



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6



No. 13-206001- -00000-0000

Fecha: 2013-08-30 14:24:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-101088- -00003-0000

Fecha: 2013-08-30 14:24:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 115

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: PEPTIDOS SINTETICOS PARA CANCERES QUE
EXPRESAN ANTIGENOS ASOCIADOS CON TUMORES

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL: C12K 14/00

71. SOLICITANTE: ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

DOMICILIO: Kanagawa, Japón.

74. APODERADO SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.



No. 13-206001- -00000-0000

Fecha: 2013-08-30 14:24:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115



No. 13-101088- -00003-0000

Fecha: 2013-08-30 14:24:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 115

**DIRECCIÓN DE NUEVA
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN**

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Japón	2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,	Kanagawa 2130012,
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

RODRÍGUEZ D'ALEMAN DILIA MARÍA

Apellidos y Nombre

C.C. 41.654.882

Documento de identificación

20824 CSJ

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia		Bogotá D.C.
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clarkemodet@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

P-3934

4. Datos del trámite		
CONVERSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	DIVISION Expediente 13-101.088 De: _____ A: _____	FUSION Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No.	Fecha
----------------------------	-------

6. Anexos
☐ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación ☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ Nombre y apellidos	Firma
C.C. 22.468.787	Tarjeta Profesional 147463 CSJ

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/JP2008/000290	Fecha 21 de Febrero de 2008
Publicación Internacional No.		WO 2008/102557 A1	Fecha 28 de Agosto de 2008
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
<u>PEPTÍDOS SINTÉTICOS PARA CÁNCERES QUE EXPRESAN</u> <u>ANTÍGENOS ASOCIADOS CON TUMORES</u>			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C12K 14/00		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,		No. TELÉFONO:	
CIUDAD: Kanagawa 2130012,		CORREO ELECTRONICO:	
PAÍS DE RESIDENCIA: Japón		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Japón	
7	INVENTOR (ES)		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.TSUNODA,		Takuya	Japonés
2.OHSAWA,		Ryuji	Japonés
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	PAÍS RESIDENCIA
1. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,		Kanagawa 2130012,	Japón
2. c/o ONCOTHERAPY SCIENCE, INC., 2-1, Sakado 3-chome, Takatsu-ku, Kawasaki-shi,		Kanagawa 2130012,	Japón
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LÓPEZ DÍAZ		SILVANA MARIA	C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088	
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO notificaciones@clarkemodet.com.co	
PAÍS Colombia			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
Estados Unidos de América		US	60/902.949
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2007/02/21

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 13-077588 13-0	Fecha 05/08/2013 30/08/2013
16	FIRMA DEL APODERADO:		
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción 2. ☒ Reivindicaciones 3. ☒ Dibujos y/o figuras 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.		9. ☐ Poderes, si fuera el caso y sustitución 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 medianas 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.	

PÉPTIDOS SINTÉTICOS PARA CÁNCERES QUE EXPRESAN ANTÍGENOS ASOCIADOS CON TUMORES

CAMPO TÉCNICO

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisoria de los EEUU N° 60/902949, presentada el 21 de Febrero de 2007, cuya descripción completa se incorpora en la presente documentación a modo de referencia para todo propósito.

La presente invención se relaciona con el campo de la ciencia biológica, más específicamente con el campo de la terapia contra el cáncer. En particular, la presente invención se relaciona con nuevos péptidos inmunogénicos que son extremadamente efectivos como vacunas contra el cáncer, y con drogas para tratar y prevenir tumores que contienen dichos péptidos.

ANTECEDENTES TÉCNICOS

Se ha demostrado que los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) reconocen epitopes peptídicos derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) presentados sobre las moléculas MHC clase I, y luego lisan las células tumorales. Desde el descubrimiento de la familia MAGE como primer ejemplo de TAA, se han descubierto muchos otros TAA usando abordajes inmunológicos (Boon T. (1993) *Int J Cancer* 54: 177-80; Boon T. *et al.*, (1996) *J Exp Med* 183: 725-9; van der Bruggen P *et al.*, (1991) *Science* 254: 1643-7; Brichard V *et al.*, (1993) *J Exp Med* 178: 489-95; Kawakami Y *et al.*, (1994) *J Exp Med* 180: 347-52). En la actualidad, algunos de ellos se hallan en desarrollo clínico como blancos de inmunoterapia. Los TAA descubiertos hasta la fecha incluyen MAGE (van der Bruggen P *et al.*, (1991) *Science* 254: 1643-7), gp100 (Kawakami Y *et al.*, (1994) *J Exp Med* 180: 347-52), SART (Shichijo S *et al.*, (1998) *J Exp Med* 187:277-88), y NY-ESO-1 (Chen Y.T. *et al.*, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 1914-8). Por otro lado, determinados se ha demostrado que determinados productos genéticos que se sobreexpresan de forma probada y algo específica en las células tumorales son reconocidos como blancos para inducir respuestas inmunes celulares. Estos productos genéticos incluyen p53 (Umano Y *et al.*, (2001) *Br J Cancer*, 84:1052-7), HER2/neu (Tanaka H *et al.*, (2001) *Br J Cancer*, 84: 94-9), CEA (Nukaya I *et al.*, (1999) *Int. J. Cancer* 80, 92-7) y semejantes.

A pesar del progreso significativo en la investigación clínica relacionada con los TAA (Rosenberg SA *et al.*, (1998) *Nature Med*, 4: 321-7; Mukherji B. *et al.*, (1995) *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 8078-82.; Hu X *et al.*, (1996) *Cancer Res*, 56: 2479-83), en la actualidad solamente hay una cantidad muy limitada de TAA candidatos apropiados para el tratamiento de cánceres. Los TAA que se expresan de forma abundante en las células cancerosas, y cuya expresión está restringida a las células cancerosas, serían candidatos prometedores como blancos inmunoterapéuticos.

Tanto HLA-A24 como HLA-A0201 son alelos de HLA comunes en las poblaciones japonesa y caucásica (Date Y *et al.*, (1996) Tissue Antigens 47: 93-101; Kondo A *et al.*, (1995) J Immunol 155: 4307-12; Kubo RT *et al.*, (1994) J Immunol 152: 3913-24; Imanishi *et al.*, Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference, Oxford University Press, Oxford, 1065 (1992); Williams F *et al.*, (1997) Tissue Antigen 49: 129-33). Por consiguiente, los péptidos antigénicos de los cánceres presentados por estos alelos de HLA pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de cánceres entre pacientes japoneses y caucásicos. Además, se sabe que la inducción de los CTL de baja afinidad *in vitro* comúnmente es el resultado de la exposición a concentraciones elevadas de péptidos, lo que genera un nivel elevado de complejos de péptidos/MHC específicos sobre células presentadoras de antígenos (APC) y que activará efectivamente estos CTL (Alexander-Miller *et al.*, (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93: 4102-7).

Recientemente fue posible determinar la secuencia del péptido que se une a HLA clase I usando algoritmos (Journal of Immunological Methods, (1995), Vol. 185, pp. 181-190, J. Immunol., (1994), Vol.152, pp.163-175, protein science, (2000), Vol.9, pp.1838-1846). Sin embargo, es difícil decir que sea posible cortar el epitope esperado del péptido hasta obtener el tamaño deseado, que sea posible expresarlo en la superficie de la célula blanco con la molécula HLA, o que pueda ser reconocido por los CTL. Más aún, el algoritmo, por ejemplo, BIMAS (http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) (Parker KC, *et al.*, (1994) J Immunol; 152(1):163-75; Kuzushima K, *et al.*, (2001) Blood; 98(6):1872-81), puede sugerir el péptido que se une a la molécula HLA, pero el péptido sugerido no es riguroso (Bachinsky MM, *et al.*, Cancer Immun. 22 de Marzo de 2005; 5:6). Por ende, el análisis de TAA aún presenta una cantidad de desafíos y dificultades.

Los desarrollos recientes en las tecnologías de microseries de ADNc han permitido la construcción de perfiles exhaustivos de expresión genética en células malignas, en comparación con las células normales (Okabe, H. *et al.*, (2001) Cancer Res., 61, 2129-37; Lin YM. *et al.*, (2002) Oncogene, 21; 4120-8; Hasegawa S. *et al.*, (2002) Cancer Res 62:7012-7). Este abordaje permite una comprensión más profunda de la naturaleza compleja de las células cancerosas y los mecanismos de la carcinogénesis, y facilita la identificación de genes cuya expresión está desregulada en los tumores (Bienz M. *et al.*, (2000) Cell 103, 311-20). Entre los transcritos identificados como regulados positivamente en los cánceres, se ha descubierto recientemente *CDH3* (Nº de Acceso GenBank NM_001793; SEQ ID Nº 1, 2), *EPHA4* (Nº de Acceso GenBank L36645; SEQ ID Nº 3, 4), *ECT2* (Nº de Acceso GenBank AY376439; SEQ ID Nº 5, 6), *HIG2* (Nº de

Acceso GenBank NM_013332; SEQ ID N° 7, 8) *INHBB* (N° de Acceso GenBank NM_002193; SEQ ID N° 9, 10), *KIF20A* (N° de Acceso GenBank NM_005733; SEQ ID N° 11, 12), *KNTC2* (N° de Acceso GenBank AF017790; SEQ ID N° 13, 14), *TTK* (N° de Acceso GenBank NM_003318; SEQ ID N° 15, 16) y *URLC10* (N° de Acceso GenBank NM_017527; SEQ ID N° 17, 18). Los contenidos completos de las referencias se incorporan a modo de referencia en la presente documentación. Estos genes son de interés particular para los presentes inventores, ya que están regulados de forma positiva específicamente en las células tumorales de diversos tejidos cancerosos de los casos analizados (véase más adelante). Por lo tanto, los péptidos inmunogénicos derivados de CDH3, EPAA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y URLC10 pueden ser útiles en la eliminación selectiva de las células tumorales que expresan estos antígenos. La presente invención se relaciona con estas y otras necesidades.

Como las drogas citotóxicas, tales como M-VAC, comúnmente provocan reacciones adversas severas, está claro que la selección a conciencia de nuevas moléculas blanco, sobre la base de mecanismos de acción bien caracterizados, debería ser muy útil en el desarrollo de drogas anti-cancerosas efectivas con un riesgo mínimo de efectos colaterales. Con este fin, previamente se relazaron análisis de los perfiles de expresión de diversos cánceres y tejidos humanos normales. Estos estudios resultaron en el descubrimiento de múltiples genes que se sobreexpresan específicamente en el cáncer (Lin YM, *et al.*, *Oncogene*. 13 de Junio de 2002; 21:4120-8; Kitahara O, *et al.*, *Cancer Res.* 1° de Mayo de 2001; 61:3544-9; Suzuki C, *et al.*, *Cancer Res.* 1° de Noviembre de 2003 1; 63:7038-41; Ashida S, *Cancer Res.* 1° de Septiembre de 2004; 64:5963-72; Ochi K, *et al.*, *Int J Oncol.* Marzo de 2004; 24(3):647-55; Kaneta Y, *et al.*, *Int J Oncol.* Septiembre de 2003; 23:681-91; Obama K, *Hepatology.* Junio de 2005; 41:1339-48; Kato T, *et al.*, *Cancer Res.* 1° de Julio de 2005; 65:5638-46; Kitahara O, *et al.*, *Neoplasia.* Julio-Agosto de 2002; 4:295-303; Saito-Hisaminato A *et al.*, *DNA Res* 2002, 9: 35-45). Los ejemplos de estos genes identificados como sobreexpresados en diversos cánceres incluyen, sin limitaciones, CDH3, EPAA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y URLC10. CDH3 ha sido identificado con anterioridad como sobreexpresado en cáncer de vejiga, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de células pulmonares no pequeñas (NSCLC), cáncer de páncreas, tumores de tejidos blandos y tumores testiculares. EPAA4 ha sido identificado en cáncer de vejiga, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, endometriosis, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y tumores de tejidos blandos. ECT2 ha sido identificado en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, leucemia mieloide crónica (CML), cáncer

colorrectal, cáncer de esófago, NSCLC, linfoma, cáncer de próstata, carcinoma renal y cáncer de células pulmonares pequeñas (SCLC). HIG2 ha sido identificado en carcinoma renal y SCLC. INHBB ha sido identificado en carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, NSCLC, carcinoma renal, SCLC y tumores de tejidos blandos. KIF20A ha sido identificado en cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, NSCLC, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal y SCLC. KNTC2 ha sido identificado en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC y tumores de tejidos blandos. TTK ha sido identificado en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, SCLC y tumores de tejidos blandos. URLC10 ha sido identificado en cáncer de vejiga, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, NSCLC, osteosarcoma, cáncer de páncreas y SCLC.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de blancos aplicables de inmunoterapia. Como los TAA comúnmente no presentan inmunogenicidad, el descubrimiento de blancos apropiados es de extrema importancia. Como se mencionó con anterioridad, CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y URLC10 han sido identificados como regulados positivamente en diversos cánceres. Más particularmente, estos genes fueron identificados usando un perfilamiento de la expresión genética con una microserie de ADNc que abarco el genoma completo. Como se describió con anterioridad, se demostró que la expresión de *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y *URLC10* está regulada en forma positiva específicamente en diversas células tumorales, desde células de cáncer de páncreas hasta carcinomas de células renales. Como se describe en la Tabla 1, la expresión de CDH3 se halla fehacientemente elevada en 26 de los 34 cánceres de vejiga, 17 de los 19 cánceres cervicales, la totalidad de los 19 carcinomas colangiocelulares, 30 de los 34 cánceres colorrectales, 20 de las 21 endometriosis, 13 de los 20 cánceres gástricos, 7 de los 8 cánceres gástricos de tipo difuso, 36 de los 37 NSCLC, la totalidad de los 16 cánceres de páncreas, la totalidad de los 21 tumores de tejidos blandos, y la totalidad de los 10 tumores testiculares.

En la Tabla 1 se demuestra esto con mayor detalle:

La expresión de EPHA4 se halla fehacientemente elevada en 14 de los 34 cánceres de vejiga, 8 de los 14 cánceres cervicales, 10 de los 25 carcinomas colangiocelulares, 5 de las 15

endometriosis, 5 de los 8 cánceres gástricos de tipo difuso, la totalidad de los 5 cánceres de ovario, la totalidad de los 14 cánceres de páncreas, 20 de los 51 cánceres de próstata y 14 de los 23 tumores de tejidos blandos.

La expresión de ECT2 se halla fehacientemente elevada en 17 de los 19 cánceres de vejiga, 5 de los 12 cánceres de mama, la totalidad de los 14 cánceres cervicales, la totalidad de los 13 carcinomas colangiocelulares, la totalidad de los 5 CML, 7 de los 8 cánceres colorrectales, 12 de los 16 cánceres de esófago, 6 de los 16 NSCLC, 8 de los 10 linfomas, 1 de 1 cáncer de páncreas, 10 de los 13 cánceres de próstata, 3 de los 6 carcinomas renales y 12 de los 13 cánceres SCLC.

La expresión de HIG2 se halla fehacientemente elevada en 19 de los 20 cánceres renales y 7 de los 9 tumores de tejidos blandos.

La expresión de INHBB se halla fehacientemente elevada en 10 de los 21 carcinomas colangiocelulares, la totalidad de los 12 cánceres de esófago, 10 de los 13 NSCLC, 22 de los 24 carcinomas renales, 8 de los 14 cánceres SCLC y 45 de los 49 tumores de tejidos blandos.

La expresión de KIF20A se halla fehacientemente elevada en la totalidad de los 31 cánceres de vejiga, 38 de los 61 cánceres de mama, 10 de los 11 carcinomas colangiocelulares, 7 de los 19 cánceres de esófago, 21 de los 22 NSCLC, la totalidad de los 6 cánceres de ovario, 17 de los 36 cánceres de próstata, 6 de los 11 carcinomas renales y la totalidad de los 15 SCLC.

La expresión de KNTC2 se halla fehacientemente elevada en 30 de los 32 cánceres de vejiga, 47 de los 56 cánceres de mama, la totalidad de los 10 cánceres cervicales, 16 de los 22 carcinomas colangiocelulares, 17 de los 37 CML, 3 de los 10 cánceres colorrectales, 11 de los 46 cánceres de esófago, 15 de los 19 NSCLC, 7 de los 8 linfomas, 20 de los 24 osteosarcomas, 3 de los 5 cánceres de ovario, la totalidad de los 2 cánceres de páncreas, 15 de los 37 cánceres de próstata, 14 de los 19 carcinomas renales, la totalidad de los 15 SCLC y 40 de los 59 tumores de tejidos blandos.

La expresión de TTK se halla fehacientemente elevada en la totalidad de los 27 cánceres de vejiga, 25 de los 30 cánceres de mama, 15 de los 16 cánceres cervicales, la totalidad de los 10 carcinomas colangiocelulares, 5 de los 7 CML, 6 de los 10 cánceres colorrectales, 24 de los 44 cánceres de esófago, 8 de los 15 cánceres de hígado, la totalidad de los 12 NSCLC, la totalidad de los 6 linfomas, 13 de los 16 osteoblastomas, 12 de los 17 cánceres de próstata, la totalidad de los 15 SCLC y 16 de los 33 tumores de tejidos blandos.

La expresión URLC10 de se halla fehacientemente elevada en la totalidad de los 29 cánceres de vejiga, 15 de los 16 cánceres cervicales, la totalidad de los 7 carcinomas

colangiocelulares, 7 de los 19 cánceres de esófago, la totalidad de los 3 cánceres gástricos, 24 de los 27 NSCLC, 15 de los 19 osteosarcomas, 4 de los 5 cánceres de páncreas, 33 de los 43 tumores de tejidos blandos.

La presente invención se basa al menos en parte en la identificación de epitopes peptídicos específicos de los productos génicos de estos genes (*CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y *URLC10*) que poseen la capacidad de inducir linfocitos T citotóxicos específicos (CTL) específicos para las moléculas correspondientes. Como se describirá con mayor detalle más adelante, se estimularon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante saludable usando los péptidos de unión candidatos HLA-A*2402 o HLA-A*0201 derivados de *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* o *URLC10*. Después se establecieron clones y/o líneas de CTL con citotoxicidad específica por las células blanco positivas HLA-A24 o HLA-A2, cada una tratada con pulsos de los péptidos candidatos. Estos resultados demuestran que estos péptidos son epitopes peptídicos HLA-A24 o HLA-A2 restringidos, que pueden inducir respuestas inmunes potentes y específicas contra células que expresan *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* o *URLC10*.

Por consiguiente, en la presente invención se proveen métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la sobreexpresión de *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* o *URLC10*, por ejemplo, cáncer. Estos métodos comprenden el paso de administrarle a un sujeto que los necesita los polipéptidos *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y/o *URLC10* de la invención. La administración de estos péptidos resulta en la inducción de inmunidad anti-tumoral, tal como la producida por la administración de estos polipéptidos. Por ende, en la presente invención se proveen métodos para inducir inmunidad anti-tumoral en un sujeto, donde los métodos comprenden el paso de administrarle al sujeto los polipéptidos *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y/o *URLC10*, y también composiciones farmacéuticas para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la sobreexpresión de *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y/o *URLC10*, por ejemplo, el cáncer, que incluyen los polipéptidos *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y *URLC10*. Los ejemplos de estos cánceres incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular.

Además, en la presente invención se proveen métodos para prevenir la recurrencia post-

quirúrgica de la enfermedad mencionada con anterioridad.

Con relación a los fines y los objetivos específicos mencionados con anterioridad, aquellos entrenados en la técnica han de comprender que uno o más aspectos de esta invención pueden cumplir determinados objetivos, mientras que uno o más aspectos diferentes pueden cumplir otros objetivos. Cada objetivo puede no aplicarse de forma igual, en todos sus aspectos, a cada aspecto de esta invención. Por lo tanto, los objetos en la presente documentación pueden contemplarse de forma alternativa con relación a cualquier aspecto individual de esta invención.

Otros objetos y características de la invención serán completamente evidentes cuando la siguiente descripción detallada se lea en combinación con las figuras y los ejemplos adjuntos. Sin embargo, ha de comprenderse que el resumen de la invención precedente y la descripción detallada a continuación comprenden realizaciones preferidas, y no restringen la invención o excluyen otras realizaciones alternativas de la invención. En particular, si bien la invención se describe en la presente documentación con referencia a una cantidad de realizaciones específicas, ha de apreciarse que la descripción ilustra la invención y no ha de interpretarse como un límite para la invención. Aquellos entrenados en la técnica pueden concebir diversas modificaciones y aplicaciones sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención, tal como se los describe en las reivindicaciones adjuntas. Del mismo modo, otros objetos, características, beneficios y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de este resumen y determinadas realizaciones que se describirán más adelante, y serán evidentes para aquellos entrenados en la técnica. Estos objetos, características, beneficios y ventajas serán evidentes a partir de lo anterior, en combinación con los ejemplos, los datos y las figuras adjuntas, y todas las inferencias razonables que se realicen a partir de ellas, solas o en consideración de las referencias incorporadas en la presente documentación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Varios aspectos y aplicaciones de la presente invención serán evidentes para aquellos entrenados en la técnica al considerar la descripción breve de las figuras y la descripción detallada de la presente invención y sus realizaciones preferidas, que se presentan a continuación:

[Fig.

1-1]

En la **Figura 1** se ilustran los resultados del análisis de los epitopes peptídicos, con los que también se demuestra que CDH3-A24-10-332 (SEQ ID N° 34), CDH3-A24-10-470 (SEQ ID N° 358), CDH3-A24-9-513 (SEQ ID N° 19), CDH3-A24-9-406 (SEQ ID N° 22), CDH3-A24-10-807 (SEQ ID N° 30) y CDH3-A24-10-655 (SEQ ID N° 344) presentan una producción potente de IFN-gamma. En "a" se ilustra el ejemplo de péptidos negativos en los que no pudo detectarse una

capacidad de inducción de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA-A*2402. En "b" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de CDH3-A24-10-332 (SEQ ID N° 34). CDH3-A24-10-332 (SEQ ID N° 34) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo ELISPOT con IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #4 se indica en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítopo peptídico. En "c" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de CDH3-A24-10-470 (SEQ ID N° 358). CDH3-A24-10-470 (SEQ ID N° 358) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #4 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítopo peptídico. En "d" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de CDH3-A24-9-513 (SEQ ID N° 19). CDH3-A24-9-513 (SEQ ID N° 19) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma. La cavidad #6 se ilustra en cavidades recuadradas en el **panel izquierdo**, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítopo peptídico. Más aún, la línea CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #5 se ilustra en cavidades recuadradas en el **panel medio**, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítopo peptídico. En "e" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de CDH3-A24-9-406 (SEQ ID N° 22). CDH3-A24-9-406 (SEQ ID N° 22) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #2 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítopo peptídico.

[Fig. 1-2]

En la Figura 1 se ilustran los resultados del análisis de los epítopos peptídicos, con los que también se demuestra que CDH3-A24-10-332 (SEQ ID NO: 34), CDH3-A24-10-470 (SEQ ID NO: 358), CDH3-A24-9-513 (SEQ ID NO: 19), CDH3-A24-9-406 (SEQ ID NO: 22), CDH3-A24-10-807 (SEQ ID NO: 30) y CDH3-A24-10-655 (SEQ ID NO: 344) resultan en una producción potente de IFN-gamma. En "f" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de CDH3-A24-10-807 (SEQ ID N° 30). CDH3-A24-10-807 (SEQ ID N° 30) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y el clon de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #5 se ilustran en cavidades recuadradas. El clon de CTL establecido contra el péptido presentó actividad de CTL específica contra COS7

transfectadas con el gen CDH3 completo y la molécula HLA-A24 (**gráfico derecho inferior**). Por otro lado, se prepararon COS7 transfectadas con CDH3 completo, pero sin HLA-A24, y COS7 transfectadas con HLA-A24, pero sin CDH3 completo, como control negativo. El clon de CTL presentó una actividad de CTL específicos elevados contra COS7 que habían sido transfectadas con CDH3 y HLA-A24. En "g" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de CDH3-A24-10-655 (SEQ ID N° 344). CDH3-A24-10-655 (SEQ ID N° 344) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y el clon de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #1 se ilustran en cavidades recuadradas. El clon de CTL establecido contra el péptido presentó actividad de CTL específica alta contra COS7 que habían sido transfectadas con el gen CDH3 completo y la molécula HLA-A24 (**gráfico derecho inferior**). Por otro lado, se prepararon COS7 transfectadas con CDH3 completo, pero sin HLA-A24, y COS7 transfectadas con HLA-A24, pero sin CDH3 completo, como control negativo. El clon de CTL presentó una actividad de CTL específica alta contra COS7 que habían sido transfectadas con CDH3 y HLA-A24.

[Fig.

2]

En la **Figura 2** se ilustran los resultados del análisis de los epitopes peptídicos, con los que también se demuestra que Epha4-A24-9-453 (SEQ ID N° 41), Epha4-A24-9-5 (SEQ ID N° 44), Epha4-A24-9-420 (SEQ ID N° 48), Epha4-A24-9-869 (SEQ ID N° 46), Epha4-A24-10-24 (SEQ ID N° 78) Epha4-A02-9-501 (SEQ ID N° 376) y Epha4-A02-9-165 (SEQ ID N° 379) presentan una producción potente de IFN-gamma. En "a" se ilustra el ejemplo de péptidos negativos en los que no pudo detectarse una capacidad de inducción de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA. En "b" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de Epha4-A24-9-453 (SEQ ID N° 41). Epha4-A24-9-453 (SEQ ID N° 41) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #3 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. En "c" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de Epha4-A24-9-5 (SEQ ID N° 44). Epha4-A24-9-5 (SEQ ID N° 44) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #2 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. En "d" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de Epha4-A24-9-420 (SEQ ID N° 48). Epha4-A24-9-420 (SEQ ID N° 48) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control,

en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma. La cavidad #6 se ilustra en cavidades recuadradas en el **panel superior**, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. Más aún, la línea CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #6 se ilustra en cavidades recuadradas en el **panel medio**, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. En "e" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de Epha4-A24-9-869 (SEQ ID N° 46). Epha4-A24-9-869 (SEQ ID N° 46) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #5 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. En "f" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de Epha4-A24-10-24 (SEQ ID N° 78). Epha4-A24-10-24 (SEQ ID N° 78) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #4 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. En "g" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de Epha4-A02-9-501 (SEQ ID N° 376). Epha4-A02-9-501 (SEQ ID N° 376) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y el clon de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #8 se ilustran en cavidades recuadradas. La actividad citotóxica de la línea de CTL establecida contra las células blanco tratadas con pulsos del péptido se midió con un ensayo de liberación de Cr (CRA) (**gráfico inferior**), y la línea CTL presentó una actividad citotóxica específica muy potente contra las células blanco tratadas con pulsos de péptidos. En "h" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de Epha4-A02-9-165 (SEQ ID N° 379). Epha4-A02-9-165 (SEQ ID N° 379) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que fue establecida a partir de la cavidad positiva #3 se ilustra en cavidades recuadradas. La actividad citotóxica de la línea de CTL establecida contra células blanco tratadas con pulsos de péptido se midió con un ensayo de liberación de Cr (CRA) (**gráfico derecho**), y la línea CTL presentó una actividad citotóxica específica muy potente contra las células blanco tratadas con pulsos de péptidos.

[Fig.

3]

En la **Figura 3** se ilustran los resultados del análisis de los epítopes peptídicos, con los que también se demuestra que ECT2-A24-9-515 (SEQ ID N° 80), ECT2-A24-10-40 (SEQ ID N° 100) y ECT2-A24-10-101 (SEQ ID N° 101) presentan una producción potente de IFN-gamma. En "a" se

ilustra el ejemplo de péptidos negativos en los que no pudo detectarse una capacidad de inducción de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA. En "b" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de ECT2-A24-9-515 (SEQ ID N° 80). ECT2-A24-9-515 (SEQ ID N° 80) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma. Las cavidades #5 y #7 se ilustran en cavidades recuadradas en el **panel izquierdo**, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. Más aún, la línea CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #7 se ilustra en cavidades recuadradas en el **segundo panel**, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. La actividad citotóxica de la línea de CTL contra la línea de células cancerosas TE6, que expresa ECT2 y HLA-A24 en forma endógena, se midió con un ensayo de liberación de Cr (CRA), y el clon de CTL presentó una actividad citotóxica muy potente contra TE6. Por otro lado, las células efectoras no presentaron la actividad citotóxica de la línea CTL contra la línea de células cancerosas TE5, que expresan solamente ECT2 y no pudieron detectarse. En "c" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de ECT2-A24-10-40 (SEQ ID N° 100). ECT2-A24-10-40 (SEQ ID N° 100) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y el clon de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #2 se ilustran en cavidades recuadradas. El clon de CTL establecido contra el péptido presentó una actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas con la totalidad del gen ECT2 y la molécula HLA-A24. Por otro lado, se prepararon COS7 transfectadas con la totalidad del gen ECT2, pero sin HLA-A24, COS7 transfectadas con HLA-A24 y el gen URLC10 como reemplazo de ECT2 completo, y COS7 transfectadas con HLA-A24 y tratadas con pulsos de ECT2-10-101 como control negativo. El clon de CTL presentó una actividad de CTL específica alta contra COS7 que habían sido transfectadas con ECT2 y HLA-A24. En "d" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de ECT2-A24-10-101 (SEQ ID N° 101). ECT2-A24-10-101 (SEQ ID N° 101) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #1 se ilustra en cavidades recuadradas. La línea de CTL establecida desarrollada contra el péptido presentó actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas con la totalidad del gen ECT2 y la molécula HLA-A24. Se prepararon COS7 transfectadas con la totalidad del gen ECT2, pero sin HLA-A24, las COS7 transfectadas con HLA-A24 y el gen URLC10 como reemplazo de ECT2 completo, y las COS7 transfectadas con HLA-A24 y tratadas con pulsos de ECT2-10-40 como control negativo. El clon de CTL presentó una actividad de CTL específica alta contra COS7 que habían sido transfectadas con

ECT2 y HLA-A24.

[Fig.

4-1]

En la **Figura 4** se ilustran los resultados del análisis de los epitopes peptídicos, con los que también se demuestra que HIG2-A24-9-19 (SEQ ID N° 110), HIG2-A24-9-22 (SEQ ID N° 111), HIG2-A24-9-8 (SEQ ID N° 387), HIG2-A24-10-7 (SEQ ID N° 112), HIG2-A24-10-18 (SEQ ID N° 394), HIG2-A02-9-15 (SEQ ID N° 116), HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117) y HIG2-A02-10-8 (SEQ ID N° 121) presentan una producción potente de IFN-gamma. En "a" se ilustra el ejemplo de péptidos negativos en los que no pudo detectarse una capacidad de inducción de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA. En "b" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de HIG2-A24-9-19 (SEQ ID N° 110). HIG2-A24-9-19 (SEQ ID N° 110) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #6 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. En "c" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de HIG2-A24-9-22 (SEQ ID N° 111). HIG2-A24-9-22 (SEQ ID N° 111) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y el clon de CTL que fueron establecidos a partir de la cavidad positiva #7 se ilustran en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. En "d" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de HIG2-A24-9-8 (SEQ ID N° 387). HIG2-A24-9-8 (SEQ ID N° 387) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y el clon de CTL que fueron establecidos a partir de la cavidad positiva #5 se ilustran en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. En "e" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de HIG2-A02-9-8 (SEQ ID N° 114). HIG2-A02-9-8 (SEQ ID N° 114) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que fue establecida a partir de la cavidad positiva #10 se ilustra en cavidades recuadradas. La línea de CTL establecida desarrollada contra el péptido presenta actividad de CTL específica contra 293T transfectadas con la totalidad del gen HIG2 y la molécula HLA-A02. Se prepararon 293T transfectadas con la totalidad de HIG2, pero sin HLA-A02, 293T transfectadas con HLA-A02 y el gen FoxP3 como reemplazo de la totalidad de HIG2, y 293T transfectadas con HLA-A02 y tratadas con pulsos de HIG2-9-15 como control negativo. La línea de CTL presentó una actividad de CTL específica alta contra 293T que habían sido transfectadas con HIG2 y HLA-A02.

[Fig.

4-2]

En la figura 4 se ilustran los resultados del análisis de los epitopes peptídicos, con los que también se demuestra que HIG2-A24-9-19 (SEQ ID NO: 110), HIG2-A24-9-22 (SEQ ID NO: 111), HIG2-A24-9-8 (SEQ ID NO: 387), HIG2-A24-10-7 (SEQ ID NO: 112) , HIG2-A24-10-18 (SEQ ID NO: 394), HIG2-A02-9-15 (SEQ ID NO: 116), HIG2-A02-9-4 (SEQ ID NO: 117) y HIG2-A02-10-8 (SEQ ID NO: 121) resultan en una producción potente de IFN-gamma. En "f" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de HIG2-A24-10-7 (SEQ ID N° 112). HIG2-A24-10-7 (SEQ ID N° 112) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y las líneas o el clon de CTL que se establecieron a partir de las cavidades positivas #1 y #7 se ilustran en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. En "g" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de HIG2-A24-10-18 (SEQ ID N° 394). HIG2-A24-10-18 (SEQ ID N° 394) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y el clon de CTL que fueron establecidos a partir de la cavidad positiva #7 se ilustran en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. En "h" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de HIG2-A02-9-15 (SEQ ID N° 116). HIG2-A02-9-15 (SEQ ID N° 116) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que fue establecida a partir de la cavidad positiva #10 se ilustra en cavidades recuadradas. La línea de CTL establecida desarrollada contra el péptido presentó actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas con la totalidad del gen HIG2 y la molécula HLA-A02. Se prepararon COS7 transfectadas con la totalidad del gen HIG2, pero sin HLA-A02 y COS7 transfectadas con HLA-A02 y tratadas con pulsos del péptido HIG2-9-8 como control negativo. La línea de CTL presentó una actividad de CTL específica alta contra COS7 que habían sido transfectadas con HIG2 y HLA-A02.

[Fig.

4-3]

En la figura 4 se ilustran los resultados del análisis de los epitopes peptídicos, con los que también se demuestra que HIG2-A24-9-19 (SEQ ID NO: 110), HIG2-A24-9-22 (SEQ ID NO: 111), HIG2-A24-9-8 (SEQ ID NO: 387), HIG2-A24-10-7 (SEQ ID NO: 112) , HIG2-A24-10-18 (SEQ ID NO: 394), HIG2-A02-9-15 (SEQ ID NO: 116), HIG2-A02-9-4 (SEQ ID NO: 117) y HIG2-A02-10-8 (SEQ ID NO: 121) resultan en una producción potente de IFN-gamma. En "i" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117). HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de

IFN-gamma, y la línea y el clon de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #10 se ilustran en cavidades recuadradas. La línea de CTL establecida desarrollada contra el péptido presentó actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas con la totalidad del gen HIG2 y la molécula HLA-A02 (**gráfico medio**). También se prepararon COS7 transfectadas con la totalidad del gen HIG2, pero sin HLA-A02, COS7 transfectadas con HLA-A02 y el gen TTK como reemplazo de la totalidad de HIG2, y COS7 transfectadas con HLA-A02 y tratadas con pulsos de HIG2-9-8 como control negativo. La actividad citotóxica del clon de CTL contra 293T transfectadas con la totalidad del gen HIG2 y la molécula HLA-A02, y contra la línea de células cancerosas Caki-1, que expresan de forma endógena HIG2 y HLA-A02, se midió con un ensayo de liberación de Cr (CRA) (**gráficos inferiores**), y el clon de CTL presentó una actividad citotóxica muy potente contra las transfectantes con el gen HIG2 y HLA-A02, y Caki-1. Por otro lado, las células efectoras no presentaron la actividad citotóxica de la línea CTL contra 293T transfectadas solamente con HIG2 o solamente con HLA-A02, y no fue posible detectar la línea de células cancerosas A498, que solamente expresó HIG2. En "j" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de HIG2-A02-10-8 (SEQ ID N° 121). HIG2-A02-10-8 (SEQ ID N° 121) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #9 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico.

[Fig.

5-1]

En la **Figura 5** se ilustran los resultados del análisis de los epítipes peptídicos, con los que también se demuestra que INHBB-A24-9-180 (SEQ ID N° 395), INHBB-A24-10-180 (SEQ ID N° 133), INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135), INHBB-A24-10-7 (SEQ ID N° 137) e INHBB-A24-10-212 (SEQ ID N° 426) presentan una producción potente de IFN-gamma. En "a" se ilustra el ejemplo de péptidos negativos en los que no pudo detectarse una capacidad de inducción de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA. En "b" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de INHBB-A24-9-180 (SEQ ID N° 395). INHBB-A24-9-180 (SEQ ID N° 395) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y el clon de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #7 se ilustran en cavidades recuadradas. La actividad citotóxica de el clon de CTL establecido contra células tumorales Miapaca2, que expresan INHBB y HLA-A02, se midió con un ensayo de liberación de Cr (CRA), y las células efectoras presentaron una actividad citotóxica específica alta contra Miapaca2. Por otro lado, no presentaron una actividad citotóxica específica significativa contra Caki-1, que

K6

expresan INHBB, pero sin HLA-A02. En "c" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de INHBB-A24-10-180 (SEQ ID N° 133). INHBB-A24-10-180 (SEQ ID N° 133) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que fue establecida a partir de la cavidad positiva #3 se ilustra en cavidades recuadradas. La línea de CTL establecida desarrollada contra el péptido presentó actividad de CTL específica alta contra 293T, transfectadas con la totalidad del gen INHBB y la molécula HLA-A24. También se prepararon 293T transfectadas con la totalidad de INHBB, pero sin HLA-A24, y 293T transfectadas con HLA-A24 y tratadas con pulsos del péptido INHBB-10-305, como control negativo.

[Fig. 5-2]

En la figura 5 se ilustran los resultados del análisis de los epitopes peptídicos, con los que también se demuestra que INHBB-A24-9-180 (SEQ ID NO: 395), INHBB-A24-10-180 (SEQ ID NO: 133), INHBB-A24-10-305 (SEQ ID NO: 135), INHBB-A24-10-7 (SEQ ID NO: 137) y INHBB-A24-10-212 (SEQ ID NO: 426) resultan en una producción potente de IFN-gamma. En "d" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135). INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y el clon de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #2 se ilustran en cavidades recuadradas. El clon de CTL establecido contra el péptido presentó actividad de CTL específica alta contra 293T, transfectadas con la totalidad del gen INHBB y la molécula HLA-A24. También se prepararon 293T transfectadas con la totalidad de INHBB, pero sin HLA-A24, y 293T transfectadas con HLA-A24 y tratadas con pulsos del péptido INHBB-10-180, como control negativo. En "e" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de INHBB-A24-10-7 (SEQ ID N° 137)). INHBB-A24-10-7 (SEQ ID N° 137) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y las líneas de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #8 se ilustran en cavidades recuadradas en el panel superior, y aquellas que se prepararon a partir de la cavidad positiva #2 se ilustran en cavidades recuadradas en el panel inferior. La línea de CTL de la cavidad #8 presentó actividad de CTL específica contra 293T, transfectadas con la totalidad del gen INHBB y la molécula HLA-A24. También se prepararon 293T transfectadas con la totalidad de INHBB, pero sin HLA-A24, y 293T transfectadas con HLA-A24 y tratadas con pulsos del péptido INHBB-10-40, como control negativo. En "f" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de INHBB-A24-10-212 (SEQ ID N° 426). INHBB-A24-10-212 (SEQ ID N° 426) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de

CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #1 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico.

[Fig.

6-1]

En la **Figura 6** se ilustran los resultados del análisis de los epítipes peptídicos, con los que también se demuestra que KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186), KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID N° 178), KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194) y KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID N° 174) presentan una producción potente de IFN-gamma. En "a" se ilustra el ejemplo de péptidos negativos en los que no pudo detectarse una capacidad de inducción de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA. En "b" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186). KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma. La cavidad #5 se ilustra en cavidades recuadradas en el **panel inferior derecho**, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. Más aún, La línea y el clon de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #5 se ilustran en cavidades recuadradas en el **panel superior izquierdo**, donde también se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. El clon de CTL establecido contra el péptido presentó actividad de CTL específica contra 24-LCL, transfectadas con la totalidad del gen KIF20A. También se preparó un vector transfectado señuelo A24-LCL como control negativo. La actividad citotóxica del clon de CTL contra células tumorales **PK45P**, que expresan KIF20A y HLA-A24, se midió con un ensayo de liberación de Cr (CRA), y el clon de CTL presentó una actividad citotóxica específica muy potente contra **PK45P** (**gráfico derecho inferior**). Por otro lado, no presentó una actividad citotóxica específica significativa contra PK59, que expresan KIF20A, pero sin HLA-A24. En "c" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID N° 178). KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID N° 178) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma. Las cavidades #3 y 4 se ilustran en cavidades recuadradas en el **panel derecho**, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. Más aún, La línea de CTL que fue establecida a partir de la cavidad positiva #3 se ilustra en cavidades recuadradas en el **panel izquierdo**, donde también se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. La línea de CTL establecida presentó actividad de CTL específica alta contra COS7 transfectadas con la totalidad del gen KIF20A y la molécula HLA-A24. También se prepararon COS7 transfectadas con la totalidad del gen KIF20A, pero sin HLA-A24, y

COS7 transfectadas con HLA-A24 y tratadas con pulsos del péptido KIF20A-9-621, como control negativo.

[Fig.

6-2]

En la Figura 6 se ilustran los resultados del análisis de los epitopes peptídicos, con los que también se demuestra que KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID NO: 186), KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID NO: 178), KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID NO: 194) y KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID NO: 174) resultan en una producción potente de IFN-gamma. En "d" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194). KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y las líneas de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #6 se ilustran en cavidades recuadradas en el **panel superior izquierdo**, y aquellas que se establecieron a partir de la cavidad positiva #3 se ilustra en cavidades recuadradas en el **panel inferior medio**, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. Más aún, el clon de CTL seleccionado a partir de la línea de CTL de la cavidad #6 mediante la limitación de la dilución presentó actividad de CTL específica contra las células blanco. El clon de CTL establecido presentó actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas con la totalidad del gen KIF20A y la molécula HLA-A24. También se prepararon COS7 transfectadas con la totalidad del gen KIF20A, pero sin HLA-A24, COS7 transfectadas con HLA-A24 y el gen URLC10 como reemplazo de la totalidad de KIF20A, y COS7 transfectadas HLA-A24 y tratadas con pulsos del péptido KIF20A-10-308, como control negativo. En "e" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID N° 174). KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID N° 174) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y las líneas de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #2 se ilustran en cavidades recuadradas en el **panel superior izquierdo**, y aquellas que se establecieron a partir de la cavidad positiva #6 se ilustran en cavidades recuadradas en el **panel inferior medio**, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. Más aún, el clon de CTL seleccionado a partir de la línea de CTL de la cavidad #2 mediante la limitación de la dilución presentó actividad de CTL específica contra las células blanco. La actividad citotóxica del clon de CTL contra células tumorales Mlapaca2, que expresan KIF20A y HLA-A24, se midió con un ensayo de liberación de Cr (CRA), y el clon de CTL presentó una actividad citotóxica muy potente contra Mlapaca2. Por otro lado, no presentó actividad citotóxica específica significativa contra PK59, que expresan KIF20A, pero sin HLA-A24.

[Fig.

7-1]

En la **Figura 7** se ilustran los resultados del análisis de los epitopes peptídicos, con los que también se demuestra que KNTC2-A24-9-309 (SEQ ID N° 196), KNTC2-A24-9-124 (SEQ ID N° 202), KNTC2-A24-9-154 (SEQ ID N° 210) KNTC2-A24-9-150 (SEQ ID N° 213), KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214), KNTC2-A24-10-227 (SEQ ID N° 217) y KNTC2-A24-10-273 (SEQ ID N° 223) presentan una producción potente de IFN-gamma. En "a" se ilustra el ejemplo de péptidos negativos en los que no pudo detectarse una capacidad de inducción de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA. En "b" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de KNTC2-A24-9-309 (SEQ ID N° 196). KNTC2-A24-9-309 (SEQ ID N° 196) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #8 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. En "c" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de KNTC2-A24-9-124 (SEQ ID N° 202). KNTC2-A24-9-124 (SEQ ID N° 202) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #5 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. En "d" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de KNTC2-A24-9-154 (SEQ ID N° 210). KNTC2-A24-9-154 (SEQ ID N° 210) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y el clon de CTL que fueron establecidos a partir de la cavidad positiva #5 se ilustran en cavidades recuadradas donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico. En "e" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de KNTC2-A24-9-150 (SEQ ID N° 213). KNTC2-A24-9-150 (SEQ ID N° 213) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #7 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epitope peptídico.

[Fig.

7-2]

En la Figura 7 se ilustran los resultados del análisis de los epitopes peptídicos, con los que también se demuestra que KNTC2-A24-9-309 (SEQ ID NO: 196), KNTC2-A24-9-124 (SEQ ID NO: 202), KNTC2-A24-9-154 (SEQ ID NO: 210) KNTC2-A24-9-150 (SEQ ID NO: 213), KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID NO: 214), KNTC2-A24-10-227 (SEQ ID NO: 217) y KNTC2-A24-10-273 (SEQ ID NO: 223) resultan en una producción potente de IFN-gamma. En "f" se ilustra la capacidad de inducción de

CTL de KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214). KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y las líneas y el clon de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #4 se ilustran en cavidades recuadradas en el **panel superior izquierdo**, y aquellas que se establecieron a partir de la cavidad positiva #5 se ilustran en cavidades recuadradas en el **panel medio**, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. Más aún, el clon de CTL seleccionado a partir de la línea de CTL de la cavidad #5 mediante la limitación de la dilución presentó actividad de CTL específica contra las células blanco. La línea de CTL establecida a partir de la cavidad #4 presentó actividad de CTL específica contra HEK293 transfectadas con la totalidad del gen KNTC2 y la molécula HLA-A24. También se prepararon HEK293 transfectadas con la totalidad de KNTC2, pero sin HLA-A24, HEK293 transfectadas con HLA-A24, pero sin la totalidad de KNTC2, y HEK293 transfectadas con HLA-A24 y tratadas con pulsos del péptido KNTC-9-309, como control negativo. En "g" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de KNTC2-A24-10-227 (SEQ ID N° 217). KNTC2-A24-10-227 (SEQ ID N° 217) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #1 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. En "h" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de KNTC2-A24-10-273 (SEQ ID N° 223). KNTC2-A24-10-273 (SEQ ID N° 223) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #8 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico.

[Fig.

8-1]

En la **Figura 8** se ilustran los resultados del análisis de los epítipes peptídicos, con los que también se demuestra que TTK-A02-9-462 (SEQ ID N° 227), TTK-A02-9-719 (SEQ ID N° 233), TTK-A02-9-547 (SEQ ID N° 228) y TTK-A02-10-462 (SEQ ID N° 254) presentan una producción potente de IFN-gamma. En "a" se ilustra el ejemplo de péptidos negativos en los que no pudo detectarse una capacidad de inducción de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA. En "b" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de TTK-A02-9-462 (SEQ ID N° 227). TTK-A02-9-462 (SEQ ID N° 227) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y los dos clones de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #4 se ilustran en cavidades recuadradas, donde se

demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítipo peptídico. El clon de CTL establecido presentó una actividad de CTL específica alta contra COS7 transfectadas con la totalidad del gen TTK y la molécula HLA-A02. También se prepararon COS7 transfectadas con la totalidad del gen TTK, pero sin HLA-A02, COS7 transfectadas con HLA-A02, pero sin la totalidad de TTK, y COS7 transfectadas con HLA-A02 y tratadas con pulsos del péptido TTK-9-547, como control negativo. En "c" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de TTK-A02-9-719 (SEQ ID N° 233). TTK-A02-9-719 (SEQ ID N° 233) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y los clones de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #1 se ilustran en cavidades recuadradas. La línea de CTL establecida presentó una actividad de CTL específica alta contra COS7 transfectadas con la totalidad del gen TTK y la molécula HLA-A02. También se prepararon COS7 transfectadas con la totalidad del gen TTK, pero sin HLA-A02, y COS7 transfectadas con HLA-A02 y el gen HIG2 como reemplazo de la totalidad de TTK, como control negativo.

[Fig. 8-2]

En la Figura 8 se ilustran los resultados del análisis de los epítipes peptídicos, con los que también se demuestra que TTK-A02-9-462 (SEQ ID NO: 227), TTK-A02-9-719 (SEQ ID NO: 233), TTK-A02-9-547 (SEQ ID NO: 228) y TTK-A02-10-462 (SEQ ID NO: 254) resultan en una producción potente de IFN-gamma. En "d" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de TTK-A02-9-547 (SEQ ID N° 228). TTK-A02-9-547 (SEQ ID N° 228) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y los clones de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #2 se ilustran en cavidades recuadradas. La línea de CTL establecida presentó actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas con la totalidad del gen TTK y la molécula HLA-A02. También se prepararon COS7 transfectadas con la totalidad del gen TTK, pero sin HLA-A02, COS7 transfectadas con HLA-A02, pero sin la totalidad de TTK, y COS7 transfectadas con HLA-A02 y tratadas con pulsos de TTK-10-462, como control negativo.

[Fig. 8-3]

En la Figura 8 se ilustran los resultados del análisis de los epítipes peptídicos, con los que también se demuestra que TTK-A02-9-462 (SEQ ID NO: 227), TTK-A02-9-719 (SEQ ID NO: 233), TTK-A02-9-547 (SEQ ID NO: 228) y TTK-A02-10-462 (SEQ ID NO: 254) resultan en una producción potente de IFN-gamma. En "e" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de TTK-A02-10-462 (SEQ ID N° 254). TTK-A02-10-462 (SEQ ID N° 254) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y los tres clones

22

de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #8 se ilustran en cavidades recuadradas. El clon de CTL establecido presentó actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas con la totalidad del gen TTK y la molécula HLA-A02. También se prepararon COS7 transfectadas con la totalidad del gen TTK, pero sin HLA-A02, COS7 transfectadas con HLA-A02, pero sin la totalidad de TTK, y COS7 transfectadas con HLA-A02 y tratadas con pulsos del péptido TTK-9-547, como control negativo.

[Fig.]

9-1]

En la **Figura 9** se ilustran los resultados del análisis de los epitopes peptídicos, con los que también se demuestra que URLC10-A02-9-206 (SEQ ID N° 271), URLC10-A02-9-212 (SEQ ID N° 272) y URLC10-A02-10-211 (SEQ ID N° 288) presentan una producción potente de IFN-gamma. En "a" se ilustra el ejemplo de péptidos negativos en los que no pudo detectarse una capacidad de inducción de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA. En "b" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de URLC10-A02-9-206 (SEQ ID N° 271). URLC10-A02-9-206 (SEQ ID N° 271) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #7 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítopo peptídico. En "c" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de URLC10-A02-9-212 (SEQ ID N° 272). URLC10-A02-9-212 (SEQ ID N° 272) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea de CTL que se estableció a partir de la cavidad positiva #3 se ilustra en cavidades recuadradas, donde se demostró la respuesta específica contra las células blanco tratadas con pulsos del epítopo peptídico. En "d" se ilustra la capacidad de inducción de CTL de URLC10-A02-10-211 (SEQ ID N° 288). URLC10-A02-10-211 (SEQ ID N° 288) presentó una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y la línea y los clones de CTL que se establecieron a partir de la cavidad positiva #5 se ilustran en cavidades recuadradas.

[Fig.]

9-2]

En la **Figura 9** se ilustran los resultados del análisis de los epitopes peptídicos, con los que también se demuestra que URLC10-A02-9-206 (SEQ ID NO: 271), URLC10-A02-9-212 (SEQ ID NO: 272) y URLC10-A02-10-211 (SEQ ID NO: 288) resultan en una producción potente de IFN-gamma. "Continuación de d" El clon de CTL establecido presentó una actividad de CTL específica alta contra COS7, Hek293 y 293T, que fueron transfectadas con la totalidad del gen el gen URLC10 y la molécula HLA-A02. También se prepararon COS7, Hek293 o 293T que fueron transfectadas con la

totalidad de URLC10, pero sin HLA-A02, y COS7, Hek293 o 293T que fueron transfectadas con HLA-A02 y tratadas con pulsos de URLC10-10-64, como control negativo.

En estos dibujos, "+" hace referencia a un blanco tratado con pulsos del péptido, "-" hace referencia a un blanco no tratado con pulsos del péptido, "R" hace referencia a la presencia de respuesta, "S" representa estimulador, "E" representa efector, y "T" representa blanco.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las palabras "un", "uno/una", y "el/la", como se las usa en la presente documentación, denotan "al 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 documentación tienen el mismo significado que comúnmente le dan aquellos entrenados en la técnica a los que concierne esta invención.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de blancos aplicables de inmunoterapia. La identificación de nuevos TAA, particularmente aquellos que inducen respuestas inmunes antitumorales potentes y específicas, garantiza la continuación del desarrollo de la aplicación clínica de la estrategia de vacunación con péptidos en diversos tipos de cáncer (Boon T *et al.*, (1996) *J Exp Med* 183: 725-9; van der Bruggen P *et al.*, (1991) *Science* 254: 1643-7; Brichard V *et al.*, (1993) *J Exp Med* 178: 489-95; Kawakami Y *et al.*, (1994) *J Exp Med* 180: 347-52; Shichijo S *et al.*, (1998) *J Exp Med* 187:277-88; Chen YT *et al.*, (1997) *Proc.Natl.Acd. Sci.USA*, 94: 1914-8; Harris CC, (1996) *J Natl Cancer Inst* 88:1442-55; Butterfield LH *et al.*, (1999) *Cancer Res* 59:3134-42; Vissers JL *et al.*, (1999) *Cancer Res* 59: 5554-9; van der Burg SH *et al.*, (1996) *J. Immunol* 156:3308-14; Tanaka F *et al.*, (1997) *Cancer Res* 57:4465-8; Fujie T *et al.*, (1999) *Int J Cancer* 80:169-72; Kikuchi M *et al.*, (1999) *Int J Cancer* 81 : 459-66; Oiso M *et al.*, (1999) *Int J Cancer* 81:387-94). Como los TAA comúnmente no son inmunogénicos, el descubrimiento de blancos apropiados es un asunto extremadamente importante.

Como se mencionó con anterioridad,

CDH3 (Nº de Acceso GenBank NM_001793; SEQ ID Nº 1, 2),

EPHA4 (Nº de Acceso GenBank L36645; SEQ ID Nº 3, 4),

ECT2 (Nº de Acceso GenBank AY376439; SEQ ID Nº 5, 6),

HIG2 (Nº de Acceso GenBank NM_013332; SEQ ID Nº 7, 8)

INHBB (Nº de Acceso GenBank NM_002193; SEQ ID Nº 9, 10),

KIF20A (Nº de Acceso GenBank NM_005733; SEQ ID Nº 11, 12),

KNTC2 (Nº de Acceso GenBank AF017790; SEQ ID Nº 13, 14),

TTK (Nº de Acceso GenBank NM_003318; SEQ ID Nº 15, 16) y

21

URLC10 (Nº de Acceso GenBank NM_017527; SEQ ID Nº 17, 18) fueron identificados con anterioridad como sobreexpresados en diversos cánceres usando tecnologías de microseries de ADNc.

En la presente invención se demuestra que los péptidos derivados de *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* o *URLC10* son epitopes de TAA restringidos por HLA-A24 y HLA-A2, un alelo de HLA hallado comúnmente en las poblaciones japonesa y caucásica. Específicamente, usando sus afinidades de unión por HLA-A24 o HLA-A2 se identificaron péptidos que se unen a HLA-A24 o HLA-A2 derivados de *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* o *URLC10*. Después de la estimulación *in vitro* de las células T por células dendríticas (DC) cargadas con estos péptidos, los CTL fueron establecidos exitosamente usando los siguientes péptidos:

CDH3-A24-9-513 (SEQ ID Nº 19),
 CDH3-A24-9-406 (SEQ ID Nº 22),
 CDH3-A24-10-807 (SEQ ID Nº 30),
 CDH3-A24-10-332 (SEQ ID Nº 34),
 CDH3-A24-10-655 (SEQ ID Nº 344),
 CDH3-A24-10-470 (SEQ ID Nº 358),
 EphA4-A24-9-453 (SEQ ID Nº 41),
 EphA4-A24-9-5 (SEQ ID Nº 44),
 EphA4-A24-9-869 (SEQ ID Nº 46),
 EphA4-A24-9-420 (SEQ ID Nº 48),
 EphA4-A24-10-24 (SEQ ID Nº 78),
 EphA4-A02-9-501 (SEQ ID Nº 376),
 EphA4-A02-9-165 (SEQ ID Nº 379),
 ECT2-A24-9-515 (SEQ ID Nº 80),
 ECT2-A24-10-40 (SEQ ID Nº 100),
 ECT2-A24-10-101 (SEQ ID Nº 101),
 HIG2-A24-9-19 (SEQ ID Nº 110),
 HIG2-A24-9-22 (SEQ ID Nº 111),
 HIG2-A24-9-8 (SEQ ID Nº 387),
 HIG2-A24-10-7 (SEQ ID Nº 112),
 HIG2-A24-10-18 (SEQ ID Nº 394),
 HIG2-A02-9-8 (SEQ ID Nº 114),

HIG2-A02-9-15 (SEQ ID N° 116),
 HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117),
 HIG2-A02-10-8 (SEQ ID N° 121),
 INHBB-A24-9-180 (SEQ ID N° 395),
 INHBB-A24-10-180 (SEQ ID N° 133),
 INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135),
 INHBB-A24-10-7 (SEQ ID N° 137),
 INHBB-A24-10-212 (SEQ ID N° 426),
 KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID N° 174),
 KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID N° 178),
 KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186),
 KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194),
 KNTC2-A24-9-309 (SEQ ID N° 196),
 KNTC2-A24-9-124 (SEQ ID N° 202),
 KNTC2-A24-9-154 (SEQ ID N° 210),
 KNTC2-A24-9-150 (SEQ ID N° 213),
 KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214),
 KNTC2-A24-10-227 (SEQ ID N° 217),
 KNTC2-A24-10-273 (SEQ ID N° 223),
 TTK-A02-9-462 (SEQ ID N° 227),
 TTK-A02-9-547 (SEQ ID N° 228),
 TTK-A02-9-719 (SEQ ID N° 233),
 TTK-A02-10-462 (SEQ ID N° 254),
 URLC-A02-9-206 (SEQ ID N° 271),
 URLC-A02-9-212 (SEQ ID N° 272) y
 URLC-A02-10-211 (SEQ ID N° 288).

Estos péptidos son epitopes peptídicos de cada TAA restringidos por HLA-A24 o HLA-A2.

Como estos antígenos se sobreexpresan en la mayoría de los cánceres y están asociados con la proliferación de células tumorales, son útiles como blancos inmunoterapéuticos contra cánceres. Los ejemplos de cánceres incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de

tejidos blandos y tumor testicular.

Por consiguiente, en la presente invención se proveen además métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, en un sujeto, donde estos métodos incluyen los pasos de administrarle al sujeto un péptido inmunogénico de menos de aproximadamente 40 aminoácidos, comúnmente menos de aproximadamente 20 aminoácidos, usualmente menos de aproximadamente 15 aminoácidos, y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 376, 379, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 114, 116, 117, 121, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217, 223, 227, 228, 233, 254, 271, 272 ó 288.

Como alternativa, el péptido inmunogénico puede tener la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 376, 379, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 114, 116, 117, 121, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217, 223, 227, 228, 233, 254, 271, 272 ó 288, donde 1, 2 o varios (por ejemplo, hasta 5) aminoácidos han sido sustituidos, suprimidos o agregados, con la condición de que el péptido variante retenga la actividad inmunogénica (es decir, la capacidad de inducir CTL específicos para células que expresan CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres).

La cantidad de residuos a sustituir, suprimir o agregar generalmente es de 5 aminoácidos o menos, preferiblemente 4 aminoácidos o menos, más preferiblemente 3 aminoácidos o menos, aún más preferiblemente uno o dos aminoácidos. Los cánceres contemplados incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular. Además, en la presente invención se proveen métodos para prevenir la recurrencia post-quirúrgica de estas enfermedades mencionadas con anterioridad.

Se sabe que los péptidos variantes (es decir, los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos modificada mediante la sustitución, la supresión o la adición de uno, dos o varios residuos de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos original) retienen la actividad biológica original (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). En el contexto de la presente invención, es preferible que la modificación de los

27

aminoácidos resulte en la conservación de las propiedades de la cadena lateral del aminoácido original (un proceso conocido como sustitución de aminoácidos conservativa). Los ejemplos de propiedades de cadenas laterales de aminoácidos incluyen aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrofílicos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene un grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene un átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene un ácido carboxílico y una amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene una base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene una porción aromática (H, F, Y, W). Vale destacar que las letras entre paréntesis hacen referencia a los códigos de aminoácidos de una sola letra.

En realizaciones preferidas, el péptido inmunogénico es un nonapéptido (9-mero) o un decapeptido (10-mero).

Adicionalmente, en la presente invención se provee un método para inducir inmunidad anti-tumoral para una enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, en un sujeto, donde dicho método incluye los pasos de administrarle al sujeto que lo necesita un péptido inmunogénico de la presente invención, a saber, uno que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 376, 379, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 114, 116, 117, 121, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217, 223, 227, 228, 233, 254, 271, 272 ó 288, o una variante de éste (es decir, que incluye 1, 2 o varias (por ejemplo, hasta 5) sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos). Los cánceres contemplados incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular.

En el contexto de la presente invención, el sujeto preferiblemente es un mamífero. Los ejemplos de mamíferos incluyen, sin limitaciones, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo o una vaca.

En la presente invención, el péptido puede administrarse a un sujeto a través de un protocolo *in vivo* o *ex vivo*. Además, en la presente invención también se provee el uso de un nonapéptido o un decapeptido seleccionado entre péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 376, 379, 80, 100, 101,

110, 111, 387, 112, 394, 114, 116, 117, 121, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217, 223, 227, 228, 233, 254, 271, 272 ó 288 (y variantes de éstos) para fabricar una composición inmunogénica para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres. Los cánceres contemplados incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular.

Los análisis de homología de los siguientes péptidos demuestra que no presentan una homología significativa con los péptidos derivados de cualquier producto génico humano conocido:

CDH3-A24-9-513 (SEQ ID N° 19),
 CDH3-A24-9-406 (SEQ ID N° 22),
 CDH3-A24-10-807 (SEQ ID N° 30),
 CDH3-A24-10-332 (SEQ ID N° 34),
 CDH3-A24-10-655 (SEQ ID N° 344),
 CDH3-A24-10-470 (SEQ ID N° 358),
 EphA4-A24-9-453 (SEQ ID N° 41),
 EphA4-A24-9-5 (SEQ ID N° 44),
 EphA4-A24-9-869 (SEQ ID N° 46),
 EphA4-A24-9-420 (SEQ ID N° 48),
 EphA4-A24-10-24 (SEQ ID N° 78),
 EphA4-A02-9-501 (SEQ ID N° 376),
 EphA4-A02-9-165 (SEQ ID N° 379),
 ECT2-A24-9-515 (SEQ ID N° 80),
 ECT2-A24-10-40 (SEQ ID N° 100),
 ECT2-A24-10-101 (SEQ ID N° 101),
 HIG2-A24-9-19 (SEQ ID N° 110),
 HIG2-A24-9-22 (SEQ ID N° 111),
 HIG2-A24-9-8 (SEQ ID N° 387),
 HIG2-A24-10-7 (SEQ ID N° 112),
 HIG2-A24-10-18 (SEQ ID N° 394),
 HIG2-A02-9-8 (SEQ ID N° 114),

HIG2-A02-9-15 (SEQ ID N° 116),
 HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117),
 HIG2-A02-10-8 (SEQ ID N° 121),
 INHBB-A24-9-180 (SEQ ID N° 395),
 INHBB-A24-10-180 (SEQ ID N° 133),
 INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135),
 INHBB-A24-10-7 (SEQ ID N° 137),
 INHBB-A24-10-212 (SEQ ID N° 426),
 KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID N° 174),
 KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID N° 178),
 KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186),
 KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194),
 KNTC2-A24-9-309 (SEQ ID N° 196),
 KNTC2-A24-9-124 (SEQ ID N° 202),
 KNTC2-A24-9-154 (SEQ ID N° 210),
 KNTC2-A24-9-150 (SEQ ID N° 213),
 KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214),
 KNTC2-A24-10-227 (SEQ ID N° 217),
 KNTC2-A24-10-273 (SEQ ID N° 223),
 TTK-A02-9-462 (SEQ ID N° 227),
 TTK-A02-9-547 (SEQ ID N° 228),
 TTK-A02-9-719 (SEQ ID N° 233),
 TTK-A02-10-462 (SEQ ID N° 254),
 URLC-A02-9-206 (SEQ ID N° 271),
 URLC-A02-9-212 (SEQ ID N° 272) y
 URLC-A02-10-211 (SEQ ID N° 288).

Por consiguiente, la posibilidad de obtener respuestas inmunes desconocidas o indeseables con una inmunoterapia contra estas moléculas se reduce significativamente.

Con relación a los antígenos HLA, los datos presentados en la presente documentación demuestran que los usos de los antígenos tipo A-24 o tipo A-2 (de los que se dice que se expresan en gran medida entre los japoneses) son favorables para obtener resultados efectivos. Los usos de subtipos tales como A-2402 y A-0201 son aún más preferibles. Típicamente, en el ámbito clínico, el tipo de antígeno HLA del paciente que requiere el tratamiento se investiga con antelación, lo que a

su vez permite seleccionar péptidos apropiados que tienen niveles elevados de afinidad de unión por el antígeno del paciente, o donde la presentación del antígeno puede inducir las células T citotóxicas (CTL). Además, con el fin de obtener péptidos que tienen una afinidad de unión elevada y pueden inducir los CTL, puede realizarse una sustitución, una supresión o una adición de 1, 2 o varios (por ejemplo, hasta 5) aminoácidos, sobre la base de la secuencia de aminoácidos del péptido parcial CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y URLC10 de ocurrencia natural. En la presente documentación, el término "varios" hace referencia a 5 o menos, más preferiblemente 3 o menos. También, además de los péptidos que se hallan en la naturaleza, como la regularidad de las secuencias de péptidos obtenida mediante la unión a antígenos HLA ya es conocida (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), es posible realizar modificaciones sobre esta regularidad en los péptidos inmunogénicos de la invención. Por ejemplo, pueden usarse péptidos que poseen una afinidad de unión por HLA-24, cuyo segundo aminoácido desde el extremo N puede reemplazarse por fenilalanina, tirosina, metionina o triptofano. Del mismo modo, también pueden usarse aquellos péptidos cuyo aminoácido C-terminal ha sido reemplazado por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano o metionina. Por otro lado, pueden usarse favorablemente péptidos que poseen una afinidad de unión elevada por HLA-A2 cuyo segundo aminoácido desde el extremo N ha sido reemplazado por leucina o metionina, y péptidos cuyo aminoácido C-terminal ha sido reemplazado por valina o leucina. La sustitución no solamente se realiza en los aminoácidos terminales, sino también en la posición del reconocimiento TCR potencial de péptidos. En diversos estudios se ha demostrado que las sustituciones en un péptido pueden arrojar resultados iguales o mejores que los del original, por ejemplo, CAP1, p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎, Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ o gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb 1; 168(3):1338-47, S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 y S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314). Además, es posible agregar 1 ó 2 aminoácidos en el extremo N y/o el extremo C del péptido.

Sin embargo, cuando la secuencia del péptido es idéntica a una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena o exógena que tiene una función diferente, pueden inducirse efectos colaterales, tales como trastornos autoinmunes o síntomas alérgicos contra sustancias específicas. Entonces, es preferible evitar la situación donde la secuencia inmunogénica coincide con la secuencia de aminoácidos de una proteína conocida. Esta situación puede evitarse realizando una búsqueda de homología en bases de datos disponibles. Si las búsquedas de homología confirman que los péptidos donde hay 1, 2 o varios aminoácidos diferentes no existen

en la naturaleza, luego puede evitarse el peligro de que las modificaciones de las secuencia de aminoácidos mencionadas con anterioridad, por ejemplo, incrementen la afinidad de unión por los antígenos HLA y/o incrementen la capacidad de inducción de CTL.

Aunque se espera los péptidos que tienen una afinidad de unión elevada por los antígenos HLA descriptos con anterioridad sean efectivos como vacunas contra el cáncer, es necesario examinar la presencia efectiva de capacidad de inducción de CTL de los péptidos candidatos, que se seleccionan de acuerdo con la presencia de una afinidad de unión elevada como indicador. La capacidad de inducción de CTL puede confirmarse de forma rutinaria induciendo células presentadoras de antígenos que contienen antígenos MHC humanos (por ejemplo, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas), o más específicamente, células dendríticas derivadas de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana, y después de estimularlas con el péptido de interés, mezclándolas con células CD8-positivas y midiendo la actividad citotóxica contra las células blanco. Como sistema de reacción pueden usarse animales transgénicos producidos para que expresen un antígeno HLA humano (por ejemplo, aquellos descriptos en BenMohamed L, *et al.*, (2000) Hum. Immunol; 61(8):764-79 Related Articles, Books, Linkout). Por ejemplo, las células blanco pueden radiomarcarse con ^{51}Cr y semejantes, y la actividad citotóxica puede calcularse a partir de la radiactividad liberada por las células blanco. Como alternativa, es posible examinarlas midiendo el IFN-gamma producido y liberado por los CTL, en presencia de células presentadoras de antígenos que contienen proteínas inmovilizadas, y visualizando la zona de inhibición en el medio con anticuerpos monoclonales anti-IFN-gamma.

Como resultado del examen de la capacidad de inducción de CTL de los péptidos como se describió con anterioridad, se descubrió que aquellos péptidos que tienen una afinidad de unión alta por un antígeno HLA no presentan necesariamente una capacidad de inducción alta. Sin embargo, los nonapéptidos o decapeptidos seleccionados del grupo de péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos indicadas por los siguientes péptidos presentaron una capacidad de inducción de CTL particularmente alta:

CDH3-A24-9-513 (SEQ ID N° 19),
 CDH3-A24-9-406 (SEQ ID N° 22),
 CDH3-A24-10-807 (SEQ ID N° 30),
 CDH3-A24-10-332 (SEQ ID N° 34),
 CDH3-A24-10-655 (SEQ ID N° 344),
 CDH3-A24-10-470 (SEQ ID N° 358),
 EphA4-A24-9-453 (SEQ ID N° 41),

EphA4-A24-9-5 (SEQ ID N° 44),
EphA4-A24-9-869 (SEQ ID N° 46),
EphA4-A24-9-420 (SEQ ID N° 48),
EphA4-A24-10-24 (SEQ ID N° 78),
EphA4-A02-9-501 (SEQ ID N° 376),
EphA4-A02-9-165 (SEQ ID N° 379),
ECT2-A24-9-515 (SEQ ID N° 80),
ECT2-A24-10-40 (SEQ ID N° 100),
ECT2-A24-10-101 (SEQ ID N° 101),
HIG2-A24-9-19 (SEQ ID N° 110),
HIG2-A24-9-22 (SEQ ID N° 111),
HIG2-A24-9-8 (SEQ ID N° 387),
HIG2-A24-10-7 (SEQ ID N° 112),
HIG2-A24-10-18 (SEQ ID N° 394),
HIG2-A02-9-8 (SEQ ID N° 114),
HIG2-A02-9-15 (SEQ ID N° 116),
HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117),
HIG2-A02-10-8 (SEQ ID N° 121),
INHBB-A24-9-180 (SEQ ID N° 395),
INHBB-A24-10-180 (SEQ ID N° 133),
INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135),
INHBB-A24-10-7 (SEQ ID N° 137),
INHBB-A24-10-212 (SEQ ID N° 426),
KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID N° 174),
KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID N° 178),
KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186),
KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194),
KNTC2-A24-9-309 (SEQ ID N° 196),
KNTC2-A24-9-124 (SEQ ID N° 202),
KNTC2-A24-9-154 (SEQ ID N° 210),
KNTC2-A24-9-150 (SEQ ID N° 213),
KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214),
KNTC2-A24-10-227 (SEQ ID N° 217),

KNTC2-A24-10-273 (SEQ ID N° 223),

TTK-A02-9-462 (SEQ ID N° 227),

TTK-A02-9-547 (SEQ ID N° 228),

TTK-A02-9-719 (SEQ ID N° 233),

TTK-A02-10-462 (SEQ ID N° 254),

URLC-A02-9-206 (SEQ ID N° 271),

URLC-A02-9-212 (SEQ ID N° 272) y

URLC-A02-10-211 (SEQ ID N° 288)

Como se indicó con anterioridad, en la presente invención se proveen péptidos que presentan la capacidad de inducir células T citotóxicas, a saber, aquellos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 376, 379, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 114, 116, 117, 121, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217, 223, 227, 228, 233, 254, 271, 272 ó 288, o una variante de éstos (es decir, aquellos donde se reemplazan, se eliminan o se agregan 1, 2 o varios aminoácidos).

Es preferible que las secuencias de aminoácidos compuestas por 9 ó 10 aminoácidos indicadas en SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 376, 379, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 114, 116, 117, 121, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217, 223, 227, 228, 233, 254, 271, 272 ó 288, o una variante de éstas, no coincidan con una secuencia de aminoácidos asociada con otra proteína endógena.

En particular, la sustitución de un aminoácido por leucina o metionina en el segundo aminoácido desde el extremo N, la sustitución de un aminoácido por valina o leucina en el extremo C, y la adición de un aminoácido en los 1 ó 2 aminoácidos en el extremo N y/o el extremo C son ejemplos de variantes preferidas.

Aquellos entrenados en la técnica han de reconocer que, además de las sustituciones y adiciones de aminoácidos, también pueden usarse fragmentos con actividad inmunológica de los péptidos en los métodos de la invención. Los métodos para determinar los fragmentos activos son bien conocidos en la técnica. Los clones de CTL obtenidos mediante la estimulación con estos péptidos modificados pueden reconocer los péptidos originales y provocar daño en las células que expresan los péptidos originales.

Los péptidos de la presente invención pueden prepararse usando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, los péptidos pueden prepararse por medios sintéticos, usando tecnología de ADN recombinante o síntesis química. Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse individualmente o como polipéptidos más largos, compuestos por dos o más péptidos.

Los péptidos de la presente invención preferiblemente están aislados, es decir, están sustancialmente libres de otras proteínas de ocurrencia natural en la célula huésped, y fragmentos de éstas.

Los péptidos de la presente invención pueden contener modificaciones, tales como glicosilación, oxidación de cadenas laterales o fosforilación; siempre que las modificaciones no destruyan la actividad de los péptidos descritos en la presente documentación, a saber, la capacidad de unirse a un antígeno HLA e inducir los CTL. Otras modificaciones incluyen la incorporación de D-aminoácidos u otros miméticos de aminoácidos, que pueden usarse, por ejemplo, para incrementar la vida media en suero de los péptidos.

Más aún, esta invención puede contener un método para analizar un péptido en el que se han reemplazado 1, 2 o varios aminoácidos, donde dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217 ó 223, donde dicho método comprende los pasos de:

- (a) conformar una homología de secuencia no significativa con la secuencia completa con 1, 2 o varios aminoácidos sustituidos;
- (b) medir la capacidad de inducción de CTL del péptido sustituido candidato; y
- (c) seleccionar el péptido cuya capacidad de inducción de CTL es igual o mayor que la del péptido original.

Por ejemplo, en realizaciones preferidas, en la presente invención se provee un método para identificar un péptido que tiene la capacidad de inducir CTL contra células que expresan al menos un antígeno asociado con un tumor, donde el antígeno asociado con un tumor es un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y URLC10, donde dicho método comprende los pasos de:

- (i) proporcionar o generar al menos una secuencia candidata que consiste en una secuencia de aminoácidos modificada mediante la sustitución, la supresión o la adición de uno, dos o varios residuos de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos original, donde la secuencia de aminoácidos original se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217 ó 223;
- (ii) seleccionar la secuencia candidata que no tiene una homología significativa sustancial con los péptidos derivados de cualquier producto génico humano conocido distinto de dichos antígenos asociados a tumores;

(iii) poner en contacto un péptido que consiste en la secuencia candidata seleccionada en el paso (ii) con células presentadoras de antígenos;

(iv) poner en contacto las células presentadoras de antígenos del paso (iii) con células T para evaluar la capacidad del péptido de estimular las células T; y

(v) identificar el péptido cuya capacidad de inducción de CTL es igual o superior a la de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos original.

Preferiblemente, el aminoácido se reemplaza por un aminoácido diferente que tiene una cadena lateral con propiedades conservadas (un proceso conocido como sustitución de aminoácidos conservativa). Los ejemplos de propiedades de cadenas laterales de aminoácidos incluyen aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrofílicos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), y cadenas laterales que tienen los siguientes grupos funcionales o características en común: una cadena lateral alifática (G, A, V, L, I, P); una cadena lateral que contiene un grupo hidroxilo (S, T, Y); una cadena lateral que contiene un átomo de azufre (C, M); una cadena lateral que contiene un ácido carboxílico y una amida (D, N, E, Q); una cadena lateral que contiene una base (R, K, H); y una cadena lateral que contiene una porción aromática (H, F, Y, W). Vale destacar que las letras entre paréntesis hacen referencia a los códigos de aminoácidos de una sola letra. En la presente invención, la homología significativa sustancial es, por ejemplo, más de 90%, preferiblemente 95%, más preferiblemente 99% o 100% de identidad con el producto génico humano usado para la comparación.

Los péptidos de esta invención pueden prepararse como una combinación que incluye dos o más de los péptidos de la invención, para usarla como una vacuna para una enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, tal como una vacuna que induce CTL *in vivo*. Los cánceres contemplados incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular. Los péptidos pueden hallarse en un cóctel, o pueden conjugarse unos con otros usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los péptidos pueden expresarse como una sola secuencia de polipéptido. Los péptidos en la combinación pueden ser iguales o diferentes.

Cuando se administran los péptidos de esta invención, los péptidos están presentes en una densidad elevada en los antígenos HLA de las células presentadoras de antígenos, que a su vez, inducen CTL que reaccionan específicamente con el complejo formado entre el péptido

presentado y el antígeno HLA. Como alternativa, las células presentadoras de antígenos que tienen inmovilizados los péptidos de esta invención en su superficie, obtenidas extrayendo células dendríticas de los sujetos, pueden estimularse con los péptidos de esta invención. La re-administración de estas células a los sujetos respectivos induce los CTL, y como resultado, es posible incrementar la agresividad contra las células blanco.

Más específicamente, en la presente invención se proveen drogas para tratar y/o prevenir la proliferación, las metástasis y una enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, que incluyen uno o más péptidos de la presente invención, o un polinucleótido que codifica los péptidos. Los péptidos o los polinucleótidos de la presente invención pueden usarse en particular en el tratamiento de una enfermedad asociada con CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres. Los cánceres contemplados incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular.

Los péptidos de esta invención pueden administrársele a un sujeto directamente, como una composición farmacéutica que ha sido formulada de acuerdo con métodos de formulación convencionales. En estos casos, además de los péptidos de esta invención, pueden incluirse vehículos, excipientes y semejantes, que sean de uso común para drogas, según sea apropiado, sin limitaciones particulares. Las composiciones inmunogénicas de esta invención pueden usarse para el tratamiento y la prevención de una enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres. Los cánceres contemplados incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular.

Las composiciones inmunogénicas para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, que incluye como ingrediente activo uno o más péptidos de la presente invención, puede incluir además un coadyuvante, con el fin de establecer efectivamente la inmunidad celular. Como alternativa, pueden administrarse con otros ingredientes

activos, tales como agentes anti-cáncer.

Los cánceres contemplados incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular. Las formulaciones apropiadas incluyen gránulos. Los coadyuvantes apropiados se describen en la literatura (Johnson AG. (1994) C1in. Microbio1. Rev., 7:277-89).

Los ejemplos de coadyuvantes incluyen, sin limitaciones, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio y alúmina. Además, convenientemente pueden usarse formulaciones de liposomas, formulaciones granulares donde la droga está unida a esferas con un diámetro de unos pocos μm , y formulaciones donde hay un lípido unido al péptido. El método de administración puede ser oral, intradérmico, subcutáneo, por inyección intravenosa o similar, y puede incluir la administración sistémica o la administración local en las cercanías del tumor blanco.

La dosis de uno o más péptidos de esta invención puede ajustarse apropiadamente de acuerdo con la enfermedad a tratar, la edad del paciente, el peso, el método de administración, y semejantes. Aunque la dosificación comúnmente es de entre 0,001 mg y 1000 mg, preferiblemente entre 0,01 mg y 100 mg, más preferiblemente entre 0,1 mg y 10 mg, y preferiblemente se administra una vez cada unos pocos días o unos pocos meses. Aquellos entrenados en la técnica podrán seleccionar fácilmente la dosis y el método de administración apropiado, ya que la selección y la optimización de estos parámetros está dentro del conocimiento de la técnica.

Además, en la presente invención se proveen vesículas intracelulares denominadas exosomas, que presentan complejos formados entre los péptidos de esta invención y los antígenos HLA en su superficie. Los exosomas pueden prepararse, por ejemplo, usando los métodos descritos en detalle en la Traducción Japonesa Publicada de las Publicaciones Internacionales N° 11-510507 y 2000-512161, y preferiblemente se preparan usando células presentadoras de antígenos obtenidas de sujetos que son los blancos del tratamiento y/o la prevención. Los exosomas de esta invención pueden inocularse como vacunas contra el cáncer, de forma similar a los péptidos de esta invención.

El tipo de antígenos HLA usados debe coincidir con los del sujeto que requiere el tratamiento y/o la prevención. Por ejemplo, en la población japonesa comúnmente es apropiado HLA-A24 o HLA-A2, particularmente HLA-A2402 o HLA-A0201.

En algunas realizaciones, las composiciones de vacunas de la presente invención

incluyen un componente que ceba los linfocitos T citotóxicos. Los lípidos han sido identificados como agentes capaces de cebar CTL *in vivo* contra antígenos virales. Por ejemplo, es posible unir residuos de ácido palmítico a los grupos α -amino del extremo ϵ de un residuo de lisina, y luego puede unírseles a un péptido inmunogénico de la invención. Después, el péptido con lípidos puede administrarse directamente, en una micela o una partícula, puede incorporarse en un liposoma, o puede emulsionarse en un coadyuvante. A modo de otro ejemplo de un lípido que ceba las respuestas de los CTL, pueden usarse lipoproteínas de *E. coli*, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina (P3CSS), para cebar los CTL cuando se los une a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres K, *et al.*, (1989) *Nature* 342:561-4).

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención también pueden incluir ácidos nucleicos que codifican uno o más de los péptidos inmunogénicos descriptos en la presente documentación. Véanse, por ejemplo, Wolff JA *et al.*, (1990) *Science* 247:1465-8; las Patentes de los EEUU N° 5580859, 5589466, 5804566, 5739118, 5736524, 5679647, y WO 98/04720. Los ejemplos de tecnologías de administración basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", administración facilitada (mediada por bupivacaína, polímeros, péptidos), mediada por complejos de lípidos catiónicos y partículas ("cañón de genes"), o administración mediada a presión (véase, por ejemplo, la Patente de los EEUU N° 5922687).

Los péptidos inmunogénicos de la invención también pueden ser expresados por vectores virales o bacterianos. Los ejemplos de vectores de expresión apropiados incluyen huéspedes virales apropiados, tales como viruela o viruela aviar. Este abordaje comprende el uso de virus de viruela, por ejemplo, como un vector para expresar secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. Al introducirse en un huésped, el virus de viruela recombinante expresa el péptido inmunogénico, por lo que provoca una respuesta inmune. Los vectores de viruela y los métodos útiles en los protocolos de inmunización se describen, por ejemplo, en la Patente de los EEUU N° 4722848. Otro vector apropiado es BCG (bacilo de Calmette Guerin). Los vectores de BCG se describen en Stover CK, *et al.*, (1991) *Nature* 351:456-60. En la técnica se conoce una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o la inmunización, por ejemplo, vectores de adenovirus y virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores de *Salmonella typhi*, vectores de la toxina del ántrax destoxificada, y semejantes. Véanse, 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.

En la presente invención también se proveen métodos para inducir células presentadoras de antígenos usando uno o más péptidos de esta invención. Las células presentadoras de

antígenos pueden inducirse induciendo células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica, y luego poniéndolas en contacto (estimulándolas) con uno o más péptidos de esta invención, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Cuando los péptidos de la presente invención se le administran a los sujetos, las células presentadoras de antígenos que tienen los péptidos de esta invención inmovilizados son inducidas en el cuerpo del sujeto. Como alternativa, después de inmovilizar los péptidos de esta invención en las células presentadoras de antígenos, las células pueden administrársele al sujeto como una vacuna. Por ejemplo, la administración *ex vivo* puede incluir los pasos de:

- a: poner en contacto las células presentadoras de antígenos de un sujeto, y
- b: poner en contacto las células presentadoras de antígenos del paso a con un péptido de la presente invención.

Como alternativa, de acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de los péptidos de esta invención para fabricar una composición farmacéutica que induce células presentadoras de antígenos. Además, en la presente invención también se provee el péptido de la presente invención para inducir células presentadoras de antígenos. Las células presentadoras de antígenos obtenidas en el paso b pueden administrársele al sujeto como una vacuna.

En esta invención también se provee un método para inducir células presentadoras de antígenos con un nivel elevado de capacidad de inducción de células T citotóxicas, donde el método incluye el paso de transferir genes compuestos por uno o más polinucleótidos que codifican uno o más péptidos de esta invención a células presentadoras de antígenos *in vitro*. Los genes introducidos pueden tomar la forma de ADN o ARN. Como método de introducción, sin limitaciones particulares, pueden usarse apropiadamente diversos métodos de uso convencional en este campo, tales como la lipofección, la electroporación y el método mediado por 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; Traducción Japonesa Publicada de la Publicación Internacional N° 2000-509281. Cuando un gen se transfiere a las células presentadoras de antígenos, el gen es transcrito y traducido en la célula, y la proteína obtenida es procesada por el MHC clase I o clase II, y procede a través de una vía de presentación para presentar péptidos parciales.

Además, en la presente invención se proveen métodos para inducir CTL usando uno o más péptidos de esta invención. Cuando los péptidos de esta invención se le administran a un sujeto, se inducen CTL en el cuerpo del sujeto, por lo que se potencia la fuerza del sistema inmune

que ataca las células que expresan *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y/o *URLC10*, por ejemplo, las células cancerosas.

Los cánceres contemplados incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular. Como alternativa, los péptidos de la presente invención pueden usarse en el contexto de un método terapéutico *ex vivo*, donde las células presentadoras de antígenos y las células CD8-positivas o los leucocitos mononucleares de sangre periférica derivados del sujeto se ponen en contacto (se estimulan) con uno o más péptidos de esta invención *in vitro*, y después de inducir los CTL, las células se devuelven al sujeto. Por ejemplo, el método puede inducir los pasos de:

- a: recolectar células presentadoras de antígenos de un sujeto,
- b: poner en contacto las células presentadoras de antígenos del paso a con un péptido de la presente invención,
- c: mezclar las células presentadoras de antígenos del paso b con células T CD⁸⁺ y co-cultivarlas para inducir células T citotóxicas:, y
- d: recolectar células T CD⁸⁺ del co-cultivo del paso c.

Como alternativa, de acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de los péptidos de esta invención para fabricar una composición farmacéutica para inducir CTL. Además, en la presente invención también se provee el péptido de la presente invención para inducir CTL. Las células T CD⁸⁺ que tienen actividad citotóxica, obtenidas en el paso d, pueden administrársele al sujeto como una vacuna.

Además, en la presente invención se proveen células T citotóxicas aisladas, inducidas usando los péptidos de esta invención. Las células T citotóxicas, inducidas por la estimulación con una célula presentadora de antígenos que presenta uno o más péptidos de esta invención, preferiblemente derivan de los sujetos que son el blanco del tratamiento y/o la prevención, y pueden administrarse solas o en combinación con otras drogas, incluyendo uno o más péptidos de esta invención, o exosomas con actividad anti-tumoral. Las células T citotóxicas obtenidas actúan específicamente contra células blanco que presentan los péptidos de esta invención, o preferiblemente el o los mismos péptidos usados para la inducción. Las células blanco pueden ser células que expresan *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y/o *URLC10* en forma endógena, o células que han sido transfectadas con genes *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*,

INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10. Las células que presentan los péptidos de esta invención sobre su superficie debido a la estimulación con estos péptidos también pueden convertirse en blancos del ataque.

En la presente invención también se proveen células presentadoras de antígenos que presentan complejos formados entre antígenos HLA y uno o más péptidos de esta invención. Las células presentadoras de antígenos, obtenidas mediante el contacto con los péptidos de esta invención o los nucleótidos que codifican estos péptidos, preferiblemente derivan de los sujetos que son el blanco del tratamiento y/o la prevención, y pueden administrarse como vacunas, solas o en combinación con otras drogas, incluyendo los péptidos, los exosomas o las células T citotóxicas de la presente invención.

En la presente invención también se provee una composición compuesta por ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que son capaces de formar una subunidad de un receptor de células T (TCR), y métodos para usarla. Las subunidades de TCR tienen la capacidad de formar TCR que le confieren especificidad a las células T por las células tumorales que presentan CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK o URLC10. Cuando se usa el método conocido en la técnica, es posible identificar los ácidos nucleicos de las cadenas alfa y beta que actúan como subunidades de TCR de los CTL inducidos con uno o más péptidos de esta invención (WO2007/032255 y Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Los TCR derivados preferiblemente se unen a células blanco que presentan el péptido CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK o URLC10 con gran avidéz, y opcionalmente median en la eliminación eficiente de las células blanco que presentan el péptido CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK o URLC10 in vivo e in vitro.

Los ácidos nucleicos que codifican las subunidades de TCR pueden incorporarse en vectores apropiados, por ejemplo, vectores retrovirales. Estos vectores son bien conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos, o los vectores que los contienen, pueden transferirse de forma útil a una célula T, donde la célula T preferiblemente es de un paciente. Ventajosamente, en la invención se provee una composición de venta libre que permite la modificación rápida de las células T de un paciente (o las de un mamífero), para producir rápida y fácilmente células T modificadas que tienen excelentes propiedades de eliminación de células cancerosas.

También, en la presente invención se proveen CTL que se preparan por transducción con ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de subunidades de TCR que se unen con péptidos CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK o URLC10, por ejemplo, SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 376, 379, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 114, 116,

117, 121, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217, 223, 227, 228, 233, 254, 271, 272 ó 288, en el contexto de HLA-A24 o HLA-A2. Los CTL transducidos pueden dirigirse a las células cancerosas in vivo, y pueden expandirse con un método de cultivo bien conocido in vitro (por ejemplo, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Las células T de la invención pueden usarse para formar una composición inmunogénica útil para tratar o prevenir el cáncer en un paciente que necesita terapia o protección (WO2006/031221).

En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" (también conocida como una composición inmunogénica) hace referencia a una sustancia que induce inmunidad anti-tumoral o suprime cánceres al inocularse en animales. De acuerdo con la presente invención, se sugirió que los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217 ó 223 son epitopes peptídicos restringidos a HLA-A24, y se sugirió que aquellos de SEQ ID N° 376, 379, 114, 116, 117, 121, 227, 228, 233, 254, 271, 272 ó 288 son epitopes peptídicos restringidos a HLA-A2, que pueden inducir una respuesta inmune potente y específica contra células que expresan CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, células cancerosas que expresan CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10. Los cánceres contemplados incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular.

Por consiguiente, en la presente invención también se incluye un método para inducir inmunidad anti-tumoral usando polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 376, 379, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 114, 116, 117, 121, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217, 223, 227, 228, 233, 254, 271, 272 ó 288, o variantes de éstos (es decir, que incluyen 1, 2 o varias (por ejemplo, hasta 5) sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos). En general, la inmunidad anti-tumoral incluye las siguientes respuestas inmunes:

- una inducción de linfocitos citotóxicos contra tumores que contienen células que expresan CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10,
- una inducción de anticuerpos que reconocen tumores que contienen células que expresan CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, y
- una inducción de la producción de citoquinas antitumorales.

Entonces, cuando un péptido determinado induce cualquiera de estas respuestas inmunes al inoculárselo a un mamífero, se decide que el péptido tiene un efecto inductor de inmunidad anti-tumoral. La inducción de la inmunidad anti-tumoral por un péptido puede detectarse observando *in vivo* o *in vitro* la respuesta del sistema inmune del huésped contra el péptido.

Por ejemplo, un método para detectar la inducción de los linfocitos T citotóxicos es bien conocido. Una sustancia extraña que ingresa en el cuerpo vivo es presentada a las células T y las células B por la acción de las células presentadoras de antígenos (APC). Las células T que responden al antígeno presentado por las APC de una forma específica para el antígeno se diferencian en células T citotóxicas (también conocidas como linfocitos T citotóxicos o CTL) debido a la estimulación por el antígeno, y luego proliferan; este proceso se conoce en la presente documentación como "activación" de las células T. Entonces, la inducción de los CTL por un péptido determinado puede evaluarse presentándole el péptido a una célula T con una APC, y detectando la inducción de CTL. Además, los APC que tienen el efecto de activar células T CD4+, células T CD8+, macrófagos, eosinófilos y células NK. Como las células T CD4+ también son importantes en la inmunidad anti-tumoral, donde la inmunidad anti-tumoral que induce la acción del péptido puede evaluarse usando el efecto de activación de estas células como indicador.

En la técnica es bien conocido un método para evaluar la acción de inducción de CTL usando células dendríticas (DC) como APC. Las DC son APC representativas que tienen la acción de inducción de CTL más fuerte entre las APC. En este método, el polipéptido de prueba inicialmente se pone en contacto con la DC y luego esta DC se pone en contacto con células T. La detección de las células T que tienen efectos citotóxicos contra las células de interés después del contacto con las DC demuestra que el polipéptido de prueba tiene una actividad que induce las células T citotóxicas. La actividad de los CTL contra los tumores puede detectarse, por ejemplo, usando la lisis de células tumorales marcadas con ^{51}Cr como indicador. Como alternativa, es bien conocida la evaluación del grado de daño de las células tumorales usando la actividad de asimilación de ^3H -timidina o la liberación de LDH (lactosa deshidrogenasa) como indicador. Además, esto también puede examinarse midiendo el IFN-gamma producido y liberado por los CTL, en presencia de células presentadoras de antígenos que contienen péptidos inmovilizados, realizando una visualización con anticuerpos anti-IFN-gamma, tal como un ensayo ELISPOT.

Aparte de las DC, también pueden usarse células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como APC. Se ha informado que la inducción de CTL es mejorada mediante el cultivo de las PBMC en presencia de GM-CSF e IL-4. De forma similar, se ha demostrado que los CTL son inducidos por el cultivo de las PBMC en presencia de hemocianina de *Diodora aspera* (KLH) e IL-7.

Los polipéptidos de prueba confirmados como poseedores de actividad de inducción de CTL de acuerdo con estos métodos son polipéptidos que tienen un efecto de activación de DC, y por lo tanto, actividad de inducción de CTL. Entonces, los polipéptidos que inducen CTL contra las células que expresan CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10 son útiles como vacunas contra enfermedades asociadas con CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres. Además, los APC que han adquirido la capacidad de inducir CTL contra una enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, mediante el contacto con los polipéptidos, son útiles como vacunas contra la enfermedad. Además, los CTL que han adquirido citotoxicidad debido a la presentación de polipéptidos antigénicos por las APC también pueden usarse como vacunas contra una enfermedad asociada con CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres. Estos métodos terapéuticos para una enfermedad asociada con CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, donde se usa inmunidad anti-tumoral debida a APC y CTL, se conocen como inmunoterapia celular. Los cánceres contemplados incluyen, sin limitaciones, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular.

En general, cuando se usa un polipéptido para la inmunoterapia celular, la eficiencia de la inducción de CTL puede incrementarse combinando una pluralidad de polipéptidos que tienen distintas estructuras y poniéndolos en contacto con DC. Entonces, cuando se estimulan DC con fragmentos de proteínas, resulta ventajoso usar una mezcla de múltiples tipos de fragmentos.

La inducción de la inmunidad anti-tumoral por un polipéptido puede confirmarse adicionalmente observando la inducción de la producción de anticuerpos contra tumores. Por ejemplo, cuando se inducen anticuerpos contra un polipéptido en un animal de laboratorio inmunizado con el polipéptido. Y cuando se los cultiva, se suprime la proliferación y/o la metástasis de las células tumorales con estos anticuerpos, se determina que el polipéptido induce inmunidad anti-tumoral.

La inmunidad anti-tumoral puede inducirse administrando una vacuna de esta invención, y la inducción de la inmunidad anti-tumoral permite el tratamiento y la prevención de una enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres. La terapia o la prevención del inicio de una

enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, puede incluir la inhibición del crecimiento de células que expresan CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, células cancerosas, la involución de estas células y la supresión de la de ocurrencia de estas células, por ejemplo, células cancerosas. La disminución de la mortalidad de los individuos que tienen una enfermedad asociada con CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, reduce los marcadores de enfermedad en sangre, alivia los síntomas que acompañan la enfermedad, y por ello también se incluyen en la terapia o la prevención de la enfermedad, por ejemplo, cánceres. Estos efectos terapéuticos y preventivos preferiblemente tienen una significación estadística, por ejemplo, se observan con un nivel de significación 5% o menos, donde el efecto terapéutico o preventivo de una vacuna contra una enfermedad asociada con CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, se compara con un control sin la administración de vacuna. Por ejemplo, puede usarse una prueba t de Student, la prueba U de Mann-Whitney o un ANOVA para determinar la significación estadística.

Como en la presente invención se provee un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, los compuestos o las composiciones terapéuticas pueden administrarse en forma profiláctica o terapéutica a sujetos que sufren o están en riesgo (o son susceptibles) de desarrollar la enfermedad. Estos sujetos pueden identificarse usando métodos clínicos convencionales. En el contexto de la presente invención, la administración profiláctica ocurre antes de la manifestación de síntomas clínicos claros de la enfermedad, por lo que se previene la enfermedad o el trastorno, o como alternativa, se demora su progresión. En el contexto del campo de la medicina, el término "prevenir" abarca cualquier actividad que reduce la carga de mortalidad o morbilidad de la enfermedad. La prevención puede ocurrir a niveles de prevención primarios, secundarios y terciarios. Si bien la prevención primaria evita el desarrollo de una enfermedad, los niveles de prevención secundarios y terciarios abarcan actividades dirigidas a la progresión de una enfermedad y la emergencia de síntomas, y también la reducción del impacto negativo de una enfermedad ya establecida, al restaurar la función y reducir las complicaciones relacionadas con la enfermedad.

En el contexto del tratamiento del cáncer, el término "eficaz" hace referencia a un tratamiento que resulta en una reducción del tamaño, la prevalencia o el potencial metastático de un cáncer en un sujeto. Cuando un tratamiento se aplica en forma profiláctica, "eficaz" denota que

el tratamiento demora o previene la aparición de trastornos distintos de cáncer, o alivia un síntoma clínico del cáncer. La evaluación del cáncer puede realizarse usando protocolos clínicos convencionales. Además, la eficacia de un tratamiento puede determinarse en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar el cáncer. Por ejemplo, el cáncer puede diagnosticarse por medios histopatológicos o identificando las anormalidades sintomáticas.

El péptido mencionado con anterioridad, que tiene actividad inmunológica, o un polinucleótido o un vector que codifica este péptido, puede combinarse con un coadyuvante. Un coadyuvante hace referencia a un compuesto que mejora la respuesta inmune contra el péptido cuando se los administra junto (o sucesivamente) con el péptido que tiene actividad inmunológica. Los ejemplos de coadyuvantes apropiados incluyen la toxina del cólera, la toxina del cólera *Salmonella*, alúmina y semejantes, pero no se limitan a éstos. Además, una vacuna de esta invención puede combinarse apropiadamente con un vehículo aceptable para el uso farmacéutico. Los ejemplos de estos vehículos son el agua esterilizada, la solución salina fisiológica, el amortiguador de fosfato, el fluido de cultivo y semejantes. Además, según sea necesario, la vacuna puede contener estabilizadores, suspensiones, preservantes, agentes tensioactivos y semejantes. La vacuna se administra en forma sistémica o local. La administración de la vacuna puede realizarse en una sola administración, o puede reforzarse con varias administraciones.

Cuando se usan APC o CTL como la vacuna de esta invención, puede tratarse o prevenirse una enfermedad asociada con la sobreexpresión de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y/o URLC10, por ejemplo, cánceres, por ejemplo, con el método *ex vivo*. Más específicamente, se recolectan PBMC del sujeto que recibe el tratamiento o la prevención *ex vivo* con un péptido de la presente invención. Después de la inducción de APC o CTL, las células pueden administrarse al sujeto. Las APC también pueden inducirse introduciendo un vector que codifica el péptido en PBMC *ex vivo*. Las APC o los CTL inducidos *in vitro* pueden clonarse antes de la administración. Al clonar y cultivar células que tienen una mayor actividad de daño de las células blanco, la inmunoterapia celular puede realizarse de forma más efectiva. Además, las APC y los CTL aislados de esta forma pueden usarse para la inmunoterapia celular, no solamente los contra individuos de cuyas células derivan, sino también contra enfermedades de tipos similares en otros individuos.

Los aspectos de la presente invención se describen en los siguientes ejemplos, que solamente se presentan para ilustrar la presente invención y ayudar a aquellos entrenados en la técnica a prepararla y usarla. Los ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención de modo alguno.

Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente documentación en la práctica o la evaluación de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales apropiados.

EJEMPLOS

De aquí en adelante se describe la presente invención a modo de ejemplo en los siguientes ejemplos, pero no se la restringe de modo alguno. Sin embargo, los materiales, los métodos y semejantes descritos en la presente documentación solamente ilustran aspectos de la invención, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de modo alguno. Por ende, en la práctica o la evaluación de la presente invención pueden usarse materiales, métodos y semejantes similares o equivalentes a aquellos descritos.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Las células A24LCL (HLA-A24), las líneas de células linfoblastoides B humanas se establecieron por transformación con virus de Epstein-Bar, las células T2, COS7, A498, Caki-2 y HEK 293 se adquirieron en ATCC. Caki-1 y MIAPaca-2 se adquirieron en JCRB. PK-45P, PK-59, TE-5 y TE-6 se adquirieron en TKG. 293T se adquirieron en GenHunter.

Selección de péptidos candidatos derivados de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK y URLC10

Los péptidos 9-meros y 10-meros derivados de *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* o *URLC10* que se unían a la molécula HLA-A*2402 o HLA-A*0201 se predijeron usando el software de predicción "BIMAS" (http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) (Parker KC, *et al.*, (1994) J Immunol; 152(1):163-75; Kuzushima K, *et al.*, (2001) Blood; 98(6):1872-81). Estos péptidos se sintetizaron en Sigma (Sapporo, Japón), de acuerdo con el método de síntesis en fase sólida, y se purificaron por HPLC de fase inversa. La pureza (>90%) y la identidad de los péptidos se determinaron por HPLC analítica y análisis de espectrometría de masa, respectivamente. Los péptidos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a razón de 20 mg/ml, y se almacenaron a -80°C.

Inducción de CTL *in vitro*

Se usaron células dendríticas (DC) derivadas de monocitos como células presentadoras de antígenos (APC) para inducir respuestas de CTL contra péptidos presentados en HLA. Las DC se generaron *in vitro* como se describió en otra publicación (Nukaya I *et al.*, (1999) Int. J. Cancer 80, 92-7, Tsai V *et al.*, (1997) J. Immunol 158:1796-802). Brevemente, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un voluntario normal (HLA-A*2402 y/o HLA-A*0201) por

medio de una solución de Ficoll-Paque (Pharmacia) se separaron en función de su adherencia a un frasco de cultivo de tejido plástico (Becton Dickinson), con el fin de enriquecer la fracción de monocitos. La población enriquecida en monocitos se cultivó en presencia de 1000 U/ml de GM-CSF (Genzima) y 1000 U/ml de IL-4 (Genzima) en AIM-V (Invitrogen) que contenía suero autólogo inactivado con calor (AS) al 2%. Después de 7 días en el cultivo, las DC generadas con citoquinas se trataron con pulsos de 20 microg/ml de los péptidos sintetizados en presencia de 3 microg/ml de β 2-microglobulina por 4 horas a 20°C en AIM-V. Estas DC tratadas con pulsos de péptidos se inactivaron posteriormente con MMC (30 microg/ml por 30 minutos) y se mezclaron en una relación 1:20 con células T CD8⁺ autólogas, obtenidas mediante una selección positiva con Dynabeads M-450 CD8 (Dyna) y DETACHa BEAD™ (Dyna). Estos cultivos se prepararon en placas de 48 cavidades (Corning); donde cada cavidad contenía $1,5 \times 10^4$ DC tratadas con pulsos de péptidos, 3×10^5 células T CD8⁺ y 10 ng/ml de IL-7 (Genzyme) en 0,5 ml de AIM-V/2% de AS. Tres días después, estos cultivos se suplementaron con IL-2 (CHIRON) hasta una concentración final de 20 IU/ml. Los días 7 y 14, las células T se estimularon una vez más con las DC autólogas tratadas con pulsos de péptidos. Cada vez, las DC se prepararon del mismo modo que se describió con anterioridad. Los CTL se evaluaron contra células A24LCL o células T2 tratadas con pulsos de péptidos después del 3^{er} procedimiento de estimulación con péptido el día 21.

Procedimiento de expansión de CTL

Los CTL se expandieron en cultivo usando un método similar al descrito por Riddell SR, *et al.*, (Walter EA *et al.*, (1995) N Engl J Med 333:1038-44; Riddell SR, *et al.*, (1996) Nature Med. 2:216-23). Un total 5×10^4 CTL se resuspendieron en 25 ml de AIM-V/5% de AS con 2 tipos de líneas de células B-linfoblastoides humanas, inactivadas por MMC, en presencia de 40 ng/ml de un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen). Un día después de iniciar los cultivos, se agregaron 120 IU/ml de IL-2 a los cultivos. A los cultivos se les agregó AIM-V/5% de AS fresco con 30 IU/ml de IL-2 los días 5, 8 y 11.

Establecimiento de los clones de CTL

Se realizaron diluciones para obtener 0,3, 1 y 3 CTL/cavidad en una placa de microtitulación de 96 cavidades de fondo redondo (Nalge Nunc International). Los CTL se cultivaron con 7×10^4 células/cavidad de 2 tipos de líneas de células B-linfoblastoides humanas, 30 ng/ml de un anticuerpo anti-CD3 y 125 U/ml de IL-2, en un total de 150 microl/cavidad de AIM-V con 5% de AS. Se agregaron 50 microl/cavidad de IL-2 al medio 10 días después, de modo que la IL-2 tuviera una concentración final de 125 U/ml. La actividad de los CTL se evaluó el 14º día, y los clones de CTL se expandieron usando el método anterior.

Actividad de CTL específica

Para examinar la actividad de CTL específica, se realizaron ensayos ELISPOT de IFN-gamma y ELISA de IFN-gamma.

Brevemente, se prepararon células A24-LCL o T2 tratadas con pulsos de péptido (1×10^4 /cavidad) como células estimuladoras. Como células de respuesta se usaron células cultivadas en 48 cavidades, o los clones de CTL después de limitar la dilución. Los ensayos de ELISPOT y ELISA de IFN-gamma se realizaron de acuerdo con el procedimiento del fabricante.

Establecimiento de células con expresión forzada del gen blanco y/o HLA-A02 ó HLA-A24

El ADNc que codifica un marco abierto de lectura de los genes blanco o HLA-A02 ó HLA-A24 se amplificó por PCR. El producto amplificado por PCR se clonó en el vector pcDNA3.1 myc-His (Invitrogen). Los plásmidos se transfectaron en los células blanco, HLA-A02 y HLA-A24, o en las líneas de células humanas normales COS7 ó 293T, usando lipofectamina (Invitrogen) de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante. Como alternativa, el plásmido que contenía el blanco se transfectó en A24-LCL por electroporación usando un dispositivo GenePulserII (Biorad). Brevemente, se trataron $2,5 \times 10^6$ células A24-LCL con pulsos de 10 mcg de plásmido a 140V y 1000 microF. Dos días después de la transfección, las células transfectadas se trataron con solución de disociación celular y se usaron como células blanco para el ensayo de actividad de CTL.

Ensayo de citotoxicidad

La actividad citotóxica se evaluó con un ensayo de liberación de ^{51}Cr de cuatro horas. Las células blanco se trataron con pulsos con una concentración de 20 mg/ml de péptidos durante la noche. Las células blanco se marcaron con 100 microCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ a 37°C por una hora, y luego se lavaron tres veces con RPMI1640. Las células blanco (1×10^4 /100 microl) y 100 microl de células efectoras a diversas concentraciones, con un volumen total de 200 microl, se colocaron en una placa de microtitulación de 96 cavidades con fondo redondo (Corning), y se cultivaron a 37°C en una incubadora con CO_2 por cuatro horas. Después del cultivo, se recolectaron 100 microl de sobrenadante de cada cavidad, y se midió la radiactividad usando un contador gamma. La liberación espontánea fue la radiactividad de las células blanco, y la liberación media fue la obtenida en ausencia de células efectoras, y la liberación máxima fue la radiactividad de las células blanco con HCl 1 M.

El porcentaje de citotoxicidad específica se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

% de lisis específica = $[(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} -$

liberación espontánea)] x 100.

Resultados

Expresión mejorada de *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y *URLC10* en cánceres

Los datos del perfil de expresión genética global obtenidos de los diversos cánceres usando la microserie de ADNc revelaron que la expresión de los siguientes genes era elevada.

CDH3 (Nº de Acceso GenBank NM_001793; SEQ ID Nº 1, 2),

EPHA4 (Nº de Acceso GenBank L36645; SEQ ID Nº 3, 4),

ECT2 (Nº de Acceso GenBank AY376439; SEQ ID Nº 5, 6),

HIG2 (Nº de Acceso GenBank NM_013332; SEQ ID Nº 7, 8),

INHBB (Nº de Acceso GenBank NM_002193; SEQ ID Nº 9, 10),

KIF20A (Nº de Acceso GenBank NM_005733; SEQ ID Nº 11, 12),

KNTC2 (Nº de Acceso GenBank AF017790; SEQ ID Nº 13, 14),

TTK (Nº de Acceso GenBank NM_003318; SEQ ID Nº 15, 16) y

URLC10 (Nº de Acceso GenBank NM_017527; SEQ ID Nº 17, 18).

La expresión de *CDH3* fue fehacientemente elevada en los siguientes cánceres, en comparación con el tejido normal correspondiente.

26 de los 34 cánceres de vejiga,

17 de los 19 cánceres cervicales,

19 de los 19 carcinomas colangiocelulares,

30 de los 34 cánceres colorrectales,

20 de las 21 endometriosis,

13 de los 20 cánceres gástricos,

7 de los 8 cánceres gástricos de tipo difuso,

36 de los 37 NSCLC,

16 de los 16 cánceres de páncreas,

21 de los 21 tumores de tejidos blandos y

10 de los 10 tumores testiculares.

La expresión de *EPHA4* fue fehacientemente elevada en los siguientes cánceres, en comparación con el tejido normal correspondiente.

14 de los 34 cánceres de vejiga,

8 de los 14 cánceres cervicales,

10 de los 25 carcinomas colangiocelulares,

5 de las 15 endometriosis,
 5 de los 8 cánceres gástricos de tipo difuso,
 5 de los 5 cánceres de ovario,
 14 de los 14 cánceres de páncreas,
 20 de los 51 cánceres de próstata y
 14 de los 23 tumores de tejidos blandos

La expresión de *ECT2* fue fehacientemente elevada en los siguientes cánceres, en comparación con el tejido normal correspondiente.

17 de los 19 cánceres de vejiga,
 5 de los 12 cánceres de mama,
 14 de los 14 cánceres cervicales,
 13 de los 13 carcinomas colangiocelulares,
 5 de los 5 CML,
 7 de los 8 cánceres colorrectales,
 12 de los 16 cánceres de esófago,
 6 de los 16 NSCLC,
 8 de los 10 linfomas,
 1 de 1 cáncer de páncreas,
 10 de los 13 cánceres de próstata,
 3 de los 6 carcinomas renales y
 12 de los 13 cánceres SCLC.

La expresión de *HIG2* fue fehacientemente elevada en 19 de los 20 cánceres renales y 7 de los 9 tumores de tejidos blandos, en comparación con el tejido normal correspondiente.

La expresión de *INHBB* fue fehacientemente elevada en los siguientes cánceres, en comparación con el tejido normal correspondiente.

10 de los 21 carcinomas colangiocelulares,
 12 de los 12 cánceres de esófago,
 10 de los 13 NSCLC,
 22 de los 24 carcinomas renales,
 8 de los 14 cánceres SCLC y
 45 de los 49 tumores de tejidos blandos,

La expresión de *KIF20A* fue fehacientemente elevada en los siguientes cánceres, en comparación con el tejido normal correspondiente.

31 de los 31 cánceres de vejiga,
 38 de los 61 cánceres de mama,
 10 de los 11 carcinomas colangiocelulares,
 7 de los 19 cánceres de esófago,
 21 de los 22 NSCLC,
 6 de los 6 cánceres de ovario,
 17 de los 36 cánceres de próstata,
 6 de los 11 carcinomas renales y
 15 de los 15 SCLC.

La expresión de KNTC2 fue fehacientemente elevada en los siguientes cánceres, en comparación con el tejido normal correspondiente.

30 de los 32 cánceres de vejiga,
 47 de los 56 cánceres de mama,
 10 de los 10 cánceres cervical,
 16 de los 22 carcinomas colangiocelulares,
 17 de los 37 CML,
 3 de los 10 cánceres colorrectales,
 11 de los 46 cánceres de esófago,
 15 de los 19 NSCLC,
 7 de los 8 linfomas,
 20 de los 24 osteosarcoma,
 3 de los 5 cánceres de ovario,
 2 de los 2 cánceres de páncreas,
 15 de los 37 cánceres de próstata,
 14 de los 19 carcinomas renales,
 15 de los 15 SCLC y
 40 de los 59 tumores de tejidos blandos

La expresión de TTK fue fehacientemente elevada en los siguientes cánceres, en comparación con el tejido normal correspondiente.

27 de los 27 cánceres de vejiga,
 25 de los 30 cánceres de mama,
 15 de los 16 cánceres cervicales,
 10 de los 10 carcinomas colangiocelulares,

- 5 de los 7 CML,
- 6 de los 10 cánceres colorrectales,
- 24 de los 44 cánceres de esófago,
- 8 de los 15 cánceres de hígado,
- 12 de los 12 NSCLC,
- 6 de los 6 linfomas,
- 13 de los 16 osteoblastomas,
- 12 de los 17 cánceres de próstata,
- 15 de los 15 SCLC y
- 16 de los 33 tumores de tejidos blandos.

La expresión de URLC10 fue fehacientemente elevada en los siguientes cánceres, en comparación con el tejido normal correspondiente

- 29 de los 29 cánceres de vejiga,
- 15 de los 16 cánceres cervicales,
- 7 de los 7 carcinomas colangiocelulares,
- 7 de los 19 cánceres de esófago,
- 3 de los 3 cánceres gástricos,
- 24 de los 27 NSCLC,
- 15 de los 19 osteosarcomas,
- 4 de los 5 cánceres de páncreas,
- 33 de los 43 tumores de tejidos blandos.

Tabla 1 Relación de casos observados de regulación positiva de *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* o *URLC10* en tejido canceroso, en comparación con el tejido normal correspondiente.

	CDH3	EPHA4	ECT2	HIG2	INHBB
Cáncer de vejiga	26/34	14/34	17/19	-	-
Cáncer de mama	-	-	5/12	-	-
Cáncer cervical	17/19	8/14	14/14	-	-
Carcinoma colangiocelular	19/19	10/25	13/13	-	10/21

CML	-	-	5/5	-	-
Cáncer colorrectal	30/34	-	7/8	-	-
Endometriosis	20/21	5/15	-	-	-
Cáncer de esófago	-	-	12/16	-	12/12
Cáncer gástrico	13/20	-	-	-	-
Cáncer gástrico de tipo difuso	7/8	5/8	-	-	-
Cáncer de hígado	-	-	-	-	-
Cáncer de células pulmonares no pequeñas	36/37	-	6/16	-	10-13
Linfoma	-	-	8/10	-	-
Osteosarcoma	-	-	-	-	-
Cáncer de ovario	-	5/5	-	-	-
Cáncer de páncreas	16/16	14/14	1/1	-	-
Cáncer de próstata	-	20/51	10/13	-	-
Carcinoma renal	-	-	3/6	19/20	22/24
Cáncer de células pulmonares pequeñas	-	-	12/13	-	8/14
Tumor de	21/21	14/23	-	7/9	45/49

tejido blando					
Tumor testicular	10/10	-	-	-	-

	KIF20A	KNTC2	TTK	URLC10
Cáncer de vejiga	31/31	30/32	27/27	29/29
Cáncer de mama	38/61	47/56	25/30	-
Cáncer cervical	-	10/10	15/16	15/16
Carcinoma colangiocelular	10/11	16/22	10/10	7/7
CML	-	17/37	5/7	-
Cáncer colorrectal	-	3/10	6/10	-
Endometriosis	-	-	-	-
Cáncer de esófago	7/19	11/46	24/44	7/19
Cáncer gástrico	-	-	-	3/3
Cáncer gástrico de tipo difuso	-	-	-	-
Cáncer de hígado	-	-	8/15	-
Cáncer de células pulmonares no pequeñas	21/22	15/19	12/12	14/27
Linfoma	-	7/8	6/6	-
Osteosarcoma	-	20/24	16/16	15/19
Cáncer de ovario	-	3/5	-	-
Cáncer de páncreas	6/6	2/2	-	4/5
Cáncer de próstata	17/36	15/37	12/17	-
Carcinoma renal	6/11	14/19	-	-
Cáncer de células	15/15	15/15	15/15	-

pulmonares pequeñas				
Tumor de tejido blando	-	40/59	16/33	33/43
Tumor testicular	-	-	-	-

Predicción de los péptidos que se unen a HLA-A24 o HLA-A2 derivados de CDH3, EPHA4, ECT2, HIG2, INHBB, KIF20A, KNTC2, TTK o URLC10

En la **Tabla 2** se detallan los péptidos que se unen a HLA-A*2402 para CDH3 en orden de afinidad de unión. En la **Tabla 2A** se detallan los péptidos 9-meros derivados de CDH3, y en la **Tabla 2B** se detallan los péptidos 10-meros derivados de CDH3.

En la **Tabla 3** se detallan los péptidos que se unen a HLA-A*2402 y HLA-A*0201 para EPHA4 en orden de afinidad de unión. En la **Tabla 3A** se detallan los péptidos 9-meros derivados que se unen a HLA-A*2402 de EPHA4, en la **Tabla 3B** se indican los péptidos 10-meros derivados de HLA-A*2402 que se unen a EPHA4, y en la **Tabla 3C** se detallan los péptidos 9-meros derivados de HLA-A*0201 que se unen a EPHA4.

En la **Tabla 4** se detallan los péptidos que se unen a HLA-A*2402 para ECT2 en orden de afinidad de unión. En la **Tabla 4A** se detallan los péptidos 9-meros derivados de ECT2, y en la **Tabla 4B** se indican péptidos 10-meros derivados de ECT2.

En la **Tabla 5** se detallan los péptidos que se unen a HLA-A*2402 y HLA-A*0201 para HIG2, en la **Tabla 5A** se detallan los péptidos 9-meros derivados de HLA-A*2402 que se unen a HIG2, en la **Tabla 5B** se detallan los péptidos 10-meros derivados de HLA-A*2402 que se unen a HIG2, en la **Tabla 5C** se detallan los péptidos 9-meros derivados de HLA-A*0201 que se unen a HIG2, y en la **Tabla 5D** se indican los péptidos 10-meros derivados de HLA-A*0201 que se unen a HIG2.

En la **Tabla 6** se detallan los péptidos que se unen a HLA-A*2402 y HLA-A*0201 para INHBB, en la **Tabla 6A** se indican los péptidos 9-meros derivados de HLA-A*2402 que se unen a INHBB, en la **Tabla 6B** se detallan los péptidos 10-meros derivados de HLA-A*2402 que se unen a INHBB, en la **Tabla 6C** se detallan los péptidos 9-meros derivados de HLA-A*0201 que se unen a INHBB, y en la **Tabla 6D** se indican los péptidos 10-meros derivados de HLA-A*0201 que se unen a INHBB.

En la **Tabla 7** se detallan los péptidos que se unen a HLA-A*2402 para KIF20A en orden de afinidad de unión. En la **Tabla 7A** se detallan los péptidos 9-meros derivados de KIF20A, y en la **Tabla 7B** se detallan los péptidos 10-meros derivados de KIF20A.

ST

En la **Tabla 8** se detallan los péptidos que se unen a HLA-A*2402 para KNTC2 en orden de afinidad de unión. En la **Tabla 8A** se detallan los péptidos 9-meros derivados de KNTC2, y en la **Tabla 8B** se detallan los péptidos 10-meros derivados de KNTC2.

En la **Tabla 9** se detallan los péptidos que se unen a HLA-A*0201 para TTK en orden de afinidad de unión. En la **Tabla 9A** se detallan los péptidos 9-meros derivados de TTK, y en la **Tabla 9B** se detallan los péptidos 10-meros derivados de TTK.

En la **Tabla 10** se detallan los péptidos que se unen a HLA-A*0201 para URLC10 en orden de afinidad de unión. En la **Tabla 10A** se detallan los péptidos 9-meros derivados de URLC10, y en la **Tabla 10B** se detallan los péptidos 10-meros derivados de URLC10.

Explicación y definición de los términos en las tablas

La posición inicial indica la cantidad de aminoácidos desde el extremo N.

La calificación de unión deriva de “BIMAS”, descrito en la sección de materiales y métodos.

La cantidad de donantes positivos indica la cantidad de donantes cuyas células T CD8+ pueden ser inducidas en los CTL específicos por la estimulación ex vivo con células presentadoras de antígenos. Esto se indica como (cantidad de donantes positivos/cantidad total de donantes).

La cantidad de cavidades positivas indica la cantidad de cavidades donde pudo detectarse producción específica de IFN-gamma con un ensayo ELISPOT de IFN-gamma. A partir de un donante pueden prepararse entre 4 y 8 cavidades. Esto se indica como (cantidad de cavidades positivas/cantidad de cavidades evaluadas con el ensayo ELISPOT de IFN-gamma).

La línea de CTL positivos indica la cantidad de líneas de CTL establecidas a partir de cavidades positivas. La línea de generación de CTL se determina con un ELISA. Esto se indica como (cantidad de líneas de CTL establecidas/cantidad de cavidades positivas evaluadas con un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma).

Ningún donante positivo se define a partir de la ausencia de cavidades positivas detectables, sino por la ausencia de líneas de CTL establecidas.

Los péptidos indicados en negrita en la tabla poseen actividad de estimulación de células T.

La ausencia de datos de cantidad de donantes positivos, cantidad de cavidades positivas y líneas de CTL positivos, indicada con “-”, denota que los péptidos no pudieron sintetizarse por alguna razón.

Tabla 2A-1 Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de *CDH3*

Posición inicial	Secuencia de aminoácidos	Calificación de unión	Cantidad de donantes positivos	Cantidad de cavidades positivas	Línea de CTL positivos	SEQ ID Nº
513	IYEVMLAM	37.5	1/3			19
667	LFLLLVLLL	36	-	-	-	20
30	VFREAETL	24	0/3	1/22	0/1	21
406	LYVEVTNEA	16.632	1/3			22
332	KYEAHVPEN	16.5	0/3	1/22	0/1	23
180	KYELFGHAV	15	0/3	1/22	0/1	24
85	RSLKERNPL	14.4	0/3	1/22	0/1	25
5	RGPLASLLL	12	0/3	2/22	0/2	26
652	KGGFILPVL	11.2	0/3	0/22	-	27
248	TYNGVVAYS	10.5	0/3	2/22	0/2	28
65	LFSTDNDDF	10	0/3	0/22	-	29
94	KIFPSKRIL	9.6	0/1	0/8	-	306
221	RGSVLEGVL	9.6	0/1	0/8	-	307
668	FLLLVLLLL	8.4	-	-	-	308
754	IGNFIENL	8.4	-	-	-	309
311	TAVAVVEIL	8.4	0/1	0/8	-	310
557	NQSPVRQVL	8.064	0/1	0/8	-	311
611	KQDTYDVHL	8	0/1	0/8	-	312
781	DYEGSGSDA	7.5	0/1	0/8	-	313
165	GWLLLNKPL	7.2	0/1	0/8	-	314

[Table 2A-2]

656	ILPVLGAVL	7.2	0/1	0/8	-	315
770	TAPPYDTLL	7.2	0/1	0/8	-	316
602	VVLSLKKFL	7.2	0/1	0/8	-	317
665	ALLFLLLVL	7.2	-	-	-	318
410	VTNEAPFVL	7.2	0/1	0/8	-	319
662	AVLALLFLL	7.2	-	-	-	320
613	DTYDVHLSL	6.72	0/1	0/8	-	321

89

6	GPLASLLLL	6	0/1	0/8	-	322
564	VLNITDKDL	6	0/1	0/8	-	323
159	AVEKETGWL	6	0/1	0/8	-	324
511	NNIYEVML	6	0/1	0/8	-	325
11	LLLLQVCWL	6	-	-	-	326
57	GCPGQEPAL	6	0/1	0/8	-	327
293	EYTLTIQAT	6	0/1	0/8	-	328
79	ETVQERRSL	6	0/1	0/8	-	329
475	SYRILRDPA	6	0/1	0/8	-	330
493	GQVTAVGTL	6	0/1	0/8	-	331
661	GAVLALLFL	6	0/1	0/8	-	332
388	GILTTRKGL	6	0/1	0/8	-	333
382	HPESNQGIL	6	0/1	0/8	-	334
663	VLALLFLLL	5.76	-	-	-	335
598	EGDTVVLSL	5.6	0/1	0/8	-	336
278	TISVISSGL	5.6	0/1	2/8	0/2	337
659	VLGAVLALL	5.6	0/1	0/8	-	338
811	EWGSRFKKL	5.28	0/1	0/8	-	339
445	KVVEVQEGI	5.04	0/1	0/8	-	340
614	TYDVHLSLS	5	0/1	0/8	-	341
142	FYSITGPGA	5	0/1	0/8	-	342
246	IYTYNGVVA	5	0/1	0/8	-	343

Tabla 2B-1 Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de CDH3

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID Nº
807	DYLN e WGSRF	150	1/3			30
248	TYNG v VAYSI	105	0/3	4/22	0/4	31
667	LFL L IVLLLL	42	-	-	-	32
397	DFEAK N QHTL	30	0/3	2/22	0/2	33
332	KYEA h VPENA	21	1/3			34

180	KYELFGHAVS	15	0/3	2/22	0/2	35
510	RNNIYEVML	12	0/3	4/22	0/4	36
5	RGPLASLLLL	12	0/3	1/22	0/1	37
477	RILRDPAGWL	12	0/3	1/22	0/1	38
556	CNQSPVRQVL	10.08	0/3	2/22	0/2	39
655	FILPvLGAVL	8.64	1/3			344
662	AVLAILFLLL	8.64	-	-	-	345

[Table 2B-2]

277	GTISvISSGL	8.4	0/3	0/20	-	346
781	DYEGsGSDAA	7.5	0/3	0/20	-	347
601	TVVLsLKKFL	7.2	0/3	3/20	0/3	348
158	FAVEKETGWL	7.2	0/3	0/20	-	349
665	ALLFILLVLL	7.2	-	-	-	350
259	SQEPkDPHDL	7.2	0/3	0/20	-	351
664	LALLfLLLVL	7.2	-	-	-	352
42	GAEQePGQAL	7.2	0/3	1/20	0/1	353
661	GAVLaLLFLL	7.2	-	-	-	354
595	VNEEgDTVVL	7.2	0/2	0/12	-	355
340	NAVGHvEQRL	7.2	0/2	0/12	-	356
411	TNEApFVLKL	6.6	0/2	0/12	-	357
470	ENQKiSYRIL	6	1/2			358
10	SLLLIQVCWL	6	0/2	1/12	0/1	359
721	GLEArPEVVL	6	0/2	2/12	0/2	360
345	EVQRITVTDL	6	0/2	4/12	0/4	361
2	GLPRgPLASL	6	0/2	3/12	0/3	362
657	LPVLgAVLAL	6	-	-	-	363
563	QVLNiTDKDL	6	0/2	1/12	0/1	364
159	AVEKeTGWLL	6	0/2	2/12	0/2	365
492	SGQVtAVGTL	6	0/2	-	-	366
387	QGILtTRKGL	6	0/2	-	-	367
525	SPPTtGTGTL	6	0/2	2/12	0/2	368
358	NSPAwRATYL	6	0/2	2/12	0/2	369

122	GPFPqRLNQL	5.76	0/2	3/12	0/3	370
753	EIGNfIIENL	5.6	0/2	1/12	0/1	371
310	TTAVaVVEIL	5.6	-	-	-	372
246	IYTYnGVVAY	5	0/2	2/12	0/2	373
805	DYDYINEWGS	5	0/2	0/12	-	374

Tabla 3A Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de *EPHA4*

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID Nº
97	VYIEIKFTL	504	0/2	1/16	0/1	40
453	RYSVALAWL	400	2/3			41
25	VYPANEVTL	300	0/3	0/22	-	42
384	HYTPQQNGL	288	0/3	1/22	0/1	43
5	FYFALFSCL	288	1/2			44
519	GYGDFSEPL	240	0/3	3/22	0/3	45
869	KFGQIVNML	67.2	1/3			46
777	AYTTRGGKI	55	0/3	1/22	0/1	47
420	KYNPNPDQS	18	1/3			48
749	RNILVNSNL	16.8	0/3	1/22	0/1	49
734	KYLSDMSYV	15	0/3	0/22	-	50
879	KLIRNPNSL	14.4	0/3	0/22	-	51
926	RYKDNFTAA	14.4	0/3	0/22	-	52
834	KAIEEGYRL	14.4	0/3	0/22	-	53
574	KYSKAKQEA	13.2	0/3	0/22	-	54
184	AFQDVGACI	12.6	0/3	1/22	0/1	55
252	WLVPIGNCL	12.096	0/3	0/22	-	56
326	RPPSAPLNL	12	0/3	0/22	-	57
203	KCPLTVRNL	12	0/3	0/22	-	58
360	SYNVVCKKC	11.55	0/3	0/22	-	59

Tabla 3B Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de *EPHA4*

62

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
25	VYPANEVTLL	300	0/3	0/22	-	60
244	MYCGADGEWL	200	0/3	1/22	0/1	61
657	GYTDKQRRDF	120	0/3	1/22	0/1	62
5	FYFAIFSCLF	100	-	-	-	63
102	KFTLRDCNSL	48	0/3	1/22	0/1	64
818	SYGERPYWDM	30	0/3	2/22	0/2	65
4	IFYFALFSCF	28.8	-	-	-	66
808	SYGIVMWEVM	25	-	-	-	67
630	EFGEVCSGRL	24	0/3	0/22	-	68
420	KYNPNPDQSV	21.6	0/3	0/22	-	69
930	NFTAAGYTTL	20	0/2	0/16	-	70
675	QFDHPNIIHL	20	0/3	0/22	-	71
708	AFLRKNDGRF	15	0/3	0/22	-	72
579	KQEADEEKHL	12	0/3	1/22	0/1	73
727	RGIGSGMKYL	12	0/3	0/22	-	74
96	RVYIEIKFTL	11.2	0/2	1/16	0/1	75
507	SYVFHVRART	10.5	0/3	1/22	0/1	76
251	EWLVPIGNCL	10.08	0/3	0/22	-	77
24	RVYPANEVTL	9.6	1/3			78
699	EYMENGSLDA	9	0/3	0/22	-	79

Tabla 3C Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*0201 derivados de EPHA4

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
8	ALFSCLFGI	514.942	-	-	-	375
501	GLNPLTSYV	382.536	1/1			376
12	CLFGICDAV	126.098	0/1	1/5	0/1	377

977	QMHGRMVPV	115.534	0/1	1/5	0/1	378
165	KLNTEIRDV	111.979	1/1			379
252	WLVPIGNCL	98.267	0/1	1/5	0/1	380
879	KLIRNPNSL	74.768	0/1	1/5	0/1	381
559	VVILIAAFV	56.902	-	-	-	382
812	VMWEVMSYG	39.386	0/1	0/5	-	383
728	GIGSGMKYL	37.157	0/1	0/5	-	384
750	NILVNSNLV	35.385	0/1	1/5	0/1	385
937	TTLEAVVHV	33.705	0/1	1/5	0/1	386

Tabla 4A Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de ECT2

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID Nº
515	TYPFVNFF	216	1/1			80
140	LYCTSMNML	200	0/1	0/8	-	81
298	LYVVKQEWf	150	0/1	0/8	-	82
435	NYVNILATI	105	0/1	0/8	-	83
773	IYTADPESF	100	0/1	0/8	-	84
110	LYKADCRVI	50	0/1	0/8	-	85
739	SFQMTSDEL	33	0/1	0/8	-	86
504	IFLKYSKDL	30	0/1	0/8	-	87
867	FFERRSHTL	30	0/1	0/8	-	88
178	DFNSKVTHL	30	0/1	0/8	-	89
61	KQEELIKAL	17.28	0/1	0/8	-	90
657	RGEQVTLFL	16.8	0/1	2/8	0/2	91
568	RLPSVALLL	16.8	0/1	0/8	-	92
550	KPECGRQSL	14.4	0/1	0/8	-	93
470	IFGSIPDIF	14	0/1	0/8	-	94
116	RVIGPPVVL	12	0/1	0/8	-	95
507	KYSKDLVKT	11	0/1	0/8	-	96
223	DFYAAVDDF	10	0/1	0/8	-	97

Tabla 4B Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de ECT2

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
322	LYEKaNTPEL	330	0/1	0/8	-	98
435	NYVNiLATII	90	0/1	0/8	-	99
40	SYVEeEMPQI	90	1/1			100
101	DFQDsVFNDL	72.576	1/1			101
866	SFFEiRSHTL	24	0/1	0/8	-	102
811	SFSKiPKRAL	20	0/1	1/8	0/1	103
268	KYLPiGDERC	18	0/1	0/8	-	104
84	EFEGiDSPEF	16.5	0/1	1/8	0/1	105
236	KVPPfQDCIL	14.4	0/1	0/8	-	106
728	RPPTeQANVL	14.4	0/1	0/8	-	107
507	KYSKdLVKTY	12	0/1	0/8	-	108
281	VVEEnIVKDL	10.08	0/1	0/8	-	109

Tabla 5A Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de HIG2

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
19	IFVRVMESL	42	1/3			110
22	RVMESLEGL	14.4	1/3			111
8	YLLGVVLTl	8.4	1/3			387
7	LYLLGWVLT	7.5	0/2	3/15	0/3	388
23	VMESLEGLL	7.2	0/2	0/16	-	389
9	LLGVVLTLL	5.6	-	-	-	390

Tabla 5B Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de HIG2

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes	cantidad de cavidades	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
------------------	-----------	-----------------------	----------------------	-----------------------	------------------------	-----------

			positivos	positivas		
7	LYLLGVVLT	420	1/3			112
22	RVMESLEGLL	17.28	0/3	4/24	0/4	113
8	YLLGVVLTLL	8.4	-	-	-	391
5	LNLYLLGVVL	7.2	0/2	0/12	-	392
46	LANTEPTKGL	6	0/2	0/14	-	393
18	SIFVRVMESL	5.6	1/2			394

Tabla 5C Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*0201 derivados de HIG2

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID Nº
8	YLLGVVLT	836.253	1/1			114
13	VTLLSIFV	650.311	0/1	0/12	-	115
15	TLLSIFVRV	488.951	1/1			116
4	VLNLYLLGV	271.948	1/1			117
9	LLGVVLTLL	83.527	0/1	0/12	-	118
22	RVMESLEGL	31.957	0/1	0/12	-	119
6	NLYLLGVVL	28.027	0/1	0/12	-	120

Tabla 5D Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A*0201 derivados de HIG2

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID Nº
8	YLLGvVLTLL	836.253	1/1			121
12	VVLTILSIFV	210.538	-	-	-	122
29	GLLEsPSPGT	113.047	0/1	0/12	-	123
6	NLYLIGVVLT	54.847	-	-	-	124
4	VLNLyLLGVV	14.495	0/1	0/12	-	125
15	TLLSiFVRVM	13.174	0/1	0/12	-	126
18	SIFVrVMESL	12.248	0/1	0/12	-	127

14	LTLLsIFVRV	11.545	-	-	-	128
----	------------	--------	---	---	---	-----

Tabla 6A Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de *INHBB*

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
383	LYFDDEYNI	60	0/3	0/20	-	129
238	LFERGERRL	30	0/3	1/19	0/1	130
7	RALGAACLL	12	0/3	0/21	-	131
388	EYNIVKRDV	10.5	0/3	0/18	-	132
180	LYLKLLPYV	9	1/2			395
163	ISNEGNQNL	8.64	0/1	0/8	-	396
223	RSGWHTFPL	8	0/1	0/6	-	397
176	ASLWLYLKL	7.92	0/1	0/7	-	398
338	AYLAGVPGS	7.5	0/1	1/7	0/1	399
213	NMVEKRVDL	7.2	0/1	0/8	-	400
102	AMVTALRKL	6.6	0/1	0/8	-	401
250	VQCDSCQEL	6.336	0/1	0/8	-	402
369	NSCCIPTKL	6.16	0/1	0/8	-	403
330	NYCEGSCPA	6	0/1	0/7	-	404
172	FVVQASLWL	6	0/1	0/8	-	405
355	VNQYRMRGL	6	0/1	0/8	-	406
307	QFFIDFRLI	6	0/1	0/7	-	407
14	LLLLAAGWL	6	-	-	-	408
306	QQFFIDFRL	5.6	0/1	0/6	-	409
170	NLFVVQASL	5.6	0/1	0/7	-	410
327	YYGNYCEGS	5	0/1	1/8	0/1	411

Tabla 6B Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de *INHBB*

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
------------------	-----------	-----------------------	--------------------------------	---------------------------------	------------------------	-----------

67

180	LYLKLLPYVL	360	1/3			133
171	LFVVQASLWL	30	-	-	-	134
305	RQQFFIDFRL	16.8	1/3			135
73	DFLEAVKRHI	12.6	0/3	4/20	0/4	136
7	RALGAACLLL	12	1/3			137
273	RPFVVVQARL	11.2	0/3	1/20	0/1	138
338	AYLAGVPGSA	10	0/3	2/20	0/2	139
169	QNLFvVQASL	8.4	0/1	1/6	0/1	412
249	DVQCdSCQEL	7.92	0/1	4/6	0/4	413
173	VVQAsLWLYL	7.2	0/1	0/6	-	414
383	LYFDdEYNIV	7.2	0/1	0/6	-	415
229	FPLTeAIQAL	7.2	0/1	1/6	0/1	416
299	RTNLcCRQQF	7.2	0/1	5/6	0/5	417
101	AAMVtALRKL	6.6	0/1	2/6	0/2	418
368	VNSCcIPTKL	6.16	0/1	2/6	0/2	419
13	CLLLIAAGWL	6	-	-	-	420
354	VVNQyRMRGL	6	0/1	0/6	-	421
150	DGLAsSRVRL	6	0/1	2/6	0/2	422
293	GLECdGRTNL	6	0/1	0/6		423
330	NYCEgSCPAY	6	0/1	1/6	0/1	424
176	ASLWIYLKLL	6	0/1	1/6	0/1	425
212	WNMVeKRVDL	6	1/1			426
74	FLEAvKRHIL	6	0/1	2/6	0/2	427
331	YCEGsCPAYL	6	0/1	1/6	0/1	428
77	AVKRhILSRL	5.6	0/1	1/6	0/1	429
175	QASLwLYLKL	5.28	0/1	2/6	0/2	430
326	GYYGnYCEGS	5	0/1	1/6	0/1	431
159	LYFFiSNEGN	5	0/1	4/6	0/4	432
327	YYGNyCEGSC	5	0/1	1/6	0/1	433

Tabla 6C Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*0201 derivados de *INHBB*

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de	cantidad de	línea de CTL	SEQ ID N°
------------------	-----------	-----------------------	-------------	-------------	--------------	-----------

			donantes positivos	cavidades positivas	positivos	
177	SLWLYLKLL	407.808	0/1	0/8		140
14	LLLLAAGWL	96.074	-	-	-	141
170	NLFVVQASL	79.041	0/1	0/8		142
213	NMVEKRVDL	63.256	0/1	0/8		143
172	FVVQASLWL	47.291	0/1	0/8		144
306	QQFFIDFRL	46.48	0/1	0/8		145
281	RLGDSRHRI	42.774	0/1	0/8		146
174	VQASLWLYL	34.427	0/1	0/8		147
257	ELAVVPV FV	28.69	0/1	1/8	0/1	148
313	RLIGWNDWI	28.116	0/1	1/8	0/1	149
139	RVSEIISFA	22.546	0/1	3/8	0/3	150
151	GLASSRVRL	21.362	0/1	0/8		151
8	ALGAACLLL	21.362	0/1	1/8	0/1	152
250	VQCDSCQEL	15.096	0/1	1/8	0/1	153

Tabla 6D Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A*0201 derivados de *INHBB*

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID Nº
179	WLYLKLLPYV	12951.1	0/1	1/8	0/1	154
301	NLCCRQQFFI	332.806	0/1	0/8		155
237	ALFERGERRL	64.814	0/1	0/8		156
382	MLYFDDEYNI	56.754	0/1	0/8		157
13	CLLLLAAGWL	56.514	-	-	-	158
8	ALGAACLLLL	49.134	-	-	-	159
313	RLIGWNDWII	32.081	0/1	0/8		160
173	VVQASLWLYL	29.711	0/1	2/8	0/2	161
256	QELAVVPV FV	27.521	0/1	0/8		162
162	FISNEGNQNL	13.512	0/1	1/8	0/1	163
305	RQQFFIDFRL	12.562	0/1	0/8		164

362	GLNPGTVNSC	11.426	0/1	0/7		165
85	RLQMRGRPNI	10.433	0/1	1/8	0/1	166
69	RVDGDFLEAV	10.425	0/1	0/8		167

Tabla 7A Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de KIF20A

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
308	IYNELLYDL	432	0/2	0/14	-	168
621	MYEEKLNIL	432	0/2	0/14	-	169
67	VYLRVRPLL	420	0/2	0/14	-	170
499	KFSAIASQL	56	0/2	0/14	-	171
304	SFFEIYNEL	44.352	0/2	0/14	-	172
187	IFNSLQGQL	36	0/2	0/14	-	173
305	FFEIYNELL	30	1/2			174
23	MFESTAADL	30	0/2	0/14	-	175
256	SFDSGIAGL	20	0/2	0/14	-	176
298	RFSIWISFF	20	-	-	-	177
383	IFSIRILHL	20	1/2			178
647	KIEELEALL	17.28	0/2	0/14	-	179
625	KLNILKESL	14.4	0/2	0/14	-	180
695	KLQQCKAEL	13.2	0/2	0/14	-	181
726	FTIDVDKKL	11.088	0/2	0/14	-	182
688	QLQEVKAKL	11.088	0/2	0/14	-	183

Tabla 7B Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de KIF20A

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
308	IYNEILYDLL	432	0/2	0/14	-	184
182	RSLAIIFNSL	24.192	0/2	1/14	0/1	185
304	SFFEiYNELL	24	1/2			186

742	RLLRtELQKL	15.84	0/2	0/14	-	187
739	KNIRILRTEL	15.84	0/2	0/14	-	188
218	RQEEEmKKLSL	14.4	0/2	2/14	0/2	189
70	RVRPILPSEL	12.672	0/2	0/14	-	190
871	RILRsRRSPL	12	0/2	0/14	-	191
89	RIENvETLVL	12	0/2	1/14	0/1	192
364	KNQSfASTHL	12	0/2	0/14	-	193
66	KVYLrVRPLL	11.2	1/2			194
60	DSMEkVKVYL	10.08	0/2	0/14	-	195

Tabla 8A Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de *KNTC2*

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
309	KYQAYMSNL	600	1/3			196
457	VYVPLKELL	432	0/3	0/18	-	197
414	EYHKLARKL	264	0/3	0/18	-	198
139	SYELPDTKF	165	0/3	0/18	-	199
629	KYEKKATLI	150	0/3	0/18	-	200
400	KYARGKEAI	100	0/3	1/18	0/1	201
124	DFLKIFTFL	50.4	1/3			202
134	GFLCPSYEL	33	0/3	0/18	-	203
257	LFNVDAFKL	33	0/3	0/18	-	204
242	SFDEMNAEL	26.4	0/3	0/18	-	205
128	IFTFLYGFL	24	0/3	0/18	-	206
146	KFEEEVPRI	18	0/3	1/18	0/1	207
368	RINHERNEL	15.84	0/3	1/18	0/1	208
235	SFMSGADSF	15	0/3	0/18	-	209
154	IFKDLGYPF	14.4	1/3			210
563	EYQLVVQTT	12.6	0/3	0/18	-	211
474	KALNKKMGL	12	0/3	1/18	0/1	212
150	EVPRIFKDL	10.08	1/3			213

Tabla 8B Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A*2402 derivados de *KNTC2*

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
452	KYRAQVYVPL	560	2/3			214
610	EYEECMSEDL	360	0/3	1/18	0/1	215
360	KYSVADIERI	100	0/3	0/18	-	216
227	DYTIKCYESF	100	1/3			217
146	KFEEEVPRIF	50.4	0/3	0/18	-	218
90	AFIQQCIRQL	30	0/3	0/18	-	219
20	RSQDVNKQGL	17.28	0/3	1/18	0/1	220
501	RTLKEEVQKL	15.84	0/3	0/18	-	221
403	RGKEAIETQL	13.44	0/3	1/18	0/1	222
273	RALNEQIARL	12	1/3			223
563	EYQLVVQTTT	10.5	0/3	3/22	0/3	224
467	ETEEEINKAL	10.08	0/3	1/22	0/1	225
541	LLESTVNQGL	10.08	0/3	1/22	0/1	226

Tabla 9A Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*0201 derivados de *TTK*

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID N°
462	YMSCFRTPV	878.055	1/1			227
547	KQIYAIKYV	312.218	1/1			228
630	NMLEAVHTI	262.897	0/1	1/8	0/1	229
278	LLNSPDCDV	118.238	0/1	1/8	0/1	230
498	ILATPLQNL	83.527	0/1	0/8	-	231
811	YVLGQLVGL	73.172	0/1	0/8	-	232
719	SLGCILYYM	62.845	1/2			233
670	QMQPDTTSV	50.232	0/1	0/8	-	234
804	GTTEEMKYV	50.102	0/1	0/8	-	235

654	LIVDGMLKL	47.088	0/1	1/8	0/1	236
363	SLLAKLEET	31.074	0/1	0/8	-	237
790	YVQIQTHPV	27.995	0/1	0/8	-	238
785	LLAHPYVQI	26.604	0/1	0/8	-	239
86	KLIGRYSQA	26.082	0/1	0/8	-	240
186	NLNLQKKQL	21.362	0/1	0/8	-	241
671	MQPDTTSVV	20.152	0/1	0/8	-	242
577	KLQQHSDKI	17.892	0/1	0/8	-	243
142	FAFVHISFA	14.856	0/1	0/8	-	244
322	CELRNLKSV	11.509	0/1	0/8	-	245
824	SILKAAKTL	10.868	0/1	0/8	-	246

Tabla 9B Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A*0201 derivados de TTK

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID Nº
68	LLLKLEKNSV	437.482	0/1	0/8	-	247
277	NLLNSPDCDV	257.342	0/1	0/8	-	248
653	FLIVDGMLKL	226.014	0/1	0/8	-	249
423	TTFEQPVFSV	195.487	0/1	0/8	-	250
542	VLNEKKQIYA	190.448	0/1	0/8	-	251
658	GMLKLIDFGI	161.697	0/1	0/8	-	252
194	LLSEEEKKNL	148.896	0/1	0/8	-	253
462	YMSCFRTPVV	94.738	1/1			254
57	MMANNPEDWL	70.685	0/1	0/8	-	255
600	MVMECGNIDL	48.205	0/1	0/8	-	256
689	YMPPEAIKDM	37.961	0/1	0/8	-	257
86	KLIGRYSQAI	36.515	0/1	0/8	-	258
669	NQMCPDTTSV	26.092	0/1	1/8	0/1	259
497	QILATPLQNL	24.997	0/1	0/8	-	260
654	LIVDGMLKLI	22.997	0/1	0/8	-	261
186	NLNLQKKQLL	21.362	0/1	1/8	0/1	262

670	QMQPDTTSVV	20.595	0/1	0/8	-	263
803	KGTTEEMKYV	20.102	0/1	0/8	-	264
11	LTIDSIMNKV	15.486	0/1	0/8	-	265
577	KLQQHSDKII	14.971	0/1	0/8	-	266

Tabla 10A Péptidos 9-meros que se unen a HLA-A*0201 derivados de URLC10

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de donantes positivos	cantidad de cavidades positivas	línea de CTL positivos	SEQ ID Nº
131	KIFPRFFMV	1364.78	0/1	0/8	-	267
204	GLWLAILLL	407.808	0/1	0/8	-	268
65	LLVVALPRV	271.948	0/1	0/8	-	269
60	ALLALLLV	242.674	-	-	-	270
206	WLAILLLLA	52.561	1/1			271
212	LLASIAAGL	36.316	1/1			272
210	LLLLASIAA	31.249	0/1	0/8	-	273
137	FMVAKQCSA	16.505	0/1	2/8	0/2	274
58	TMALLALLL	15.428	0/1	2/8	0/2	275
59	MALLALLLV	13.975	0/1	2/8	0/2	276
209	ILLLLASIA	12.812	0/1	0/8	-	434
208	AILLLLASI	12.208	-	-	-	277
69	ALPRVWTD	8.446	0/1	0/8	-	278
197	SMGESCGGL	8.223	0/1	0/8	-	279
61	LLALLLVVA	7.964	-	-	-	280
67	VVALPRVWT	6.097	0/1	0/8	-	281
72	RVWTDANLT	5.412	0/1	0/8	-	282
160	FLLEEMPFP	5.2	0/1	1/8	0/1	283
62	LALLLVVAL	4.292	0/1	0/8	-	284
57	GTMALLALL	2.525	0/1	1/8	0/1	285

Tabla 10B Péptidos 10-meros que se unen a HLA-A*0201 derivados de URLC10

Posición inicial	secuencia	Calificación de unión	cantidad de	cantidad de	línea de CTL	SEQ ID Nº
------------------	-----------	-----------------------	-------------	-------------	--------------	-----------

7A

			donantes positivos	cavidades positivas	positivos	
64	LLLVALPRV	1006.21	0/1	0/8	-	286
204	GLWLAILLLL	407.808	0/1	1/8	0/1	287
211	LLLASIAAGL	134.369	1/1			288
258	TMALLALLLV	115.534	-	-	-	289
61	LLALLLVVAL	83.527	-	-	-	290
160	FLLEEMPFF	65.782	0/1	0/8	-	291
209	ILLLLASIAA	31.249	0/1	0/8	-	292
131	KIFPRFFMVA	26.186	0/1	0/8	-	293
60	ALLALLLVVA	17.334	-	-	-	294
66	LVVALPRVWT	6.097	0/1	0/8	-	295
59	MALLALLLV	5.73	-	-	-	296
2	RLQRPRQAPA	4.968	0/1	1/8	0/1	297
112	CQNPRRCKWT	4.156	0/1	0/8	-	298
72	RVWTDANLTA	3.608	0/1	0/8	-	299
53	WAPLGTMALL	3.139	0/1	0/8	-	300
121	TEPYCVIAAV	3.111	0/1	0/8	-	301
162	LEEMPFFYL	2.739	0/1	1/8	0/1	302
181	LEGPPISSV	2.299	0/1	2/8	0/2	303
170	YLKCKIRYC	2.024	0/1	0/8	-	304
130	VKIFPRFFMV	1.81	0/1	0/8	-	305

Estimulación de las células T usando los péptidos predichos de CDH3 restringidos con HLA-A*2402, y establecimiento de líneas de CTL estimulados con péptidos derivados de CDH3

Los CTL para aquellos péptidos derivados de *CDH3* se generaron de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Se obtuvieron CTL con actividad de CTL específica detectable, determinada con un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, y se los ilustra en la **Figura 1**. En particular, CDH3-A24-9-513 (SEQ ID N° 19), CDH3-A24-9-406 (SEQ ID N° 22), CDH3-A24-10-807 (SEQ ID N° 30), CDH3-A24-10-332 (SEQ ID N° 34), CDH3-A24-10-655 (SEQ ID N° 344) y CDH3-A24-10-470 (SEQ ID N° 358) presentaron una producción potente de IFN-gamma, en comparación con el control, en un ensayo de ELISPOT de IFN-gamma, y las células en la cavidad positiva #5, estimuladas con SEQ ID N° 19, aquellas en la cavidad positiva

75

#2, estimuladas con SEQ ID N° 22, aquellas en la cavidad positiva #5, estimuladas con SEQ ID N° 30, aquellas en la cavidad positiva #4, estimuladas con SEQ ID N° 34, aquellas en la cavidad positiva #1, estimuladas con SEQ ID N° 344, y aquellas en la cavidad positiva #4, estimuladas con SEQ ID N° 358, se expandieron, y se establecieron las líneas de CTL. Las líneas de CTL con mayores actividades de CTL específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido, se determinaron con un ELISA. Los resultados se ilustran en la **Figura 1**. Por otro lado, otros péptidos indicados en la Tabla 2 no pudieron establecer líneas de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA-A*2402. Por ejemplo, los péptidos negativos típicos (CDH3-A24-10-248) se indican en la **Figura 1a**. En esta invención, los péptidos que pudieron establecer una línea de CTL se seleccionaron como péptidos estimuladores potentes de CTL.

Establecimiento de clones de CTL estimulados con péptidos derivados de CDH3

Además, la dilución limitativa de estas líneas de CTL se realizó de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. El establecimiento de las líneas de clones de CTL de CDH3-A24-10-807 (SEQ ID N° 30) #5 y CDH3-A24-10-655 (SEQ ID N° 344) #1 se ilustra en las **Figuras 1f y g**. Los clones de CTL presentaron actividades de CTL potentes y específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido.

Actividad de CTL específica contra células blanco que expresan CDH3 y HLA-A*2402

Se examinó la capacidad de la línea de CTL establecida contra estos péptidos de reconocer células blanco que expresan CDH3 y HLA-A*2402. La actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas con el gen completo CDH3 y la molécula HLA-A*2402, que sirve como modelo específico para las células blanco que expresan en forma endógena CDH3 y HLA-A*2402, se evaluó usando como células efectoras las líneas de CTL desarrolladas por CDH3-A24-10-807 (SEQ ID N° 30) y CDH3-A24-10-655 (SEQ ID N° 344). Se prepararon COS7 transfectadas con el gen completo CDH3, pero sin HLA-A*2402, y COS7 transfectadas con HLA-A*2402, pero sin el gen completo CDH3, como controles. Los clones de CTL que presentaron la mayor actividad de CTL específica contra COS7 fueron los que habían sido transfectados con CDH3 y HLA-A2402 (**Figuras 1f y g**).

Estos resultados demuestran claramente que CDH3-A24-10-807 (SEQ ID N° 30) y CDH3-A24-10-655 (SEQ ID N° 344) se expresan de forma natural en la superficie de la célula blanco con la molécula HLA-A2402 y reconocen CTL. Además, estos péptidos son epitopes peptídicos que pueden servir como vacunas contra el cáncer dirigidas a tumores que expresan CDH3.

Estimulación de células T usando los péptidos predichos de EPHA4 restringidos con HLA-A*2402 o HLA-A*0201, y establecimiento de líneas de CTL estimulados con péptidos derivados de EPHA4

Los CTL de aquellos péptidos derivados de *EphA4* se generaron con un ensayo ELISPOT de IFN-gamma. Se obtuvieron CTL con actividad de CTL específica detectable, determinada con un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, y se los ilustra en la **Figura 2**. En particular, EphA4-A24-9-453 (SEQ ID N° 41), EphA4-A24-9-5 (SEQ ID N° 44), EphA4-A24-9-869 (SEQ ID N° 46), EphA4-A24-9-420 (SEQ ID N° 48), EphA4-A24-10-24 (SEQ ID N° 78), EphA4-A02-9-501 (SEQ ID N° 376) y EphA4-A02-9-165 (SEQ ID N° 379) presentaron una producción potente de IFN-gamma en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, y las células en la cavidad positiva #3, estimuladas con EphA4-A24-9-453 (SEQ ID N° 41), aquellas en la cavidad positiva #2, estimuladas con EphA4-A24-9-5 (SEQ ID N° 44), aquellas en la cavidad positiva #5, estimuladas con EphA4-A24-9-869 (SEQ ID N° 46), aquellas en la cavidad positiva #6, estimuladas con EphA4-A24-9-420 (SEQ ID N° 48), aquellas en la cavidad positiva #4, estimuladas con EphA4-A24-10-24 (SEQ ID N° 78), aquellas en la cavidad positiva #8, estimuladas con EphA4-A02-9-501 (SEQ ID N° 376), y aquellas en la positiva #3, estimuladas con EphA4-A02-9-165 (SEQ ID N° 379), se expandieron, y se establecieron las líneas de CTL. Las líneas de CTL con mayores actividades de CTL específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido, se determinaron con un ELISA. Especialmente, las líneas de CTL estimulados con EphA4-A02-9-501 (SEQ ID N° 376) y EphA4-A02-9-165 (SEQ ID N° 379) se evaluaron con un ensayo de liberación de ⁵¹Cr, de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Los resultados se ilustran en las **Figuras 2a-h**. Por otro lado, otros péptidos indicados en la Tabla 3 no pudieron establecer líneas de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA-A*2402 o HLA-A*0201. Por ejemplo, los péptidos negativos típicos (EphA4-A24-9-384) se indican en la **Figura 2a**. En esta invención, los péptidos que pudieron establecer una línea de CTL se seleccionaron como péptidos estimuladores potentes de CTL.

Estimulación de células T usando los péptidos predichos de ECT2 restringidos con HLA-A*2402, y establecimiento de líneas de CTL estimulados con péptidos derivados de ECT2

Los CTL de aquellos péptidos derivados de *ECT2* se generaron de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Los CTL resultantes, con una actividad de CTL específica detectable, determinada con un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, se ilustran en la **Figura 3**. En particular, ECT2-A24-9-515 (SEQ ID N° 80), ECT2-A24-10-40 (SEQ ID

ff

Nº 100) y ECT2-A24-10-101 (SEQ ID Nº 101) presentaron una producción potente de IFN-gamma, y las células en la cavidad positiva #7, estimuladas con ECT2-A24-9-515 (SEQ ID Nº 80), aquellas en la cavidad positiva #2, estimuladas con ECT2-A24-10-40 (SEQ ID Nº 100), y aquellas en la cavidad positiva #1, estimuladas con ECT2-A24-10-101 (SEQ ID Nº 101), se expandieron, y se establecieron las líneas de CTL. Las líneas de CTL con mayores actividades de CTL específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido, se determinaron con un ELISA. Los resultados se ilustran en las **Figuras 3a-d**. Por otro lado, otros péptidos indicados en la Tabla 4 no pudieron establecer líneas de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA-A*2402. Por ejemplo, los péptidos negativos típicos (ECT2-A24-10-322, ECT2-A24-9-657 y ECT2-A24-10-811) se indican en la **Figura 3a**. En esta invención, los péptidos que pudieron establecer una línea de CTL se seleccionaron como péptidos estimuladores potentes de CTL.

Establecimiento de clones de CTL estimulados con péptidos derivados de ECT2

Además, la dilución limitativa de estas líneas de CTL se realizó de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. El establecimiento de las líneas de clones de CTL de ECT2-A24-10-40 (SEQ ID Nº 100) #2 se ilustra en la **Figura 3c**. Los clones de CTL presentaron actividades de CTL potentes y específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido.

Actividad de CTL específica contra células blanco que expresan ECT2 y HLA-A*2402

Se examinó la capacidad de la línea de CTL establecida contra estos péptidos de reconocer células blanco que expresan ECT2 y HLA-A*2402. La actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas con el gen completo ECT2 y la molécula HLA-A*2402, que sirve como modelo específico para las células blanco que expresan en forma endógena ECT2 y HLA-A*2402, se evaluó usando como células efectoras el clon de CTL desarrolladas por ECT2-A24-10-40 (SEQ ID Nº 100) y la línea de CTL desarrolladas por ECT2-A24-10-101 (SEQ ID Nº 101). Se prepararon COS7 transfectadas con el gen completo ECT2, pero sin HLA-A*2402, y COS7 transfectadas con HLA-A*2402, pero sin el gen completo ECT2 (reemplazado por otro gen, por ejemplo, URLC10 o INHBB), como controles. Las líneas de CTL que presentaron la mayor actividad de CTL específica contra COS7 fueron las que habían sido transfectadas con ECT2 y HLA-A2402 (**Figuras 3c y d**).

Estos resultados demuestran claramente que ECT2-A24-10-40 (SEQ ID Nº 100) y ECT2-A24-10-101 (SEQ ID Nº 101) se expresan de forma natural en la superficie de la célula blanco con la molécula HLA-A2402 y reconocen CTL. Además, estos péptidos son epitopes peptídicos que

pueden servir como vacunas contra el cáncer dirigidas a tumores que expresan ECT2.

Actividad citotóxica contra líneas de células cancerosas que expresan en forma endógena HLA-A*2402 y ECT2

Además, la medición de la actividad citotóxica se realizó con un ensayo de citotoxicidad de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Como resultado, como se ilustra en la **Fig. 3b**, el clon de CTL estimulado con ECT2-A24-9-515 (SEQ ID N° 80) presentó un efecto citotóxico destacablemente alto contra líneas de células cancerosas positivas para TE6 HLA-A24y positivas para ECT, en comparación con el que presentó contra líneas de células cancerosas TE5 negativas para HLA-A24 y positivas para ECT.

Estimulación de células T usando los péptidos predichos de HIG2 restringidos con HLA-A*2402 o HLA-A*0201, y establecimiento de líneas de CTL estimulados con péptidos derivados de HIG2

Los CTL de aquellos péptidos derivados de *HIG2* se generaron de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Los CTL resultantes, con una actividad de CTL específica detectable, determinada con un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, se ilustran en la **Figura 4**. En particular, HIG2-A24-9-19 (SEQ ID N° 110), HIG2-A24-9-22 (SEQ ID N° 111), HIG2-A24-9-8 (SEQ ID N° 387), HIG2-A24-10-7 (SEQ ID N° 112), HIG2-A24-10-18 (SEQ ID N° 394), HIG2-A02-9-8 (SEQ ID N° 114), HIG2-A02-9-15 (SEQ ID N° 116), HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117) y HIG2-A02-10-8 (SEQ ID N° 121) presentaron una producción potente de IFN-gamma en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, y las células en la cavidad positiva #6, estimuladas con HIG2-A24-9-19 (SEQ ID N° 110), aquellas en la cavidad positiva #7, estimuladas con HIG2-A24-9-22 (SEQ ID N° 111), aquellas en la cavidad positiva #5, estimuladas con HIG2-A24-9-8 (SEQ ID N° 387), aquellas en la cavidad positiva #1, estimuladas con HIG2-A24-10-7 (SEQ ID N° 112), aquellas en la cavidad positiva #7, estimuladas con HIG2-A24-10-18 (SEQ ID N° 394), aquellas en la cavidad positiva #10, estimuladas con HIG2-A02-9-8 (SEQ ID N° 114), aquellas en la cavidad positiva #10, estimuladas con HIG2-A02-9-15 (SEQ ID N° 116), aquellas en la cavidad positiva #10, estimuladas con HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117), y aquellas en la cavidad positiva #9, estimuladas con HIG2-A02-10-8 (SEQ ID N° 121), se expandieron, y se establecieron las líneas de CTL. Las líneas de CTL con mayores actividades de CTL específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido, se determinaron con un ELISA. Los resultados se ilustran en las **Figuras 4a-j**. Por otro lado, otros péptidos indicados en la **Tabla 5** no pudieron establecer líneas de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA-A*2402. Por ejemplo, los péptidos negativos típicos (HIG2-A24-9-7) se

indican en la **Figura 4a**. En esta invención, los péptidos que pudieron establecer una línea de CTL se seleccionaron como péptidos estimuladores potentes de CTL.

Establecimiento de clones de CTL estimulados con péptidos derivados de HIG2

Además, la dilución limitativa de estas líneas de CTL se realizó de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. El establecimiento de las líneas de clones de CTL de HIG2-A24-9-22 (SEQ ID N° 111) #7, HIG2-A24-9-8 (SEQ ID N° 387) #5, HIG2-A24-10-7 (SEQ ID N° 112) #1, HIG2-A24-10-18 (SEQ ID N° 394) #7 y HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117) #10 se ilustra en las **Figuras 4c, e, f, g y i**. Los clones de CTL presentaron actividades de CTL potentes y específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido.

Actividad de CTL específica contra células blanco que expresan HIG2 y HLA-A*0201

Se examinó la capacidad de la línea de CTL establecida contra estos péptidos de reconocer células blanco que expresan HIG2 y HLA-A*0201. La actividad de CTL específica contra 293T o COS7 transfectadas con el gen completo HIG2 y la molécula HLA-A*0201, que sirve como modelo específico para las células blanco que expresan en forma endógena HIG2 y HLA-A*0201, se evaluó usando como células efectoras las líneas de CTL desarrolladas por HIG2-A02-9-8 (SEQ ID N° 114), HIG2-A02-9-15 (SEQ ID N° 116), y el clon de CTL desarrollado por HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117). Se prepararon 293T o COS7 transfectadas con el gen completo ECT2, pero sin HLA-A*0201, y 293T o COS7 transfectadas con HLA-A*0201, pero sin el gen completo ECT2 (o reemplazado por otro gen, por ejemplo, FoxP3 o TTK), como controles. Las líneas de CTL que presentaron la mayor actividad de CTL específica contra 293T o COS7 fueron las que habían sido transfectadas con ECT2 y HLA-A*0201 (**Figuras 4e, h y i**).

Estos resultados demuestran claramente que HIG2-A02-9-8 (SEQ ID N° 114), HIG2-A02-9-15 (SEQ ID N° 116) y HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117) se expresan de forma natural en la superficie de la célula blanco con la molécula HLA-A2402 o HLA-A0201, y reconocen CTL. Además, estos péptidos son epitopes peptídicos que pueden servir como vacunas contra el cáncer dirigidas a tumores que expresan HIG2.

Actividad citotóxica contra líneas de células cancerosas que expresan en forma endógena HLA-A*0201 y HIG2

Además, la medición de la actividad citotóxica se realizó con un ensayo de citotoxicidad de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Como resultado, como se ilustra en la **Fig. 4i**, el clon de CTL estimulado con HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117) presentó un efecto citotóxico destacablemente alto contra líneas de células cancerosas **Caki-1**

HIG2-positivas para HLA-A02 y positivas para HIG2, en comparación con el que presentó contra líneas de células cancerosas A498 negativas para HLA-A02 y positivas para HIG2.

Estimulación de células T usando los péptidos predichos de INHBB restringidos con HLA-A*2402 o HLA-A*0201, y establecimiento de líneas de CTL estimulados con péptidos derivados de INHBB

Los CTL de aquellos péptidos derivados de *INHBB* se generaron de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Los CTL resultantes, con una actividad de CTL específica detectable, determinada con un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, se ilustran en la **Figura 5**. En particular, INHBB-A24-9-180 (SEQ ID N° 395), INHBB-A24-10-180 (SEQ ID N° 133), INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135), INHBB-A24-10-7 (SEQ ID N° 137) e INHBB-A24-10-212 (SEQ ID N° 426) presentaron una producción potente de IFN-gamma en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, y las células en la cavidad positiva #7, estimuladas con INHBB-A24-9-180 (SEQ ID N° 395), aquellas en la cavidad positiva #3, estimuladas con INHBB-A24-10-180 (SEQ ID N° 133), aquellas en la cavidad positiva #2, estimuladas con INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135), aquellas en las cavidades positivas #8 y #2, estimuladas con INHBB-A24-10-7 (SEQ ID N° 137), y aquellas en la cavidad positiva #1, estimuladas con INHBB-A24-10-212 (SEQ ID N° 426), se expandieron, y se establecieron las líneas de CTL. Las líneas de CTL con mayores actividades de CTL específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido, se determinaron con un ELISA. Los resultados se ilustran en las **Figuras 5 b-e**. Por otro lado, otros péptidos indicados en la Tabla 6 no pudieron establecer líneas de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA-A*2402 y HLA*0201. Por ejemplo, los péptidos negativos típicos (INHBB-A24-9-238) se indican en la **Figura 5a**. En esta invención, los péptidos que pudieron establecer una línea de CTL se seleccionaron como péptidos estimuladores potentes de CTL.

Establecimiento de clones de CTL estimulados con péptidos derivados de INHBB

Además, la dilución limitativa de estas líneas de CTL se realizó de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. El establecimiento de las líneas de clones de CTL de INHBB-A24-9-180 (SEQ ID N° 395) #7 e INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135) #2 se ilustra en las **Figuras 5b y d**. Los clones de CTL presentaron actividades de CTL potentes y específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido.

Actividad de CTL específica contra células blanco que expresan INHBB y HLA-A*2402

Se examinó la capacidad de la línea de CTL establecida contra estos péptidos de

reconocer células blanco que expresan INHBB y HLA-A*2402. La actividad de CTL específica contra 293T transfectadas con el gen completo INHBB y la molécula HLA-A*2402, que sirve como modelo específico para las células blanco que expresan en forma endógena INHBB y HLA-A*2402, se evaluó usando como células efectoras las líneas de CTL desarrolladas por INHBB-A24-10-180 (SEQ ID N° 133) e INHBB-A24-10-7 (SEQ ID N° 137), y el clon de CTL desarrollado por INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135). Se prepararon 293T transfectadas con el gen completo INHBB, pero sin HLA-A*2402, y 293T transfectadas con HLA-A*2402, pero sin el gen completo INHBB, como controles. Las líneas de CTL que presentaron la mayor actividad de CTL específica contra 293T fueron las que habían sido transfectadas con INHBB y HLA-A*2402 (**Figuras 5c, d y e**).

Estos resultados demuestran claramente que INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135), INHBB-A24-10-180 (SEQ ID N° 133) e INHBB-A24-10-7 (SEQ ID N° 137) se expresan de forma natural en la superficie de la célula blanco con la molécula HLA-A2402 y reconocen CTL. Además, estos péptidos son epitopes peptídicos que pueden servir como vacunas contra el cáncer dirigidas a tumores que expresan INHBB.

Actividad citotóxica contra líneas de células cancerosas que expresan en forma endógena HLA-A*2402 e INHBB

Además, la medición de la actividad citotóxica se realizó con un ensayo de citotoxicidad de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Como resultado, como se ilustra en la **Fig. 5b**, el clon de CTL estimulado con INHBB-A24-9-180 (SEQ ID N° 395) presentó un efecto citotóxico destacablemente alto contra líneas de células cancerosas MIA-Paca2 positivas para HLA-A24 y positivas para INHBB, en comparación con el que presentó contra líneas de células cancerosas CAki-2 negativas para HLA-A24 y positivas para INHBB.

Estimulación de células T usando los péptidos predichos de KIF20A restringidos con HLA-A*2402, y establecimiento de líneas de CTL estimulados con péptidos derivados de KIF20A

Los CTL de aquellos péptidos derivados de *KIF20A* se generaron de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Los CTL resultantes, con una actividad de CTL específica detectable, determinada con un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, se ilustran en la **Figura 6**. En particular, KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID N° 174), KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID N° 178), KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186) y KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194) presentaron una producción potente de IFN-gamma en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, y las células en la cavidad positiva #2, estimuladas con KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID N° 174), aquellas en la cavidad positiva #3, estimuladas con KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID N° 178), aquellas en la cavidad positiva #5, estimuladas con KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186), y aquellas en la cavidad

positiva #6, estimuladas con KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194), se expandieron, y se establecieron las líneas de CTL. Las líneas de CTL con mayores actividades de CTL específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido, se determinaron con un ELISA. Los resultados se ilustran en las **Figuras 6a-e**. Por otro lado, otros péptidos indicados en la Tabla 7 no pudieron establecer líneas de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA-A*2402. Por ejemplo, los péptidos negativos típicos (KIF20A -A24-9-647 y KIF20A -A24-10-182) se indican en la **Figura 6a**. En esta invención, los péptidos que pudieron establecer una línea de CTL se seleccionaron como péptidos estimuladores potentes de CTL.

Establecimiento de clones de CTL estimulados con péptidos derivados de KIF20A

Además, la dilución limitativa de estas líneas de CTL se realizó de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. El establecimiento de las líneas de clones de CTL de KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID N° 174) #2, KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186) #5 y KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194) #6 se ilustra en las **Figuras 6b, d y e**. Los clones de CTL presentaron actividades de CTL potentes y específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido.

Actividad de CTL específica contra células blanco que expresan KIF20A y HLA-A*2402

Se examinó la capacidad de la línea de CTL establecida contra estos péptidos de reconocer células blanco que expresan KIF20A y HLA-A*2402. La actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas con el gen completo KIF20A y las moléculas HLA-A*2402 y A24-LCL, transfectadas por electropólación con el gen completo KIF20A, que sirve como modelo específico para las células blanco que expresan en forma endógena KIF20A y HLA-A*2402, se evaluó usando como células efectoras las líneas de CTL desarrolladas por KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID N° 178) y KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186), y el clon de CTL desarrollado por KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194). Se prepararon COS7 transfectadas con el gen completo KIF20A, pero sin HLA-A*2402, y COS7 transfectadas con HLA-A*2402, pero sin el gen completo KIF20A (o reemplazado por el gen completo URLC10), COS7 transfectadas con HLA-A*2402 y tratadas con pulsos de KIF20A-10-308, y A24-LCL transfectadas con un vector señuelo, como controles. Las líneas de CTL que presentaron la mayor actividad de CTL específica contra COS7 fueron las que habían sido transfectadas con KIF20A y HLA-A*2402 (**Figuras 6b, c y d**). Como alternativa, la línea de CTL estimulada con KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186) presentó actividad contra A24-LCL transfectada con KIF20A.

Estos resultados demuestran claramente que KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID N° 178),

KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186) y KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194) se expresan de forma natural en la superficie de la célula blanco con la molécula HLA-A2402 y reconocen CTL. Además, estos péptidos son epitopes peptídicos que pueden servir como vacunas contra el cáncer dirigidas a tumores que expresan KIF20A.

Actividad citotóxica contra líneas de células cancerosas que expresan en forma endógena HLA-A*2402 y KIF20A

Además, la medición de la actividad citotóxica se realizó con un ensayo de citotoxicidad de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Como resultado, como se ilustra en las **Fig. 6b y e**, el clon de CTL estimulado con KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID N° 174) o KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186) presentó un efecto citotóxico destacablemente alto contra líneas de células cancerosas PK45P o MIAPaca2 positivas para HLA-A24 y positivas para KIF20A, respectivamente, en comparación con el que presentó contra líneas de células cancerosas PK59 negativas para HLA-A24 y positivas para KIF20A.

Estimulación de células T usando los péptidos predichos de KNTC2 restringidos con HLA-A*2402, y establecimiento de líneas de CTL estimulados con péptidos derivados de KNTC2

Los CTL de aquellos péptidos derivados de *KNTC2* se generaron de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Los CTL resultantes, con una actividad de CTL específica detectable, determinada con un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, se ilustran en la **Figura 7**. En particular, KNTC2-A24-9-309 (SEQ ID N° 196), KNTC2-A24-9-124 (SEQ ID N° 202), KNTC2-A24-9-154 (SEQ ID N° 210), KNTC2-A24-9-150 (SEQ ID N° 213), KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214), KNTC2-A24-10-227 (SEQ ID N° 217) y KNTC2-A24-10-273 (SEQ ID N° 223) presentaron una producción potente de IFN-gamma en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, y las células en la cavidad positiva #8 estimuladas con KNTC2-A24-9-309 (SEQ ID N° 196), aquellas en la cavidad positiva #5, estimuladas con KNTC2-A24-9-124 (SEQ ID N° 202), aquellas en la cavidad positiva #5, estimuladas con KNTC2-A24-9-154 (SEQ ID N° 210), aquellas en la cavidad positiva #7, estimuladas con KNTC2-A24-9-150 (SEQ ID N° 213), aquellas en las cavidades positivas #4 y #5, estimuladas con KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214), aquellas en la cavidad positiva #1, estimuladas con KNTC2-A24-10-227 (SEQ ID N° 217), y aquellas en la cavidad positiva #8, estimuladas con KNTC2-A24-10-273 (SEQ ID N° 223), se expandieron, y se establecieron las líneas de CTL. Las líneas de CTL con mayores actividades de CTL específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido, se determinaron con un ELISA. Los resultados se ilustran en las **Figuras 7a-h**. Por otro lado, otros péptidos indicados en la Tabla 8 no pudieron establecer líneas

de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA-A*2402. Por ejemplo, los péptidos negativos típicos (KNTC2-A24-10-610) se indican en la **Figura 7a**. In esta invención, los péptidos que pudieron establecer una línea de CTL se seleccionaron como péptidos estimuladores potentes de CTL.

Establecimiento de clones de CTL estimulados con péptidos derivados de KNTC2

Además, la dilución limitativa de estas líneas de CTL se realizó de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. El establecimiento de las líneas de clones de CTL de KNTC2-A24-9-154 (SEQ ID N° 210) #5 y KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214) #5 se ilustra en las **Figuras 7d y f**. Los clones de CTL presentaron actividades de CTL potentes y específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido.

Actividad de CTL específica contra células blanco que expresan KNTC2 y HLA-A*2402

Se examinó la capacidad de la línea de CTL establecida contra estos péptidos de reconocer células blanco que expresan KNTC2 y HLA-A*2402. La actividad de CTL específica contra HEK293 transfectadas con el gen completo KNTC2 y la molécula HLA-A*2402, que sirve como modelo específico para las células blanco que expresan en forma endógena KNTC2 y HLA-A*2402, se evaluó usando como células efectoras los clones de CTL desarrolladas por KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214). Se prepararon HEK293 transfectadas con el gen completo KNTC2, pero sin HLA-A*2402, HEK293 transfectadas con HLA-A*2402, pero sin el gen completo KNTC2, y HEK293 transfectadas con HLA-A*2402 y tratadas con pulsos de KNTC2-9-309, como controles. Las líneas de CTL que presentaron la mayor actividad de CTL específica contra HEK293 fueron las que habían sido transfectadas con KNTC2 y HLA-A*2402 (**Figura 7f**).

Estos resultados demuestran claramente que KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214) se expresa de forma natural en la superficie de la célula blanco con la molécula HLA-A2402 y reconoce CTL. Además, este péptido es un epítopo peptídico que puede servir como una vacuna contra el cáncer dirigida a tumores que expresan KNTC2.

Estimulación de células T usando los péptidos predichos de TTK restringidos con HLA-A*0201, y establecimiento de líneas de CTL estimulados con péptidos derivados de TTK

Los CTL de aquellos péptidos derivados de *TTK* se generaron de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Los CTL resultantes, con una actividad de CTL específica detectable, determinada con un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, se ilustran en la **Figura 8**. Como se ilustra en las **Figuras 8b-d**, TTK-A2-9-462 (SEQ ID N° 227), TTK-A2-9-547 (SEQ ID N° 228), TTK-A2-9-719 (SEQ ID N° 233) y TTK-A2-10-462 (SEQ ID N° 254)

presentaron una producción potente de IFN-gamma en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, y las células en la cavidad positiva #4, estimuladas con TTK-A2-9-462 (SEQ ID N° 227), aquellas en la cavidad positiva #2, estimuladas con TTK-A2-9-547 (SEQ ID N° 228), aquellas en la cavidad positiva #1, estimuladas con TTK-A2-9-719 (SEQ ID N° 233), y aquellas en la cavidad positiva #8, estimuladas con TTK-A2-10-462 (SEQ ID N° 254), se expandieron. Las líneas de CTL con mayores actividades de CTL específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido, se determinaron con un ELISA. Por otro lado, otros péptidos indicados en la Tabla 9 no pudieron establecer líneas de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA-A*0201. Por ejemplo, los péptidos negativos típicos (TTK-A2-9-278) se indican en la **Figura 8a**. En esta invención, los péptidos que pudieron establecer una línea de CTL se seleccionaron como péptidos estimuladores potentes de CTL.

Establecimiento de clones de CTL estimulados con péptidos derivados de TTK

Además, la dilución limitativa de estas líneas de CTL se realizó de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. El establecimiento de las líneas de clones de CTL de TTK-A2-9-462 (SEQ ID N° 227) #4, TTK-A2-9-547 (SEQ ID N° 228) #2, TTK-A2-9-719 (SEQ ID N° 233) #1 y TTK-A2-10-462 (SEQ ID N° 254) #8 se indican en las **Figuras 8d, c, d y e**. Los clones de CTL presentaron actividades de CTL potentes y específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido.

Actividad de CTL específica contra células blanco que expresan TTK y HLA-A*0201

Se examinó la capacidad del clon de CTL establecido contra estos péptidos de reconocer las células blanco que expresan en forma endógena *TTK* y HLA-A*0201. La actividad de CTL específica contra COS7 transfectadas con el gen *TTL* completo y la molécula HLA-A*0201, que es un modelo específico para las células blanco que expresan en forma endógena *TTK* y HLA-A*0201, se evaluó usando como células efectoras los clones de CTL desarrolladas por TTK-A2-9-462 (SEQ ID N° 227), TTK-A02-9-547 (SEQ ID N° 228), TTK-A2-9-719 (SEQ ID N° 233) y TTK-A2-10-462 (SEQ ID N° 254). Se prepararon COS7 transfectadas con el gen completo *TTK*, pero sin HLA-A*0201, COS7 transfectadas HLA-A*0201, pero sin la totalidad de *TTK* (o reemplazado por el gen completo *HIG2*), y COS7 transfectadas con HLA-A*0201 y tratadas con pulsos de distintos epitopes peptídicos blanco, como controles. El clon de CTL con la mayor actividad de CTL específica contra COS7 fue el que había sido transfectado con *TTK* y HLA-A*0201 (**Figuras 8b, c, d y e**).

Estos resultados demuestran claramente que TTK-A2-9-462 (SEQ ID N° 227), TTK-A02-

9-547 (SEQ ID N° 228), TTK-A2-9-719 (SEQ ID N° 233) y TTK-A02-10-462 (SEQ ID N° 254) se expresan de forma natural en la superficie de la célula blanco con la molécula HLA-A2 y reconocen CTL. Además, estos péptidos son epitopes peptídicos que pueden servir como vacunas contra el cáncer dirigidas a tumores que expresan *TTK*.

Estimulación de células T usando los péptidos predichos de URLC10 restringidos con HLA-A*0201, y establecimiento de líneas de CTL estimulados con péptidos derivados de URLC10

Los CTL de aquellos péptidos derivados de *URLC10* se generaron de acuerdo con los protocolos detallados en la sección de materiales y métodos anterior. Los CTL resultantes, con una actividad de CTL específica detectable, determinada con un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, se ilustran en la **Figura 9**. Como ilustra en las **Figuras 9b-d**, URLC-A2-9-206 (SEQ ID N° 271), URLC-A2-9-212 (SEQ ID N° 272) y URLC-A2-10-211 (SEQ ID N° 288) presentaron una producción potente de IFN-gamma en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, y las células en la cavidad positiva #7, estimuladas con URLC-A2-9-206 (SEQ ID N° 271), aquellas en la cavidad positiva #3, estimuladas con URLC-A2-9-212 (SEQ ID N° 272), aquellas en la cavidad positiva #5, estimuladas con URLC-A2-10-211 (SEQ ID N° 288), se expandieron. Las líneas de CTL con mayores actividades de CTL específicas contra el blanco tratado con pulsos de péptido, en comparación con las actividades contra el blanco no tratado con pulsos de péptido, se determinaron con un ELISA. Por otro lado, otros péptidos indicados en la Tabla 10 no pudieron establecer líneas de CTL, a pesar de una actividad de unión posible con HLA-A*0201. Por ejemplo, los péptidos negativos típicos (URLC-A2-9-58) se indican en la **Figura 9a**. En esta invención, los péptidos que pudieron establecer una línea de CTL se seleccionaron como péptidos estimuladores potentes de CTL.

Actividad de CTL específica contra células blanco que expresan URLC10 y HLA-A*0201

Se examinó la capacidad de la línea de CTL establecida contra estos péptidos de reconocer células blanco que expresan en forma endógena *URLC10* y HLA-A*0201. La actividad de CTL específica contra COS7, Hek293 y 293T transfectadas con el gen completo *URLC10* y la molécula HLA-A*0201, que sirve como modelo específico para las células blanco que expresan en forma endógena *URLC10* y HLA-A*0201, se evaluó usando como células efectoras la línea de CTL desarrolladas por URLC10-A02-10-211. Se prepararon COS7, Hek293 o 293T transfectadas con el gen completo *URLC10*, pero sin HLA-A*0201 (reemplazado por HLA-A*2402), COS7, Hek293 o 293T transfectadas con HLA-A*0201, pero sin el gen completo *URLC10*, y COS7 transfectadas con HLA-A*0201 y tratadas con pulsos de distintos epitopes peptídicos blanco (URLC10-A02-10-64), como controles. Las líneas de CTL que presentaron la mayor actividad de CTL específica contra COS7, Hek293 o 293T fueron las que habían sido transfectadas con *URLC10* y HLA-A*0201

(Figura 9-2).

Estos resultados demuestran claramente que URLC10-A02-10-211 se expresa de forma natural en la superficie de la célula blanco con la molécula HLA-A*0201 y reconoce CTL. Además, este péptido es un epítopo peptídico que puede utilizarse como una vacuna contra el cáncer dirigida a tumores que expresan *URLC10*.

Análisis de homología de los péptidos antigénicos

Los clones de CTL establecidos contra los siguientes péptidos presentaron una actividad de CTL específica potente.

CDH3-A24-9-513 (SEQ ID N° 19),
 CDH3-A24-9-406 (SEQ ID N° 22),
 CDH3-A24-10-807 (SEQ ID N° 30),
 CDH3-A24-10-332 (SEQ ID N° 34),
 CDH3-A24-10-655 (SEQ ID N° 344),
 CDH3-A24-10-470 (SEQ ID N° 358),
 EphA4-A24-9-453 (SEQ ID N° 41),
 EphA4-A24-9-5 (SEQ ID N° 44),
 EphA4-A24-9-869 (SEQ ID N° 46),
 EphA4-A24-9-420 (SEQ ID N° 48),
 EphA4-A24-10-24 (SEQ ID N° 78),
 EphA4-A02-9-501 (SEQ ID N° 376),
 EphA4-A02-9-165 (SEQ ID N° 379),
 ECT2-A24-9-515 (SEQ ID N° 80),
 ECT2-A24-10-40 (SEQ ID N° 100),
 ECT2-A24-10-101 (SEQ ID N° 101),
 HIG2-A24-9-19 (SEQ ID N° 110),
 HIG2-A24-9-22 (SEQ ID N° 111),
 HIG2-A24-9-8 (SEQ ID N° 387),
 HIG2-A24-10-7 (SEQ ID N° 112),
 HIG2-A24-10-18 (SEQ ID N° 394),
 HIG2-A02-9-8 (SEQ ID N° 114),
 HIG2-A02-9-15 (SEQ ID N° 116),
 HIG2-A02-9-4 (SEQ ID N° 117),
 HIG2-A02-10-8 (SEQ ID N° 121),

INHBB-A24-9-180 (SEQ ID N° 395),
 INHBB-A24-10-180 (SEQ ID N° 133),
 INHBB-A24-10-305 (SEQ ID N° 135),
 INHBB-A24-10-7 (SEQ ID N° 137),
 INHBB-A24-10-212 (SEQ ID N° 426),
 KIF20A-A24-9-305 (SEQ ID N° 174),
 KIF20A-A24-9-383 (SEQ ID N° 178),
 KIF20A-A24-10-304 (SEQ ID N° 186),
 KIF20A-A24-10-66 (SEQ ID N° 194),
 KNTC2-A24-9-309 (SEQ ID N° 196),
 KNTC2-A24-9-124 (SEQ ID N° 202),
 KNTC2-A24-9-154 (SEQ ID N° 210),
 KNTC2-A24-9-150 (SEQ ID N° 213),
 KNTC2-A24-10-452 (SEQ ID N° 214),
 KNTC2-A24-10-227 (SEQ ID N° 217),
 KNTC2-A24-10-273 (SEQ ID N° 223),
 TTK-A02-9-462 (SEQ ID N° 227),
 TTK-A02-9-547 (SEQ ID N° 228),
 TTK-A02-9-719 (SEQ ID N° 233),
 TTK-A02-10-462 (SEQ ID N° 254),
 URLC-A02-9-206 (SEQ ID N° 271),
 URLC-A02-9-212 (SEQ ID N° 272) y
 URLC-A02-10-211 (SEQ ID N° 288).

Esto sugiere que las secuencias de SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 376, 379, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 114, 116, 117, 121, 395, 133, 135, 137, 426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217, 223, 227, 228, 233, 254, 271, 272 ó 288 son homólogas a los péptidos derivados de otras moléculas, de las que se sabe que sensibilizan el sistema inmune humano.

Para excluir esta posibilidad, se realizó un análisis de homología con las secuencias de los péptidos como búsquedas usando el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). No se halló una homología de secuencia significativa. Estos resultados sugieren que las secuencias de SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 376, 379, 80, 100, 101, 110, 111, 387, 112, 394, 114, 116, 117, 121, 395, 133, 135, 137,

426, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217, 223, 227, 228, 233, 254, 271, 272 ó 288 son únicas, y por lo tanto poseen un bajo riesgo de producir una respuesta inmunológica contra cualquier molécula no relacionada.

Discusión

La identificación de nuevos TAA, particularmente aquellos que inducen respuestas antitumorales potente y específicas, garantiza la continuación del desarrollo de la aplicación clínica de la estrategia de vacunación con péptidos en diversos tipos de cáncer (Boon T. *et al.*, (1996) *J Exp Med* 183: 725-9; van der Bruggen P *et al.*, (1991) *Science* 254: 1643-7; Brichard V *et al.*, (1993) *J Exp Med* 178: 489-95; Kawakami Y *et al.*, (1994) *J Exp Med* 180: 347-52; Shichijo S *et al.*, (1998) *J Exp Med* 187:277-88; Chen YT *et al.*, (1997) *Proc.Natl.Acd. Sci. USA*, 94: 1914-8; Harris CC., (1996) *J Natl Cancer Inst* 88:1442-5; Butterfield LH *et al.*, (1999) *Cancer Res* 59:3134-42; Vissers JL *et al.*, (1999) *Cancer Res* 59: 5554-9; van der Burg SH *et al.*, (1996) *J. Immunol* 156:3308-14; Tanaka F *et al.*, (1997) *Cancer Res* 57:4465-8; Fujie T *et al.*, (1999) *Int J Cancer* 80:169-72; Kikuchi M *et al.*, (1999) *Int J Cancer* 81 : 459-66; Oiso M *et al.*, (1999) *Int J Cancer* 81:387-94).

Las tecnologías de microseries de ADNc pueden describir perfiles de expresión genética comprehensivos de células malignas (Lin YM, *et al.*, *Oncogene*. 2002 Jun 13; 21:4120-8; Kitahara O, *et al.*, *Cancer Res*. 1º de Mayo de 2001; 61:3544-9; Suzuki C, *et al.*, *Cancer Res*. 1º de Noviembre de 2003; 63:7038-41; Ashida S, *Cancer Res*. 1º de Septiembre de 2004; 64:5963-72; Ochi K, *et al.*, *Int J Oncol*. Marzo de 2004; 24(3):647-55; Kaneta Y, *et al.*, *Int J Oncol*. Septiembre de 2003; 23:681-91; Obama K, *Hepatology*. Junio de 2005; 41:1339-48; Kato T, *et al.*, *Cancer Res*. 1º de Julio de 2005; 65:5638-46; Kitahara O, *et al.*, *Neoplasia*. Julio-Agosto de 2002; 4:295-303; Saito-Hisaminato A *et al.*, *DNA Res* 2002, 9: 35-45), y pueden usarse en la identificación de TAA potenciales. Entre los transcriptos que están regulados positivamente en diversos cánceres, con estas tecnologías se identificaron nuevos genes humanos, denominados *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y *URLC10*.

Como se demostró con anterioridad, *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y *URLC10* se sobreexpresan en diversos cánceres, pero presentan una expresión mínima en tejidos normales. Además, se ha demostrado que estos genes tiene una función significativa relacionada con la proliferación celular. Por consiguiente, los péptidos derivados de *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y *URLC10* pueden servir como epitopes TAA, los que, a su vez, pueden usarse para inducir respuestas inmunes significativas y específicas contra células cancerosas.

Por ende, como *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y *URLC10* son nuevos TAA, las vacunas donde se usan estos epitopes peptídicos pueden usarse como inmunoterapias contra diversos carcinomas, u otras enfermedades que expresan estas moléculas.

Aplicación industrial

En la presente invención se identifican nuevos TAA, particularmente aquellos que inducen respuestas inmunes antitumorales potentes y específicas. Estos TAA garantizan la continuación del desarrollo de vacunas peptídicas contra enfermedades asociadas con la sobreexpresión de *CDH3*, *EPHA4*, *ECT2*, *HIG2*, *INHBB*, *KIF20A*, *KNTC2*, *TTK* y/o *URLC10*, por ejemplo, cánceres.

Todas las patentes, las solicitudes de patentes y las publicaciones citadas en la presente documentación se incorporan a modo de referencia.

Si bien la invención ha sido descrita en detalle y con referencia a realizaciones específicas, ha de comprenderse que la descripción precedente se presenta a modo de ejemplo y tiene una naturaleza explicativa, y solamente pretende ilustrar la invención y sus realizaciones preferidas. Empleando experimentación de rutina, aquél entrenado en la técnica reconocerá con facilidad que es posible realizar diversos cambios y modificaciones en la presente documentación, sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención. Por lo tanto, la invención no está definida por la descripción anterior, sino por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido sintetizado de menos de aproximadamente 15 aminoácidos **CARACTERIZADO PORQUE** se selecciona del grupo que consiste en péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 80, 100, 101, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217 ó 223.
2. Un péptido que tiene la capacidad de inducir células T citotóxicas, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 80, 100, 101, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217 ó 223, donde 1, 2 o varios aminoácidos han sido sustituidos, suprimidos o agregados.
3. El péptido sintetizado de la reivindicación 2, **CARACTERIZADO PORQUE** el segundo aminoácido desde el extremo N es fenilalanina, tirosina, metionina o triptofano.
4. El péptido sintetizado de la reivindicación 2 ó 3, **CARACTERIZADO PORQUE** el aminoácido C-terminal es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano o metionina.
5. Un péptido sintetizado sintetizado de menos de aproximadamente 15 aminoácidos **CARACTERIZADO PORQUE** se selecciona del grupo que consiste en péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 376, 379.
6. Un péptido sintetizado que tiene la capacidad de inducir células T citotóxicas, **CARACTERIZADO PORQUE** dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° SEQ ID N° 376 ó 379, donde 1, 2 o varios aminoácidos han sido sustituidos, suprimidos o agregados.
7. El péptido sintetizado de la reivindicación 6, **CARACTERIZADO PORQUE** el segundo aminoácido desde el extremo N es leucina o metionina.
8. El péptido sintetizado de la reivindicación 6 o 7, **CARACTERIZADO PORQUE** el

aminoácido C-terminal es valina o leucina.

9. Una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la sobreexpresión de los genes de SEQ ID N° 1, 3, 5, 11 y/o 13, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición comprende uno o más péptidos de las reivindicaciones 1 a 8, o un polinucleótido que codifica los péptidos.
10. Una composición farmacéutica de la reivindicación 9, CARACTERIZADA PORQUE la enfermedad asociada con los genes de SEQ ID N° 1, 3, 5, 11 y/o 13 incluye cánceres.
11. Una composición farmacéutica de la reivindicación 10, CARACTERIZADA PORQUE los cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular.
12. Un exosoma CARACTERIZADO PORQUE presenta en su superficie un complejo que comprende un péptido de las reivindicaciones 1-4 y un antígeno HLA.
13. El exosoma de la reivindicación 12, CARACTERIZADO PORQUE el antígeno HLA es HLA-A24.
14. El exosoma de la reivindicación 13, CARACTERIZADO PORQUE el antígeno HLA es HLA-A2402.
15. Un exosoma CARACTERIZADO PORQUE presenta en su superficie un complejo que comprende un péptido de las reivindicaciones 5-8 y un antígeno HLA.
16. El exosoma de la reivindicación 15, CARACTERIZADO PORQUE el antígeno HLA es HLA-A2.
17. El exosoma de la reivindicación 16, CARACTERIZADO PORQUE el antígeno HLA es HLA-A0201.
18. Un método in-vitro para inducir células presentadoras de antígenos que tienen

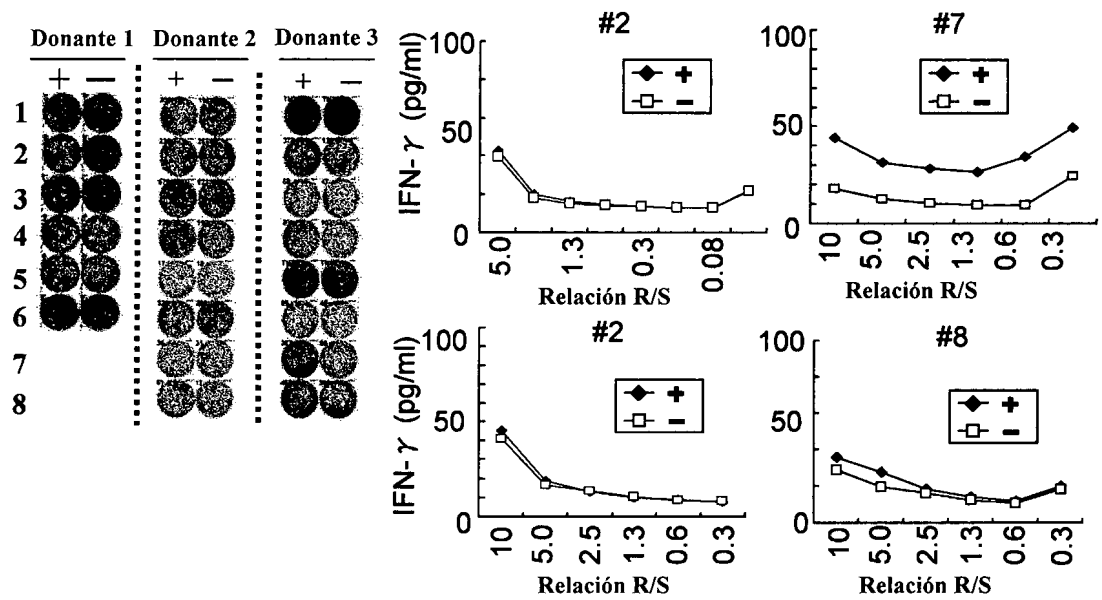
una capacidad elevada de inducir células T citotóxicas, CARACTERIZADO PORQUE comprende el paso de poner en contacto una célula presentadora de antígenos con un péptido de la reivindicación 1-8.

19. Un método in-vitro para inducir células T citotóxicas CARACTERIZADO PORQUE comprende poner en contacto una célula T con un péptido de la reivindicación 1-8.
20. Un método in-vitro para inducir células presentadoras de antígenos que tienen una capacidad elevada de inducir células T citotóxicas, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende el paso de transferir un gen que comprende un polinucleótido que codifica un péptido de las reivindicaciones 1 a 8 a una célula presentadora de antígenos.
21. Una célula T citotóxica CARACTERIZADA PORQUE es inducida mediante el contacto de una célula T con un péptido de las reivindicaciones 1-8, o que se transduce con los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de subunidades de TCR que se unen a un péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el contexto de HLA-A24 o HLA-A2.
22. Una célula presentadora de antígenos CARACTERIZADA PORQUE comprende un complejo formado entre un antígeno HLA y un péptido de las reivindicaciones 1 a 8.
23. Una célula presentadora de antígenos CARACTERIZADA PORQUE ha sido inducida con el método de las reivindicaciones 18-20.
24. Una vacuna para inhibir la proliferación de las células que expresan los genes de SEQ ID No: 1, 3, 5, 11 y/o 13, CARACTERIZADA PORQUE la vacuna comprende un péptido de la reivindicación 1-8 como ingrediente activo.
25. La vacuna de la reivindicación 24, CARACTERIZADA PORQUE las células que expresan los genes de SEQ ID No: 1, 3, 5, 11 y/o 13 incluyen cánceres.
26. La vacuna de la reivindicación 25, CARACTERIZADA PORQUE los cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colangiocelular, CML, cáncer colorrectal, endometriosis, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gástrico de tipo difuso, cáncer de hígado, NSCLC, linfoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de

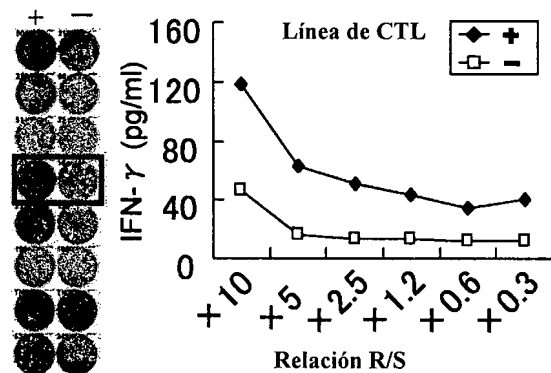
próstata, carcinoma renal, SCLC, tumores de tejidos blandos y tumor testicular.

27. La vacuna de la reivindicación 26, CARACTERIZADA PORQUE ha sido formulada para la administración a un sujeto cuyo antígeno HLA es HLA-A24 o HLA-A2.
28. Un método para buscar un péptido en el que se han sustituido 1, 2 o varios aminoácidos, CARACTERIZADO PORQUE dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° SEQ ID N° 19, 22, 30, 34, 344, 358, 41, 44, 46, 48, 78, 80, 100, 101, 174, 178, 186, 194, 196, 202, 210, 213, 214, 217 ó 223, donde dicho método comprende los pasos de:
- (a) conformar una homología de secuencia no significativa con la secuencia completa con 1, 2 o varios aminoácidos sustituidos;
 - (b) medir la capacidad de inducción de CTL del péptido sustituido candidato; y
 - (c) seleccionar el péptido cuya capacidad de inducción de CTL es igual o mayor que la del pépt

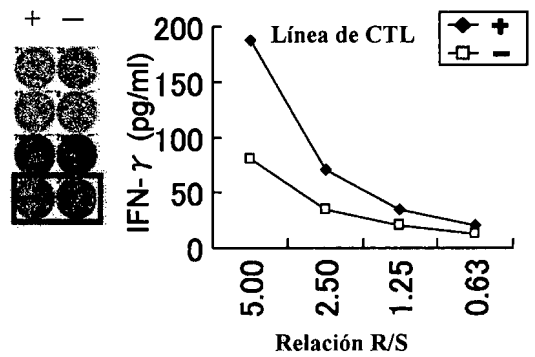
a CDH3-A24-10-248



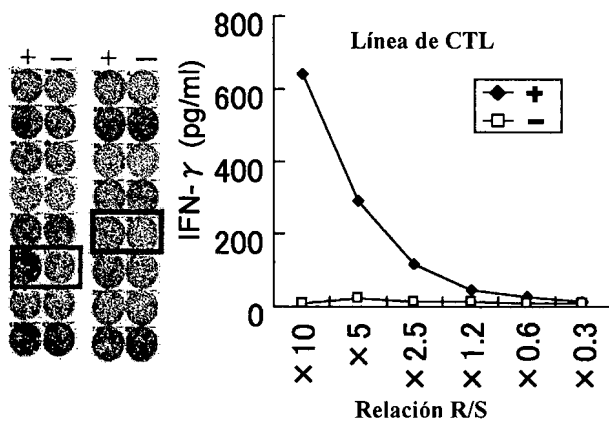
b CDH3-A24-10-332



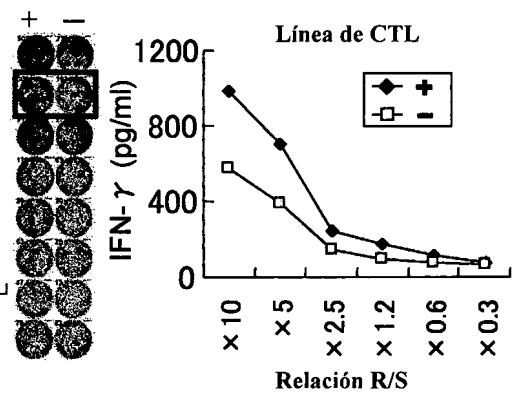
c CDH3-A24-10-470



d CDH3-A24-9-513

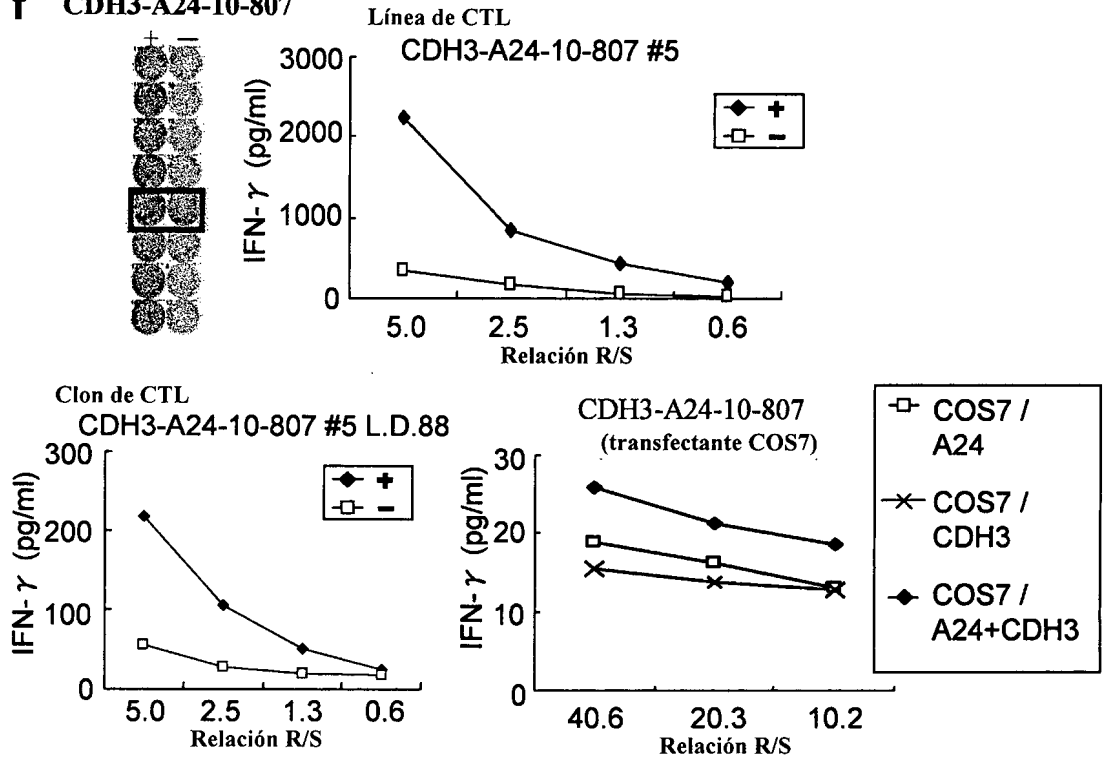
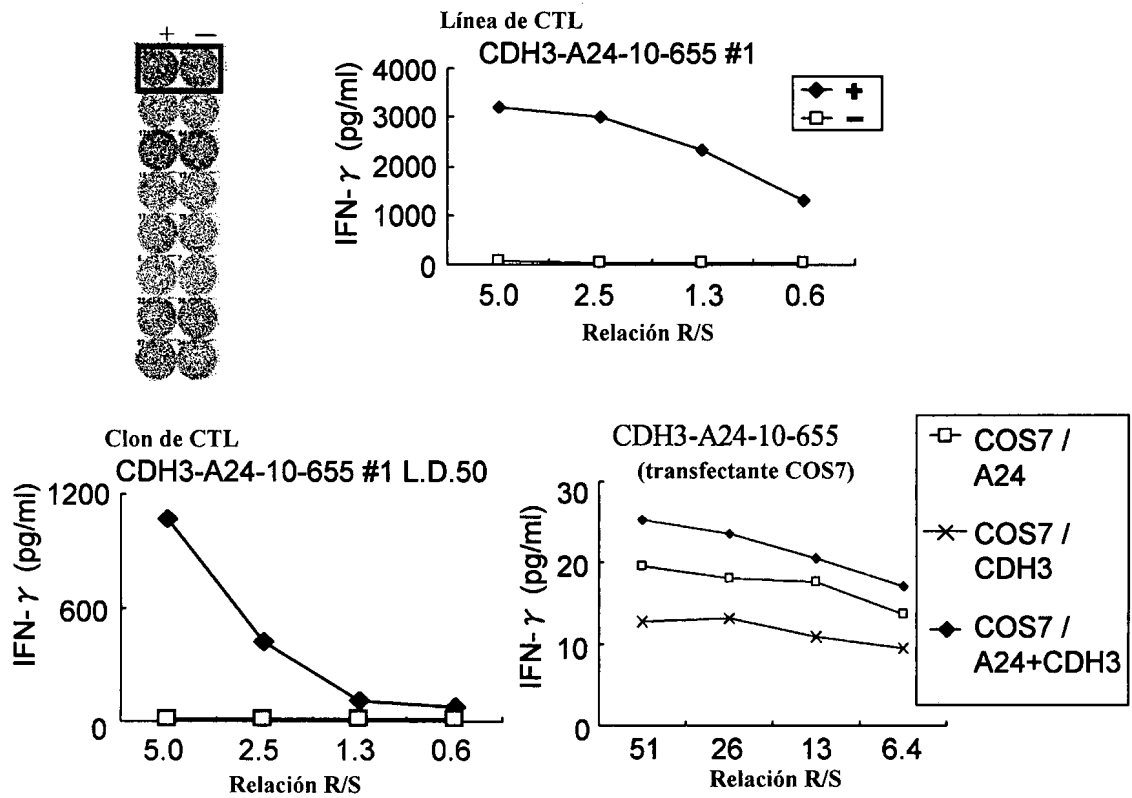


e CDH3-A24-9-406



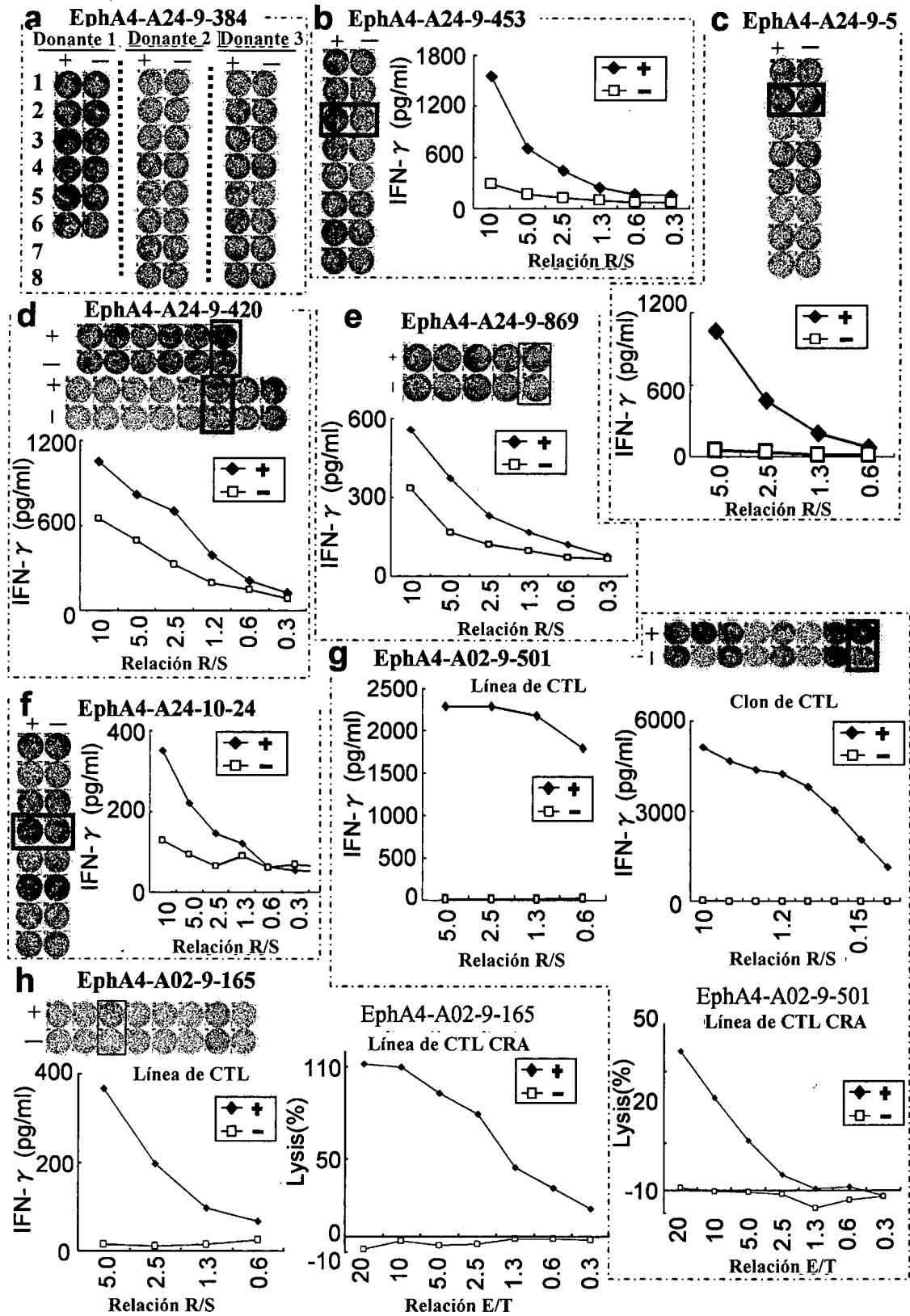
[Fig.

1-2]

f CDH3-A24-10-807**g** CDH3-A24-10-655

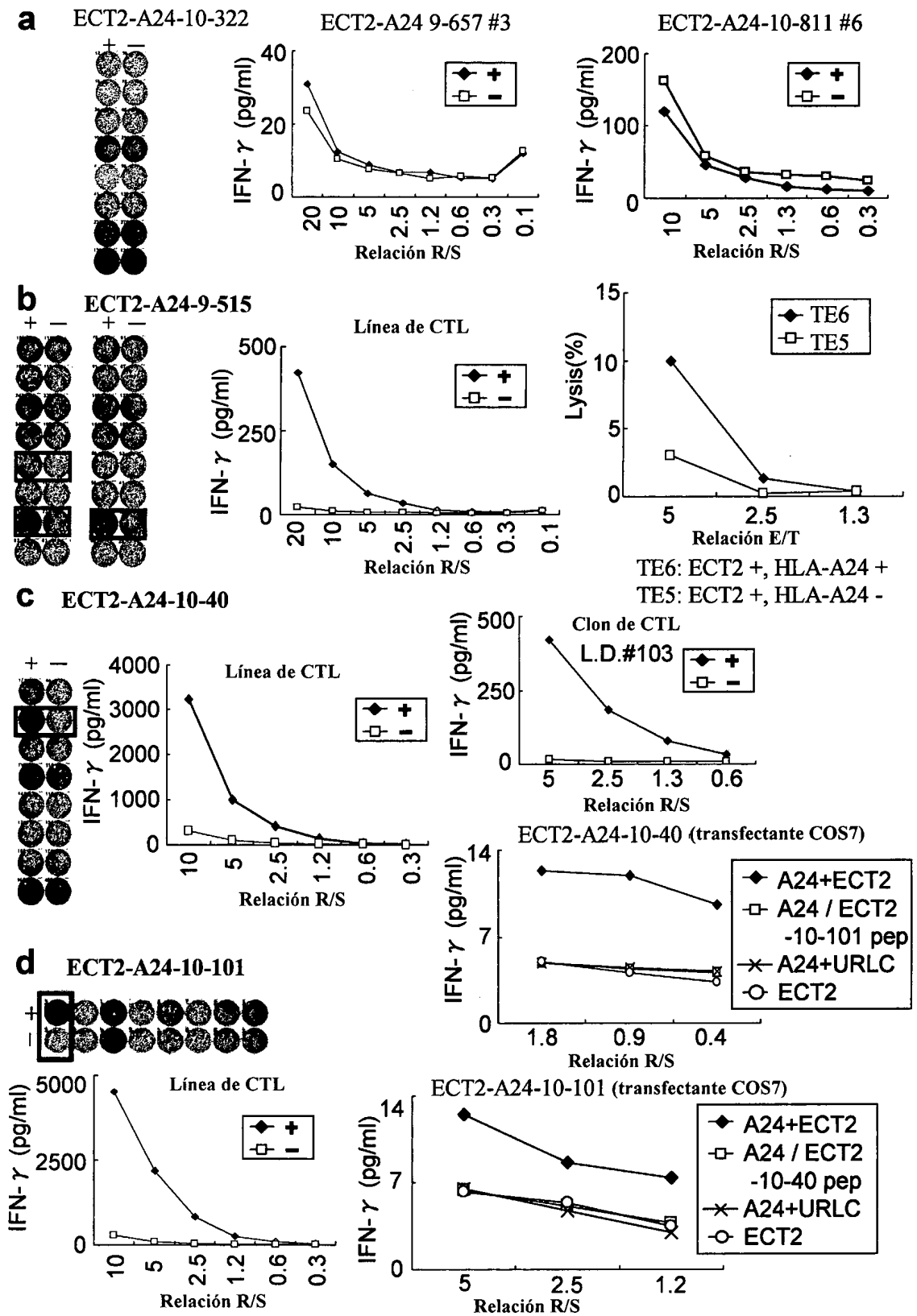
[Fig.

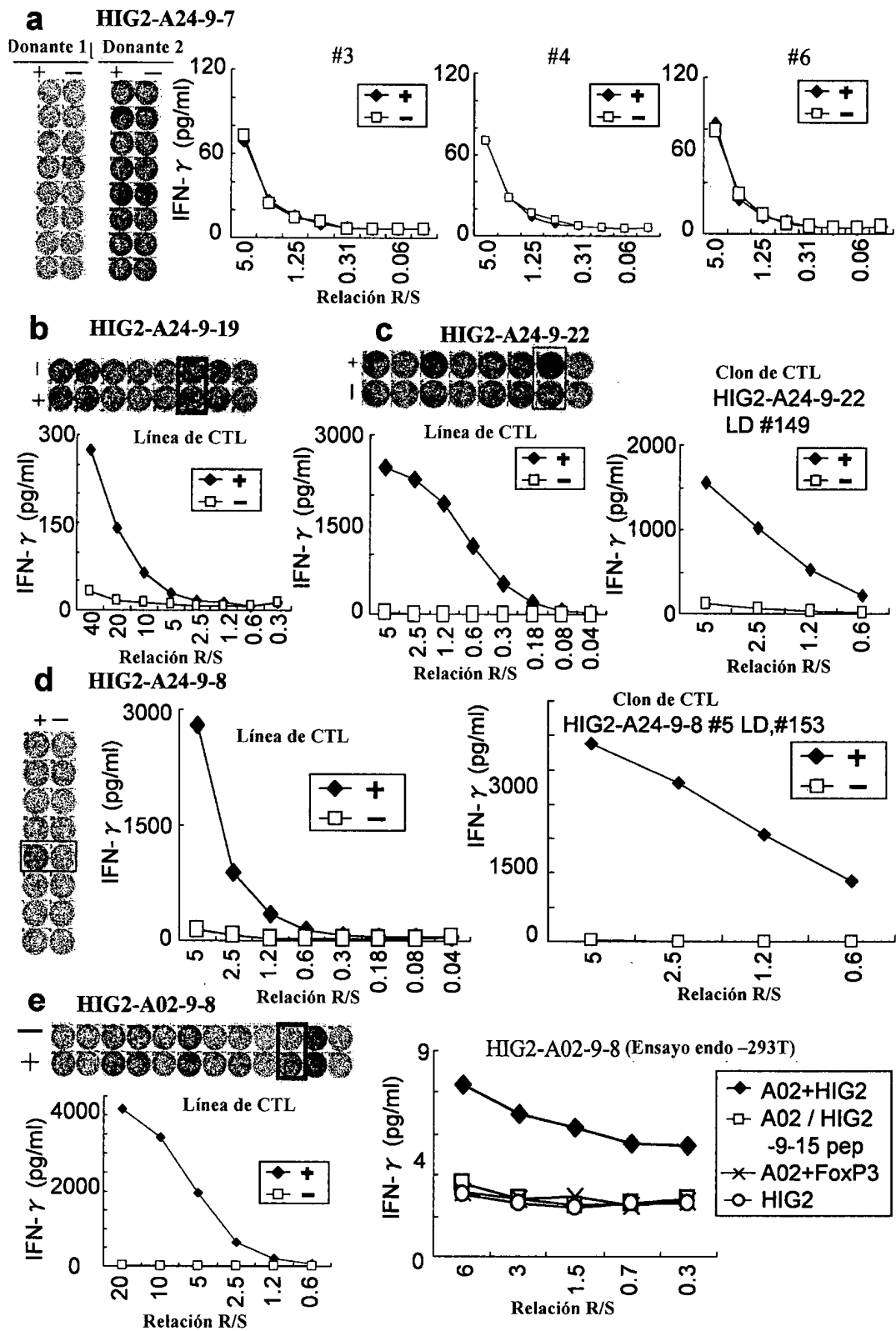
2]



[Fig.

3]

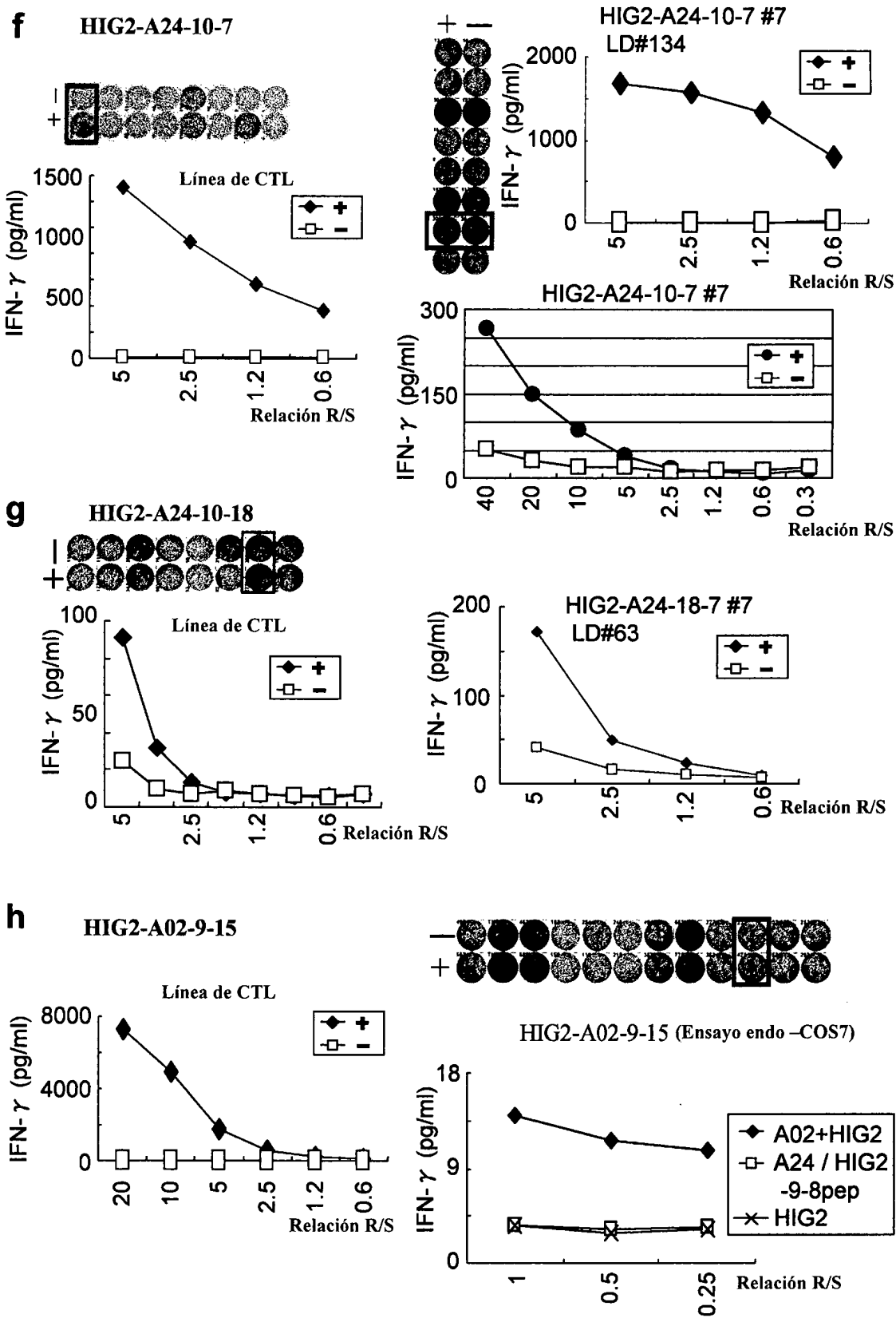




[Fig.

4-2]

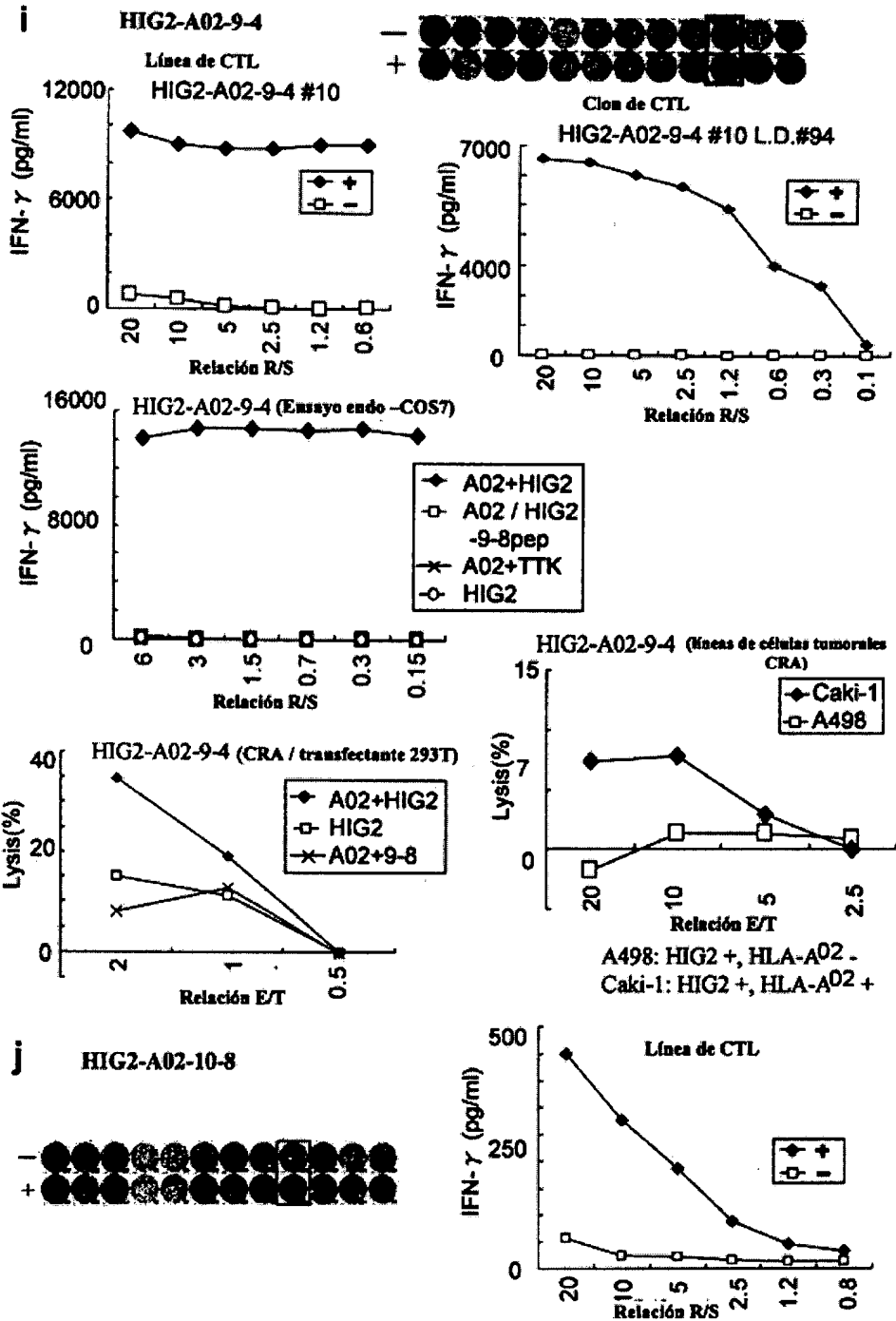
100



[Fig.

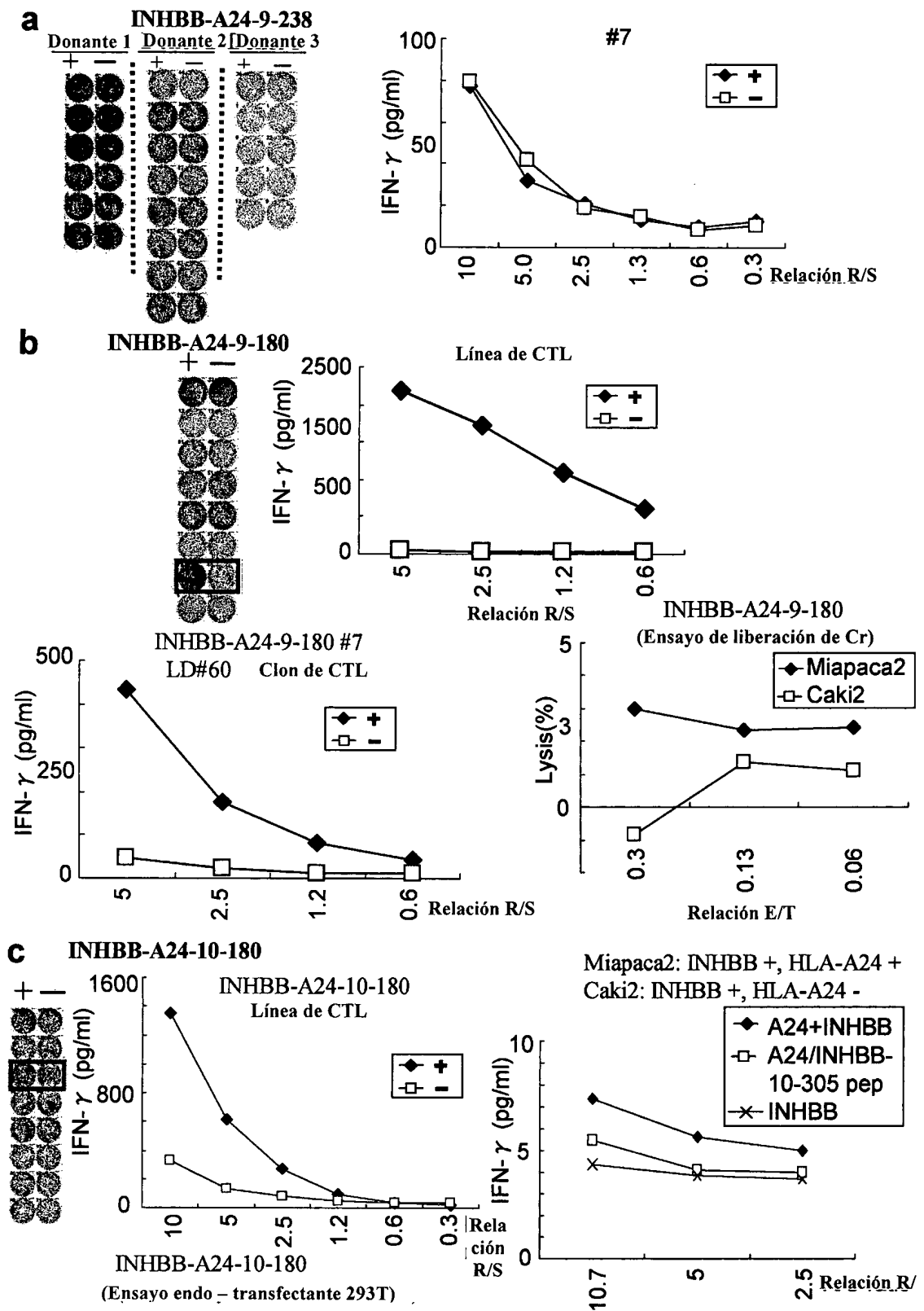
4-3]

[Fig. 4-3]



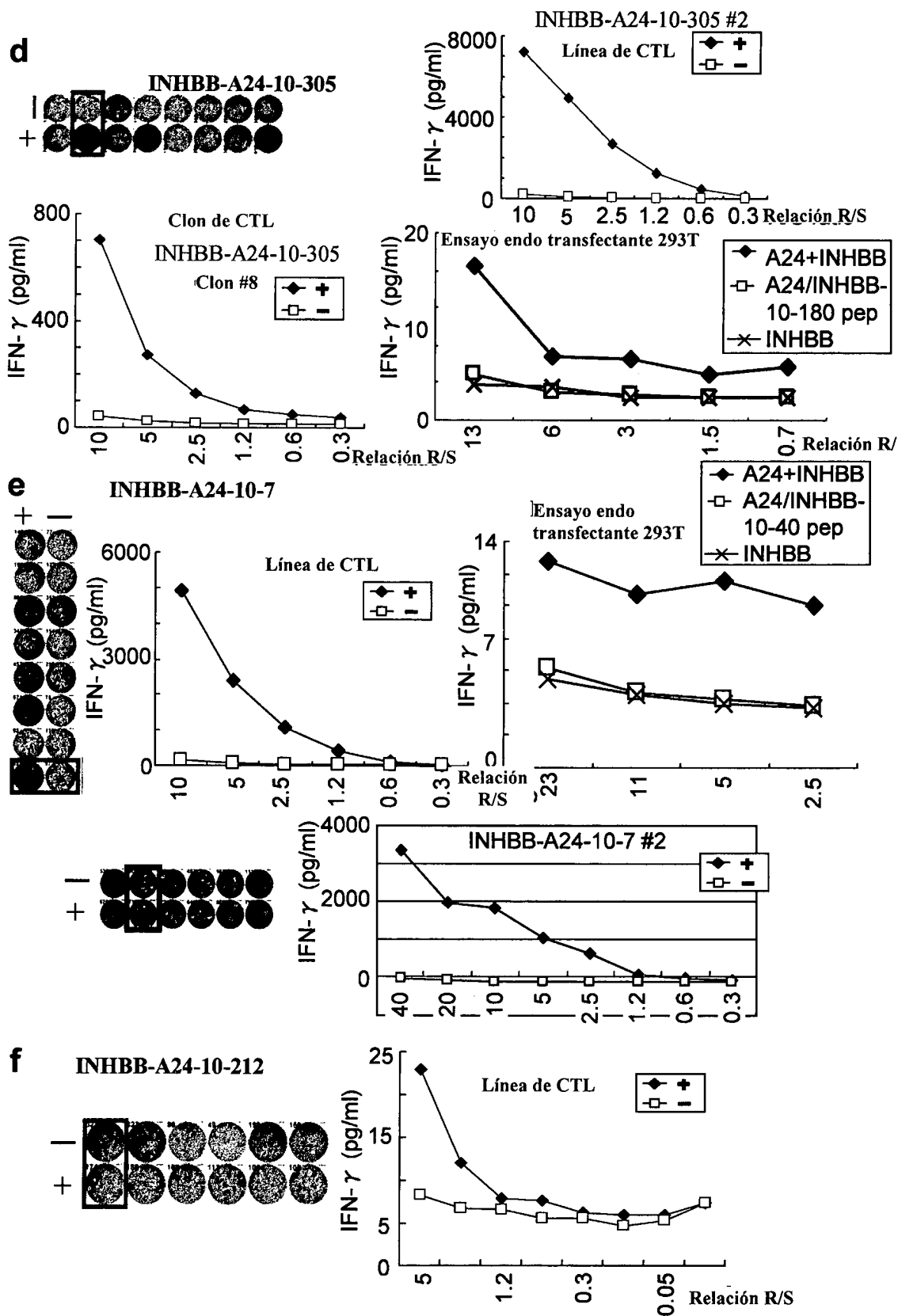
[Fig.

5-1]



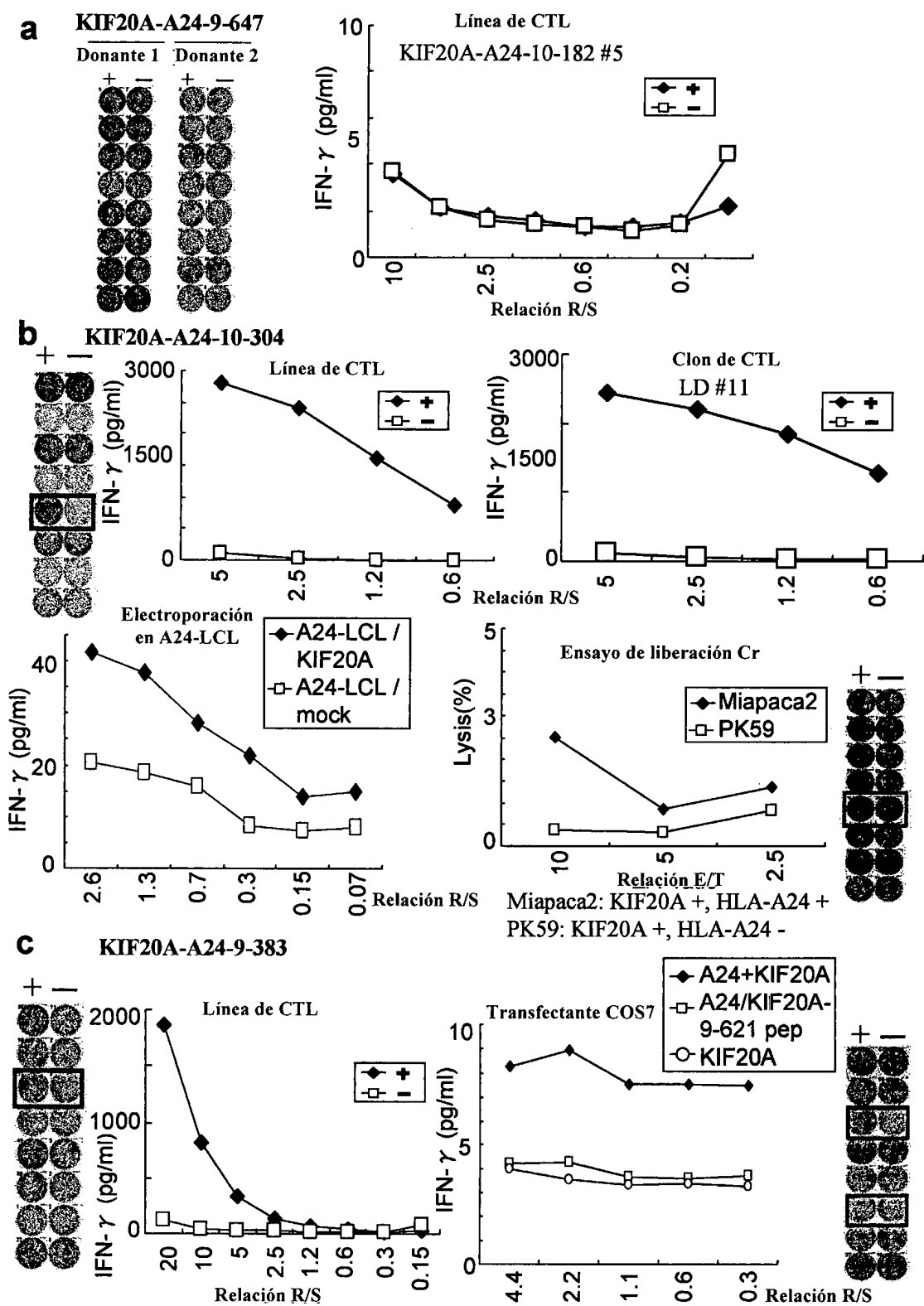
[Fig.

5-2]



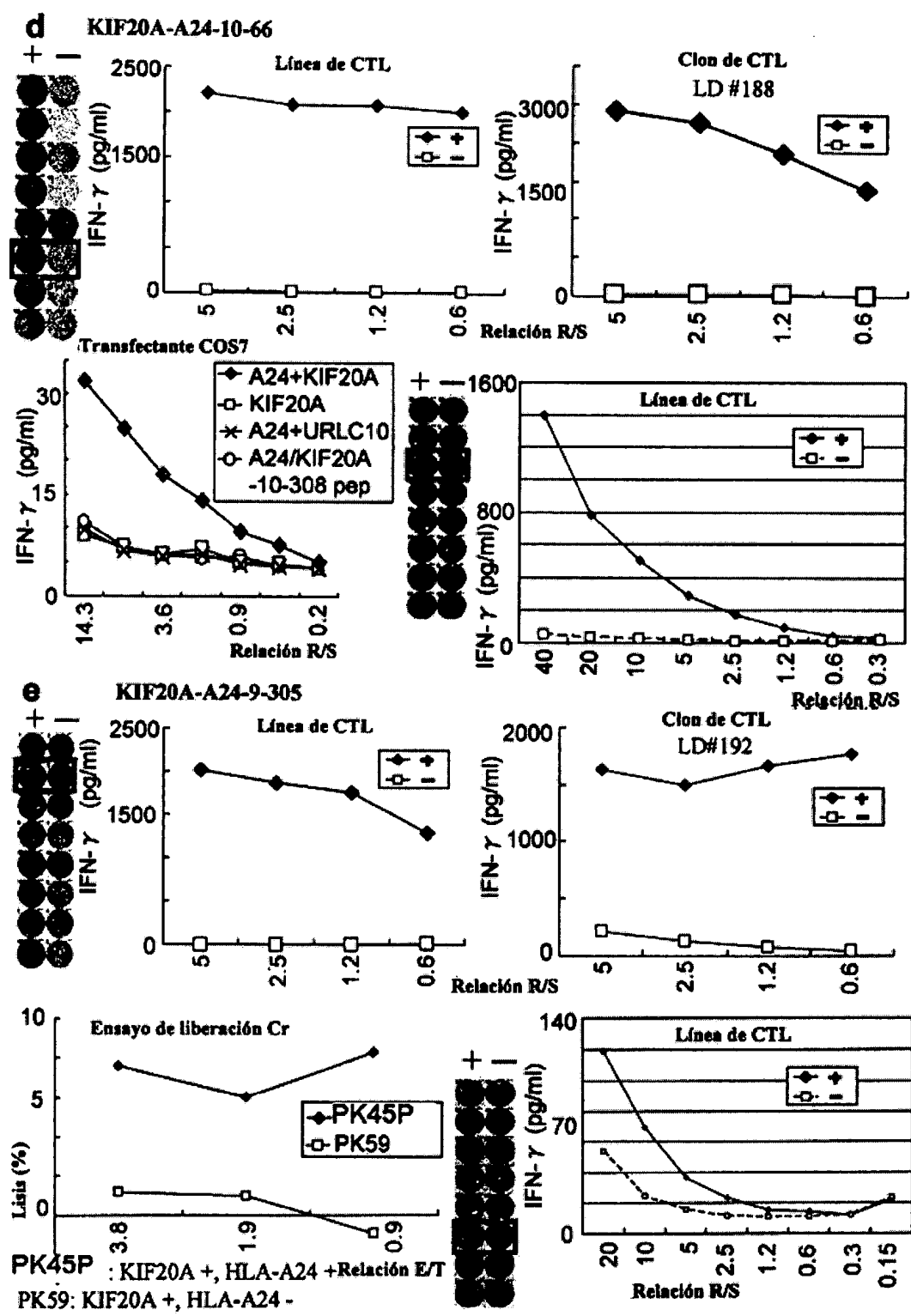
[Fig.

6-1]



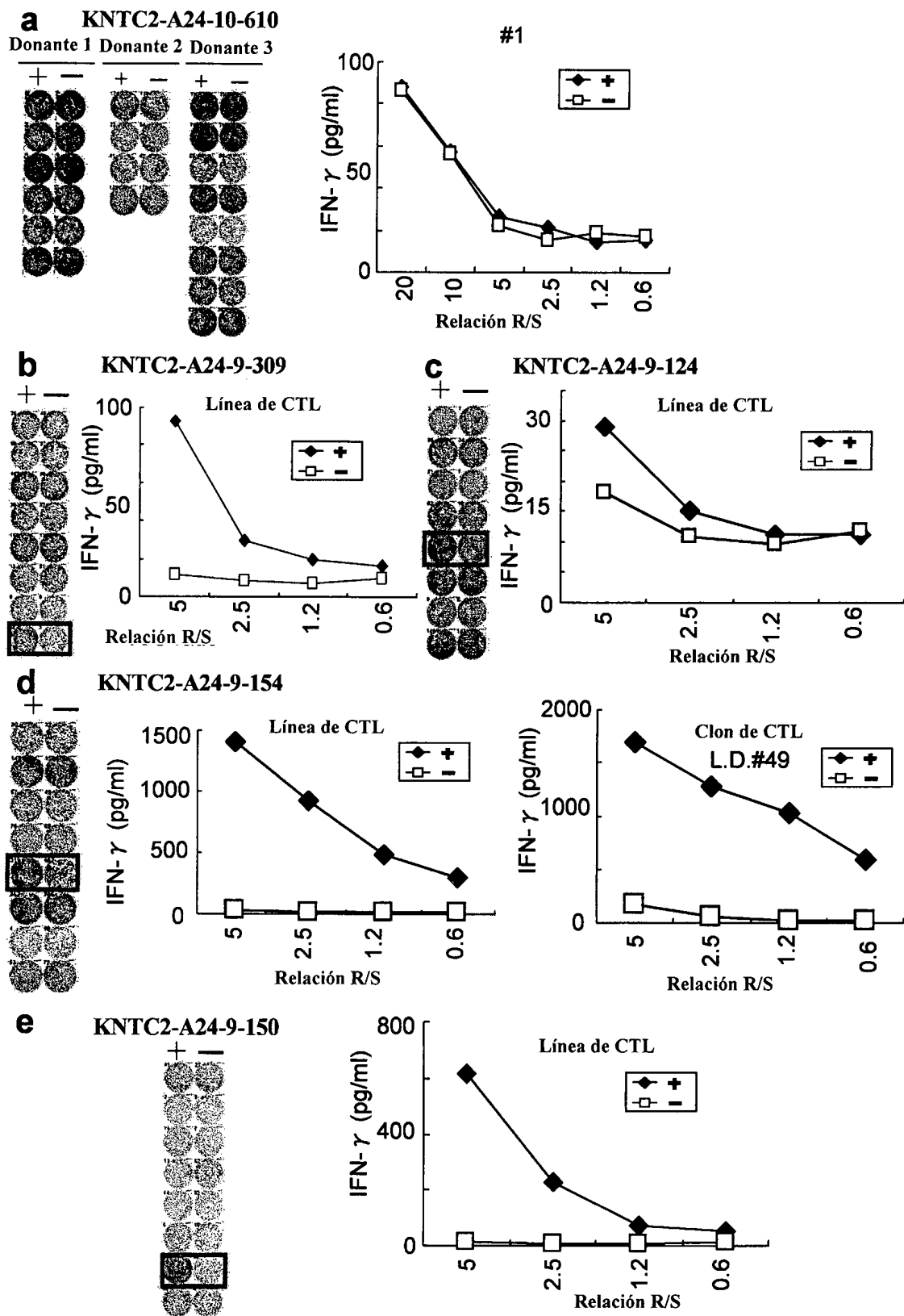
[Fig.

6-2]



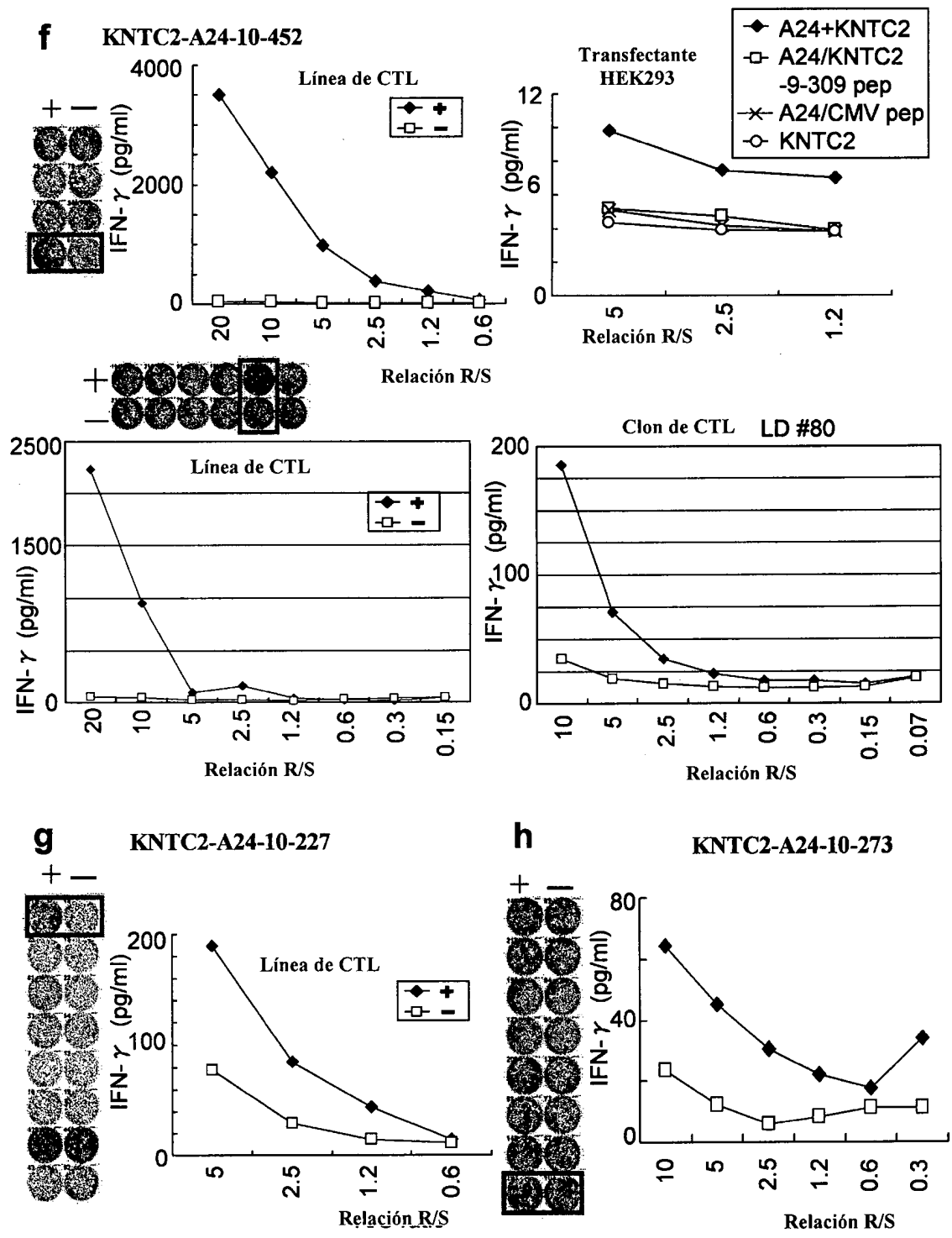
[Fig.

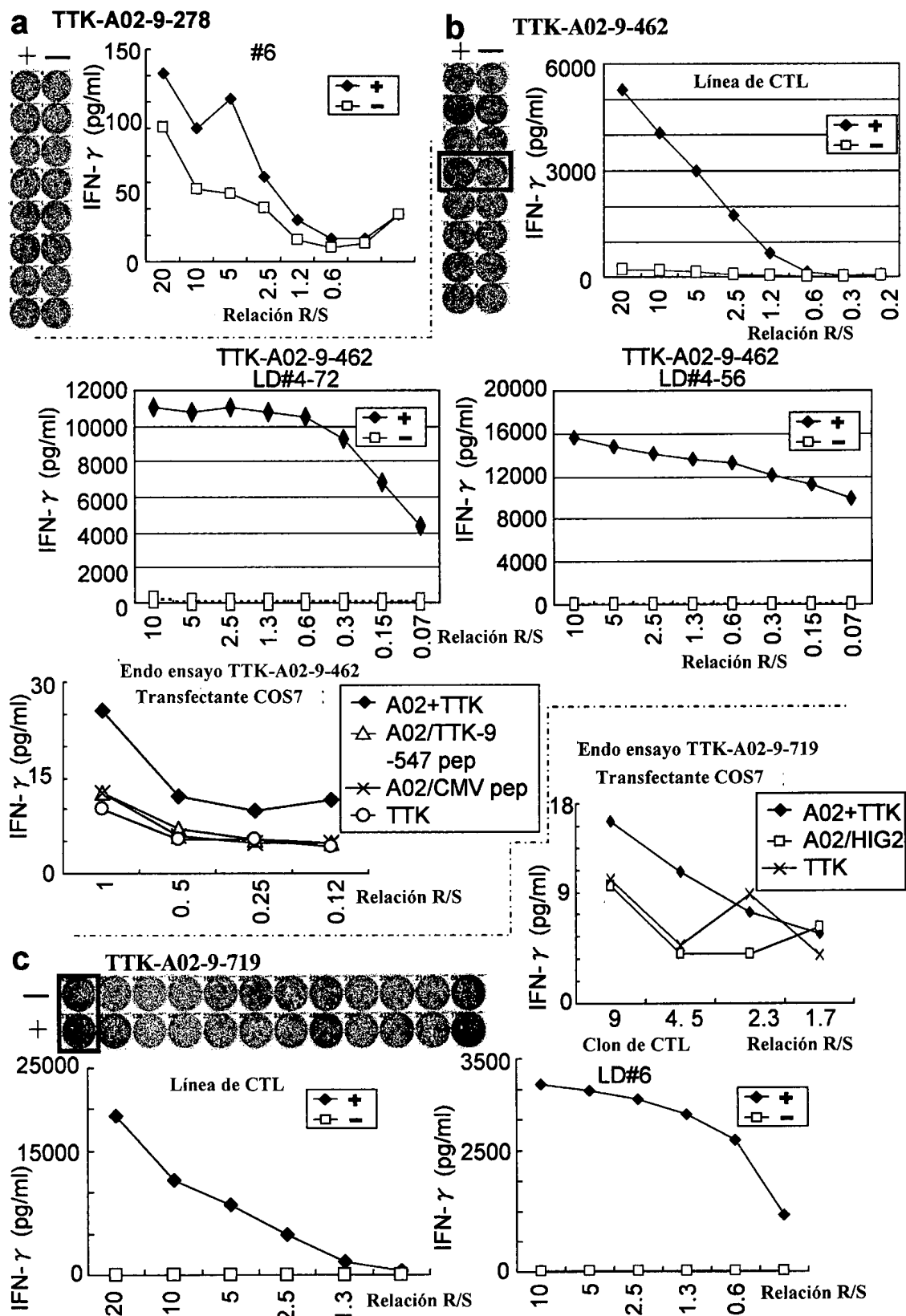
7-1]0



[Fig.

7-2]

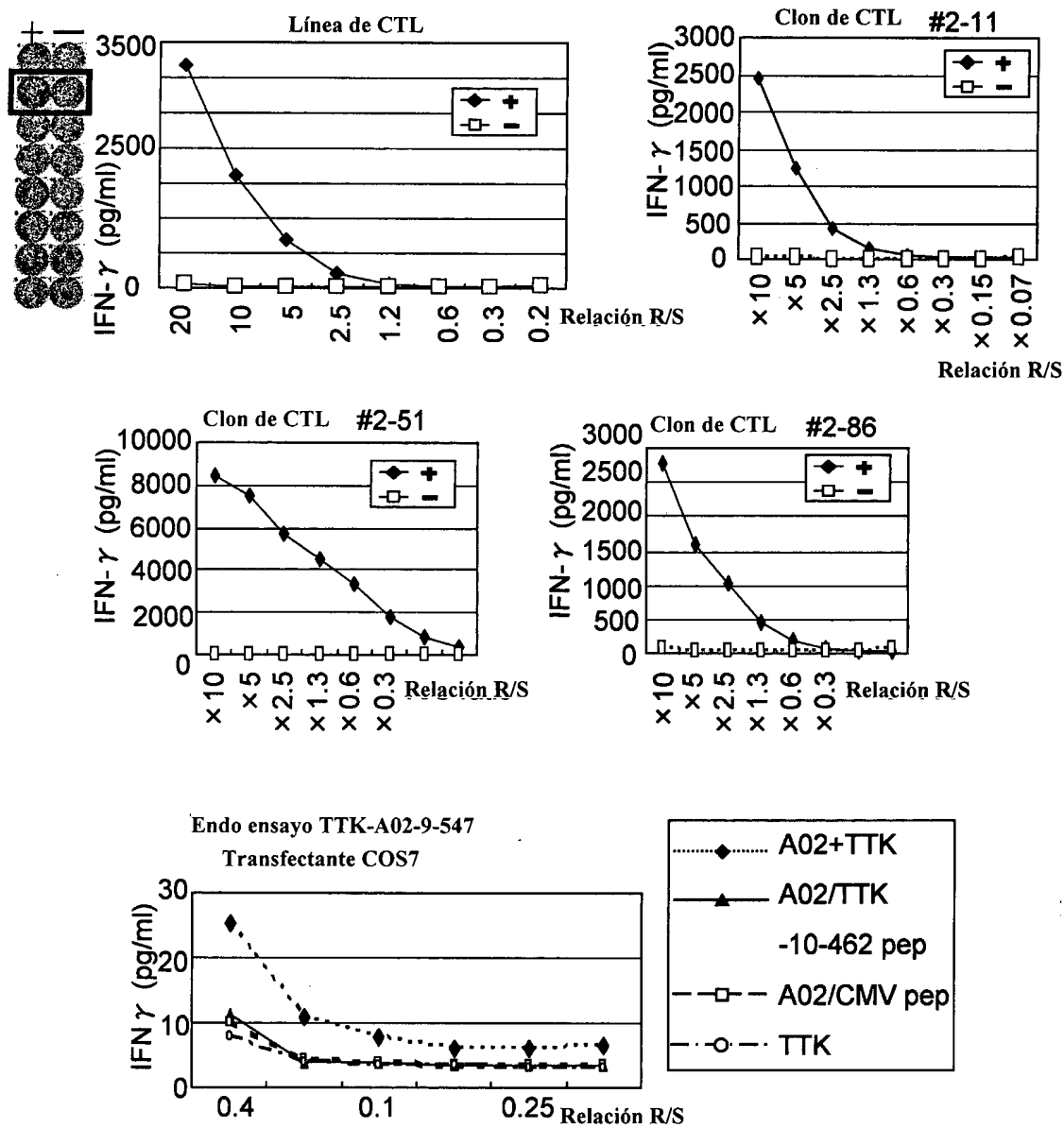




[Fig.

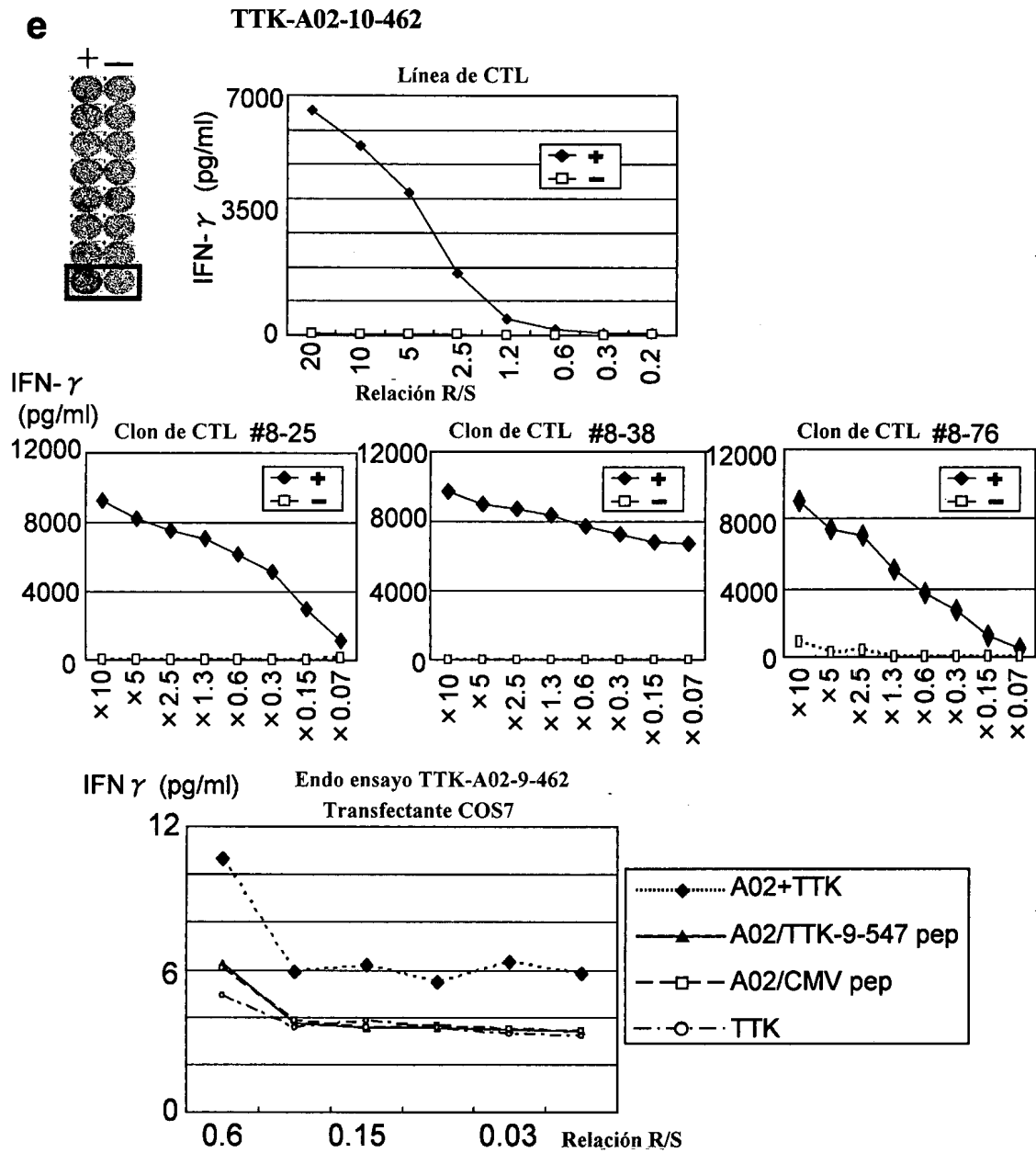
8-2]

d TTK-A02-9-547



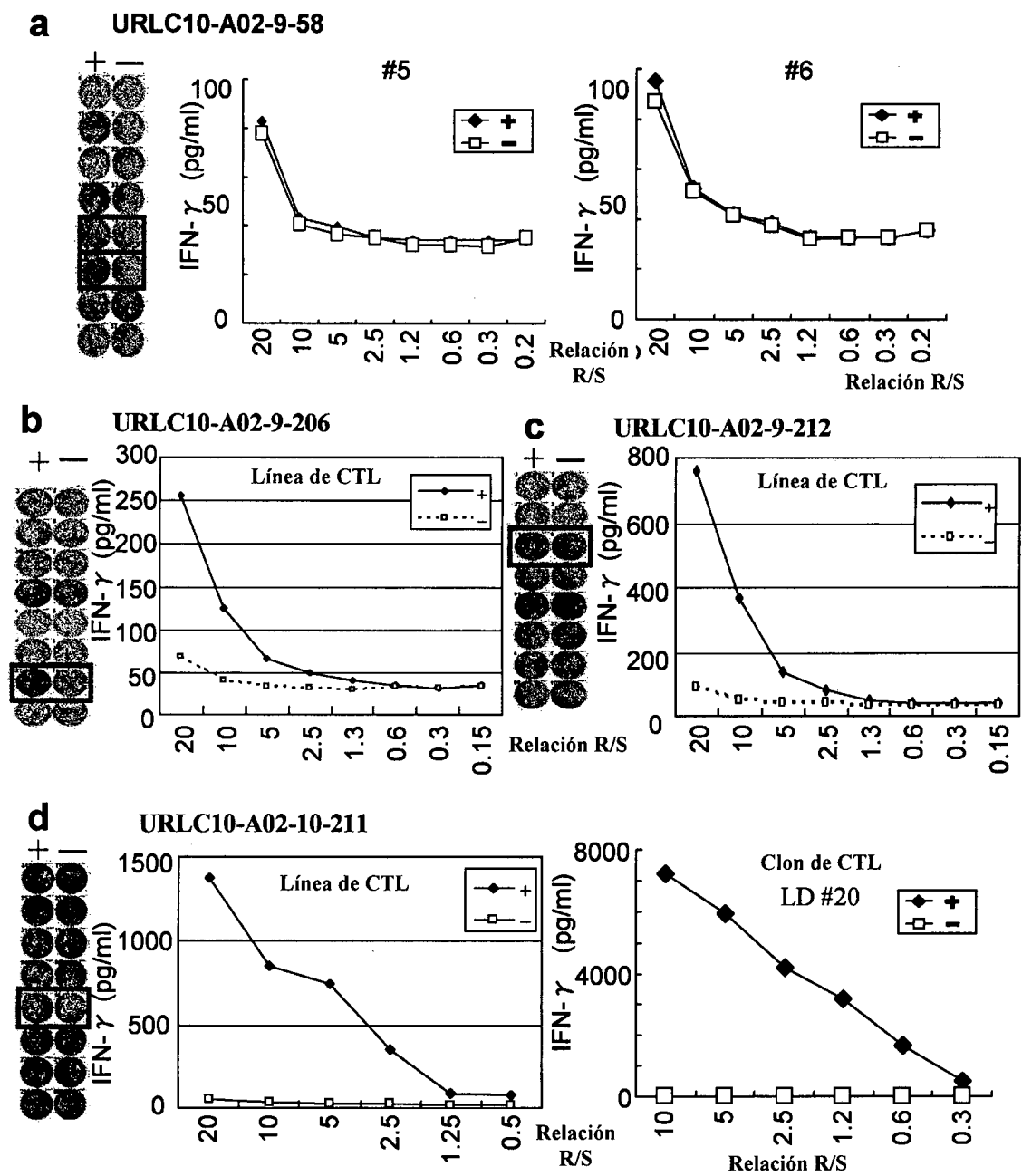
[Fig.

8-3]



[Fig.

111

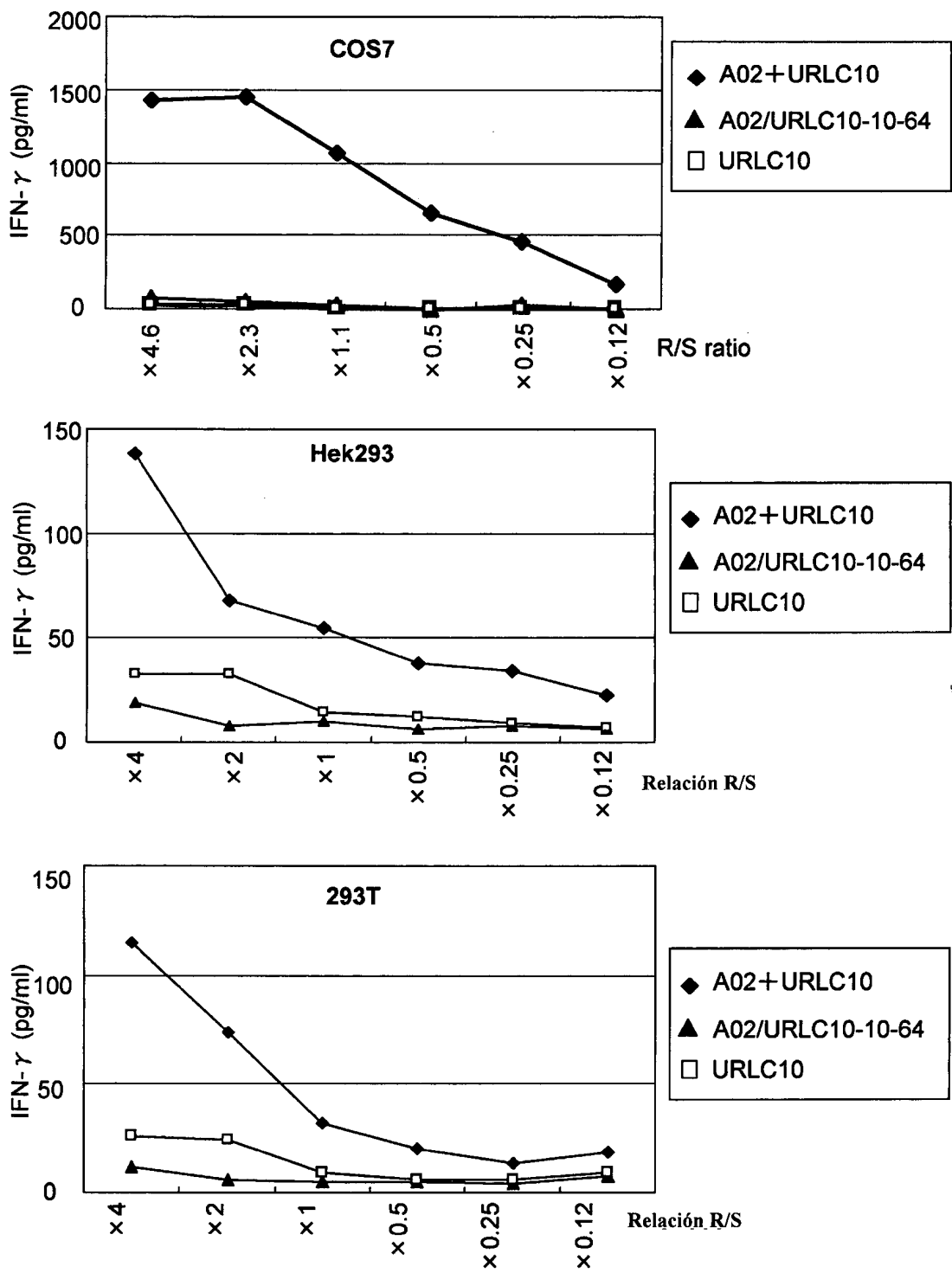


[Fig.

9-2]

Continuación de d

La línea CTL estimulada por URLC10-A02-10-211 reconoció células blanco que presentaban la expresión endógena de URLC10 con HLA-A02



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



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0077588

Bogotá D.C., Agosto 05 de 2013 - 16:41:03

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	560802480	02/08/2013	77.730.000.00

*** Conceptos Pagados ***

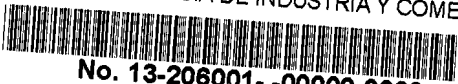
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNDITARIO	Vr CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
				\$450.000.00

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-206001-00000-0000

Fecha: 2013-08-30 14:24:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-101088-00003-0000

Fecha: 2013-08-30 14:24:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 115

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

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

Agosto 5 de 2013 - 16:41:23

114.

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



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0087003

Bogotá D.C., Agosto 30 de 2013 - 14:18:34

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 83.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	87002	30/08/2013		575.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
18 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	540.000.00
				\$540.000.00

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6



No. 13-206001- -00000-0000

Fecha: 2013-08-30 14:24:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 115

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

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

, Agosto 30 de 2013 - 14:18:35

115