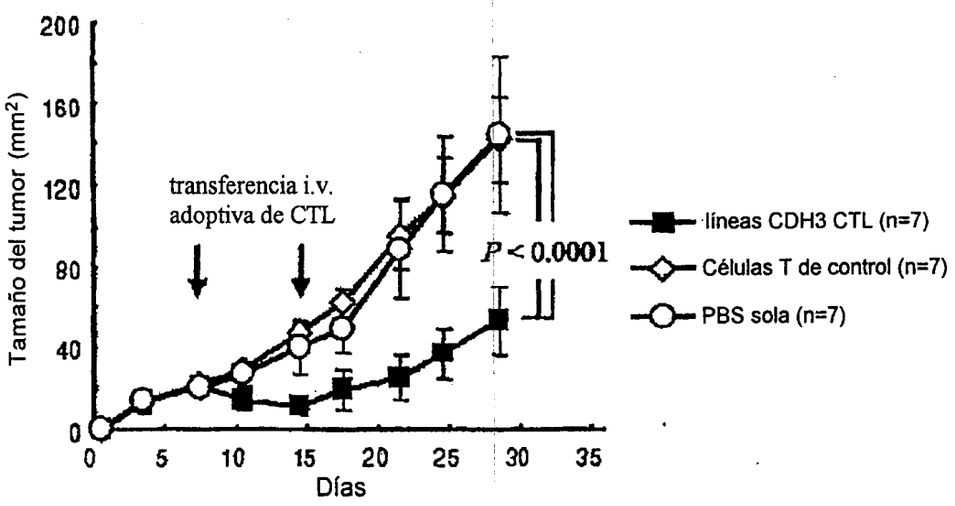


FIGURA 5B



000147 107

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0023053

Bogotá D.C., Marzo 07 de 2013 - 16:37:48

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	544911010	07/03/2013	72.935.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
				$450.000.00

==========

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

Responsable: _____
***

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-023981- -00010-0000

Fecha: 2013-04-19 15:15:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 146

No. 13-101077- -00000-0000

Fecha: 2013-04-19 15:15:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 146 104

000145
102

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0036876

Bogotá D.C., Abril 19 de 2013 - 10:50:49

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643 R

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	23103	07/03/2013		480.000.00
RECIBO DE CA	999999999	23104	07/03/2013		480.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
11	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	330.000.00
				$330.000.00

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-023981- -00010-0000
Fecha: 2013-04-19 15:15:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 146

No. 13-101077- -00000-0000
Fecha: 2013-04-19 15:15:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 146 109

000146
109