

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 829**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C12N 5/0784 (2010.01)
C12N 5/0786 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2016 PCT/JP2016/057356**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16143816**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2016 E 16761783 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3269733**

54 Título: **Péptido derivado de GPC3, composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de cáncer usando el mismo, inductor de inmunidad y método para producir células presentadoras de antígeno**

30 Prioridad:

09.03.2015 JP 2015046463

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2021

73 Titular/es:

**CYTLIMIC INC. (100.0%)
15-19, Kamiosaki 2-chome, Shinagawa-ku
Tokyo 141-0021, JP**

72 Inventor/es:

**MIYAKAWA, TOMOYA;
OKA, MASAOKI;
HAZAMA, SHOICHI;
TAMADA, KOJI y
UDAKA, KEIKO**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 805 829 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptido derivado de GPC3, composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de cáncer usando el mismo, inductor de inmunidad y método para producir células presentadoras de antígeno

5

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a un péptido derivado de GPC3, más específicamente a un péptido inmunogénico para presentar un antígeno a una célula T por medio de unión a un antígeno leucocitario humano, a una composición farmacéutica para tratar o prevenir cáncer usando el mismo, a un inductor de inmunidad, a un método para producir una célula presentadora de antígeno, y similares.

10

Antecedentes de la técnica

Aunque se considera que las células cancerosas siempre aparecen de manera incidental en un organismo vivo, se plantea la hipótesis de que la reacción por inmunidad natural se produce normalmente para la eliminación de un antígeno canceroso específico derivado de células cancerosas y que luego se induce una respuesta inmunitaria específica para provocar la reacción de eliminación de células cancerosas por linfocitos y otras células.

15

El reconocimiento de un antígeno derivado de células cancerosas requiere la formación de un complejo por un antígeno leucocitario humano (HLA) presente en la superficie de la célula y un linfocito. La molécula de HLA como antígeno de histocompatibilidad se divide aproximadamente en moléculas de clase I (HLA de tipos A, B y C) y moléculas de clase II (HLA de tipos DP, DQ y DR). La reacción de eliminación de una célula cancerosa mediante una célula T citotóxica (CTL) se induce por el reconocimiento específico de un antígeno canceroso (epítipo de CTL) que consiste en de 8 a 11 aminoácidos que está presente en una molécula de HLA de clase I en la superficie de la célula cancerosa por un receptor de antígeno de células T (TCR) en la CTL.

20

25

La búsqueda de péptidos inmunogénicos se ha llevado a cabo actualmente con vistas a su aplicación al tratamiento o la prevención de diversas enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario; por ejemplo, la patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 08-151396 divulga que un oligopéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos particular tiene capacidad de unión a HLA.

30

Lista de referencias

Bibliografía de patentes

35

Documento de patente 1: patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 08-151396

Sumario de la invención

40

Problema técnico

Se conocen muchos péptidos que tienen capacidad de unión a HLA; sin embargo, existe la necesidad adicional de péptidos capaces de usarse para el tratamiento o la prevención de diversos cánceres. Dado que el gen de HLA es rico en polimorfismo, también existe la necesidad de péptidos inmunogénicos de múltiples tipos que puedan adaptarse cada uno a una pluralidad de tipos de HLA.

45

Solución al problema

En vista de las circunstancias descritas anteriormente, la presente invención tiene el objeto de proporcionar un péptido inmunogénico capaz de unirse a una molécula de HLA de clase I, particularmente un péptido capaz de inducir CTL, una composición farmacéutica para tratar o prevenir cáncer usando el péptido, un inductor de inmunidad y un método para producir una célula presentadora de antígeno.

50

Específicamente, la presente divulgación incluye los siguientes puntos.

55

(1) Un péptido que comprende 8 o más residuos de aminoácido consecutivos en una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 11 y que consiste en 11 o menos residuos de aminoácido.

(2) El péptido según el punto (1), en el que, en la secuencia de aminoácidos, se sustituyen, insertan, delecionan o añaden 1 o varios aminoácidos, y el péptido tiene inmunogenicidad.

60

(3) El péptido según el punto (2), en el que, en la secuencia de aminoácidos, el aminoácido en la posición 2 se sustituye por tirosina, fenilalanina, metionina, triptófano, valina, leucina o glutamina, y/o el aminoácido en el extremo C-terminal se sustituye por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, metionina o valina.

65

(4) Una composición farmacéutica para tratar o prevenir cáncer, que comprende el péptido según uno cualquiera de los puntos (1) a (3).

(5) La composición farmacéutica según el punto (4), en la que la composición está en forma de una vacuna.

(6) La composición farmacéutica según el punto (4) o el punto (5), en la que el péptido puede unirse a uno o más tipos de moléculas de HLA.

(7) Un inductor de inmunidad, que comprende el péptido según uno cualquiera de los puntos (1) a (3).

(8) El inductor de inmunidad según el punto (7), en el que el inductor es para inducir una célula T citotóxica.

(9) El inductor de inmunidad según el punto (7) o el punto (8), en el que el péptido puede unirse a uno o más tipos de moléculas de HLA.

(10) Un método para producir una célula presentadora de antígeno que tiene una actividad de inducción de CTL, que comprende una etapa de poner en contacto el péptido según uno cualquiera de los puntos (1) a (3) con una célula presentadora de antígeno *in vitro*.

Efectos ventajosos de la invención

Se ha prestado atención en los últimos años a la inmunoterapia como método para tratar cáncer. Se espera con firmeza que el péptido de la presente divulgación tenga utilidad como vacuna contra el cáncer debido a su alta capacidad de unión a HLA y también su alta capacidad de inducción de CTL. También se prevén sus aplicaciones a diversas inmunoterapias, particularmente terapia con células dendríticas.

El glipicano-3 (GPC3) es una proteína perteneciente a la familia de glipicanos. El glipicano es uno de los proteoglicanos y se sabe que se une a glicosil-fosfatidilinositol en la superficie celular. El glipicano controla la actividad de diversos factores de crecimiento celular incluyendo Wnts, y se cree que la acción es debida a la aceleración o inhibición de interacciones entre los factores de crecimiento celular y los receptores por parte del glipicano. En particular, se ha revelado que GPC3 se expresa en casi todos los casos de carcinoma hepatocelular (HCC) y, por otro lado, apenas se expresa en hígado normal, cirrosis hepática, etc. Además, se sabe que GPC3 se expresa altamente, no sólo en carcinoma hepatocelular, sino también en melanoma, cáncer de ovario, etc.

1. "Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma". Jorge Filmus y Mariana Capurro, FEBS J., 280: 2471-2476, 2013.

2. "Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy". Mitchell Ho y Heungnam Kim, Eur. J. Cancer, 47, 333-338, 2011.

Para el carcinoma hepatocelular, se han realizado previamente investigaciones clínicas para hallar una vacuna contra el cáncer con un péptido derivado de GPC3 que se exprese altamente en células de carcinoma hepatocelular, y se han notificado la seguridad y la capacidad de inducción de inmunidad.

3. "Peptide vaccines for hepatocellular carcinoma". Daisuke Nobuoka, Toshiaki Yoshikawa, Yu Sawada, Toshiyoshi Fujiwara y Tetsuya Nakatsura, Human Vaccines & Immunotherapeutics, 9, 210-212, 2013.

4. "Phase I Trial of a Glypican-3-Derived Peptide Vaccine for Advanced Hepatocellular Carcinoma: Immunologic Evidence and Potential of Improving Overall Survival". Yu Sawada, *et.al.*, Clin. Cancer. Res., 18, 3636-3696, 2012.

En la presente invención, se han identificado varios péptidos, cada uno de los cuales es un péptido derivado de GPC3 diferente, a partir de cualquiera de los péptidos notificados en las investigaciones clínicas, y que se une a una molécula de HLA y tiene capacidad de inducción de inmunidad. Entre los péptidos de la presente invención, un péptido particular puede unirse a una pluralidad de tipos de HLA. Por tanto, el péptido de la presente divulgación permite, por ejemplo, la provisión de una vacuna contra el cáncer y terapia con células dendríticas que cubre un intervalo extremadamente amplio de pacientes con cáncer.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo ELISPOT (el número de células que producen IFN- γ) cuando las muestras derivadas de pacientes [0] (tipo de HLA: 24: 02/24:02) que han recibido terapia con células dendríticas HSP70 se estimularon con el péptido de SEQ ID NO: 1.

[Figura 2] La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo ELISPOT (el número de células que producen IFN- γ) cuando las muestras derivadas de pacientes (tipo de HLA: 02: 01/24:02) que han recibido terapia con células dendríticas HSP70 se estimularon con el péptido de SEQ ID NO: 1, 2 ó 4.

[Figura 3] La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo ELISPOT (el número de células que producen IFN- γ) cuando las muestras derivadas de pacientes (tipo de HLA: 02: 01/33:03) que han recibido terapia con células dendríticas HSP70 se estimularon con el péptido de SEQ ID NO: 1, 2 ó 4.

5 [Figura 4] La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo ELISA (el número de células que producen IFN- γ) cuando las muestras derivadas de pacientes (tipo de HLA: 24: 02/26:01) que han recibido terapia con células dendríticas HSP70 se estimularon con el péptido de SEQ ID NO: 1, 2 ó 4.

10 [Figura 5] La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo ELISA (el número de células que producen IFN- γ) cuando las muestras derivadas de pacientes (tipo de HLA: 24: 02/24:02) que han recibido terapia con células dendríticas HSP70 se estimularon con el péptido de SEQ ID NO: 1, 2 ó 4.

15 [Figura 6] La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo ELISA (el número de células que producen IFN- γ) cuando las muestras derivadas de pacientes (tipo de HLA: 11: 01/24:02) que han recibido terapia con células dendríticas HSP70 se estimularon con el péptido de SEQ ID NO: 1, 2 ó 4.

20 [Figura 7] La figura 7 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo ELISA (el número de células que producen IFN- γ) cuando las muestras derivadas de pacientes (tipo de HLA: 02: 01/24:02) que han recibido terapia con células dendríticas HSP70 se estimularon con el péptido de SEQ ID NO: 1, 2 ó 4.

25 [Figura 8] La figura 8 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo ELISA (el número de células que producen IFN- γ) cuando las muestras derivadas de pacientes (tipo de HLA: 02: 01/33:03) que han recibido terapia con células dendríticas HSP70 se estimularon con el péptido de SEQ ID NO: 1, 2 ó 4.

Descripción de las realizaciones

1. Péptido inmunogénico

30 Los péptidos según la presente divulgación son cada uno un péptido que comprende 8 o más residuos de aminoácido consecutivos en una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 11 y que consiste en 11 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 9 o menos residuos de aminoácido en total. El péptido de la presente divulgación puede ser un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 11. El péptido de la presente divulgación se deriva de GPC3, que es uno de glipicano. Se ha seleccionado una

35 secuencia de aminoácidos cuya capacidad de unión a la molécula de HLA es de 3 o más en cuanto a un valor de $-\log K_d$, y la capacidad de unión en este caso se predijo por la hipótesis obtenida usando un método de experimento de aprendizaje activo (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 08-151396) basándose en la secuencia de aminoácidos que constituye GPC3.

40 La secuencia de aminoácidos que constituye cada péptido de la presente divulgación y su puntuación de predicción de unión a HLA se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Tabla 1]

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:)	Posición en GPC3	Puntuación de predicción de unión		
		a A*24:02	a A*02:01	a A*02:06
MVNELFDSL (SEQ ID NO: 1)	166	4,9889	4,5125	4,914
LFDSLFPVI (SEQ ID NO: 2)	170	5,3875	4,6623	4,8693
SALDINECL (SEQ ID NO: 3)	190	5,0802	5,1752	4,9393
SLQVTRIFL (SEQ ID NO: 4)	222	4,9563	4,7937	4,9102
SLTPQAFEF (SEQ ID NO: 5)	136	5,3611	4,4718	4,5358
GYICSHSPV (SEQ ID NO: 6)	407	5,2631	4,5208	4,6902
ALNLGIEVI (SEQ ID NO: 7)	232	4,7512	4,8916	4,8959
LLQSASMEL (SEQ ID NO: 8)	92	4,6163	4,9287	5,0213
KLTTTIGKL (SEQ ID NO: 9)	340	5,6526	4,2118	4,2929

GMIKVKNQL (SEQ ID NO: 10)	512	5,5052	4,3292	4,0995
ARLNMEQLL (SEQ ID NO: 11)	85	5,0076	4,1008	4,2227

El péptido de la presente divulgación tiene una capacidad de unión a HLA y tiene inmunogenicidad (algunas veces denominado simplemente a continuación en el presente documento "péptido HLA" o "péptido inmunogénico"). Tal como se usa en el presente documento, "inmunogenicidad" significa la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria y, por ejemplo, significa tener una actividad de inducción de CTL y, por consiguiente, tener una actividad citotóxica contra células cancerosas.

En una realización preferida, el péptido de la presente divulgación es un péptido HLA múltiple capaz de unirse a una pluralidad de alelotipos del gen A de HLA-A. Por ejemplo, el péptido de SEQ ID NO: 7 se une fuertemente a un producto del gen de HLAA*24:02 (una molécula HLA-A*24:02), un producto del gen de HLA-A*02:01 (una molécula HLA-A*02:01) y un producto del gen de HLA-A*02:06 (una molécula HLA-A*02:06), y tiene una alta inmunogenicidad.

El subtipo de HLA al que puede unirse el péptido de la presente divulgación no se limita a HLA-A*24:02, HLAA*02:01 o HLA-A*02:06. Sin embargo, estos subtipos de HLA cubren el orden del 85% de personas orientales incluyendo los japoneses y el orden del 55% de gente occidental; por tanto, se considera que el péptido HLA múltiple de la presente divulgación logra una amplia cobertura de pacientes, por ejemplo, en inmunoterapia.

El péptido de la presente divulgación puede modificarse en los residuos de aminoácido que constituyen la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 11 o una parte de las mismas siempre que mantenga la inmunogenicidad. La secuencia de aminoácidos de cada una de las SEQ ID NO: 1 a 11 pretende un estado que se presenta en una célula presentadora de antígeno; sin embargo, cuando el péptido de la presente divulgación se administra directamente en el organismo, el péptido a veces experimenta cambios, tales como la digestión de su extremo terminal en órganos digestivos y similares, dependiendo de la vía de administración. Por tanto, antes de la incorporación en una célula presentadora de antígeno, el péptido de la presente divulgación puede estar presente en forma de un precursor que se forma añadiendo uno o más residuos de aminoácido o similares en el extremo N-terminal y/o C-terminal de modo que se mantenga la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 11 tras la unión a una molécula de HLA de clase I predeterminada en la célula presentadora de antígeno.

Además, el péptido de la presente divulgación puede tener 1 o varios residuos de aminoácido que constituyen el péptido de la presente divulgación sustituidos, insertados, delecionados o añadidos, y/o tener modificaciones, tales como adición de cadenas de azúcares, oxidación de cadenas laterales y/o fosforilación, siempre que el péptido tenga la inmunogenicidad deseada. "Aminoácido" en el presente documento se usa en su sentido más completo e incluye variantes y derivados de aminoácidos artificiales además de aminoácidos naturales. Los ejemplos del aminoácido en el presente documento incluyen L-aminoácidos proteicos naturales; D-aminoácidos; aminoácidos químicamente modificados, tales como variantes y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteicos naturales, tales como norleucina, β -alanina y ornitina; y compuestos químicamente sintetizados que tienen propiedades conocidas en la técnica, características de aminoácidos. Los ejemplos del aminoácido no natural incluyen α -metil-aminoácidos (por ejemplo, α -metilalanina), D-aminoácidos, aminoácidos similares a histidina (por ejemplo, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina y α -metil-histidina), aminoácidos que tienen metileno adicional en la cadena lateral ("homo" aminoácidos) y aminoácidos en cada uno de los cuales el grupo funcional ácido carboxílico en la cadena lateral está sustituido por un grupo ácido sulfónico (por ejemplo, ácido cisteico).

Para la sustitución de un residuo de aminoácido y similares, teniendo en cuenta la regularidad de una secuencia de un péptido que tiene una capacidad de unión a HLA (J. Immunol., 152: p3913, 1994; Immunogenetics, 41: p178, 1995; J. Immunol., 155: p4307, 1994), los expertos en la técnica pueden sustituir de manera adecuada un residuo de aminoácido como constituyente del péptido de la presente divulgación.

Más específicamente, en el caso de un péptido que se une a una molécula HLA-A*24:02, el aminoácido en la posición 2 del péptido puede estar sustituido por tirosina, fenilalanina, metionina o triptófano, y/o el aminoácido C-terminal puede estar sustituido por fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina. En el caso de un péptido que se une a una molécula HLA-A*02:01, el aminoácido en la posición 2 puede estar sustituido por leucina o metionina, y/o el aminoácido C-terminal puede estar sustituido por valina o leucina. Además, en el caso de un péptido que se une a una molécula HLAA*02:06, el aminoácido en la posición 2 puede estar sustituido por valina o glutamina, y/o el aminoácido C-terminal puede estar sustituido por valina o leucina.

Cada péptido de la presente divulgación puede producirse usando una técnica conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede sintetizarse de manera artificial mediante un método en fase sólida, tal como el método Fmoc o el método tBoc, o un método en fase líquida. Un péptido deseado también puede producirse mediante la expresión de un polinucleótido que codifica para el péptido de la presente divulgación o un vector recombinante que contiene el polinucleótido. Los péptidos obtenidos de ese modo pueden identificarse cada uno usando una técnica conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede identificarse usando el método de degradación de Edman o un método

de espectrometría de masas.

2. Composición farmacéutica

5 La composición farmacéutica para tratar o prevenir cáncer según la presente invención contiene, como principio activo, por ejemplo, un péptido que contiene 8 o más residuos de aminoácido consecutivos en una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 11 y que consiste en 11 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 9 o menos residuos de aminoácido en total. El péptido contenido en la composición farmacéutica puede ser un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 11. El péptido es tal como se definió anteriormente en el presente documento.

15 El péptido de la presente divulgación induce CTL presentándose en una célula presentadora de antígeno, y la CTL inducida daña una célula cancerosa. Por tanto, el principio activo de la composición farmacéutica de la presente invención no se limita al péptido de la presente divulgación, y puede ser un componente capaz de inducir directa o indirectamente CTL, por ejemplo, un polinucleótido que codifica para el péptido o un vector que contiene el polinucleótido, o una célula presentadora de antígeno que presenta un complejo del péptido y una molécula de HLA en la superficie o un exosoma secretado de la célula presentadora de antígeno, o una combinación de los mismos. Los ejemplos de la célula presentadora de antígeno usada incluyen un macrófago y una célula dendrítica; sin embargo, es preferible usar la célula dendrítica, que tiene una alta capacidad de inducción de CTL. Cualquiera de otros principios que se sabe que se usan para terapia contra el cáncer, tales como una quimiocina, una citocina, un factor de necrosis tumoral y un agente quimioterápico, puede estar contenido en la composición farmacéutica de la presente invención. La dosis del péptido puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 10 mg por día cuando el paciente es un adulto. Sin embargo, la dosis varía dependiendo de la edad y el peso corporal del paciente, el método de administración y similares, y, por tanto, se determina de manera adecuada por los expertos en la técnica.

25 Se piensa que la composición farmacéutica de la presente invención es útil para la destrucción de células cancerosas mediante, por ejemplo, pero sin pretender limitarse a, el siguiente mecanismo de acción. La administración de la composición farmacéutica de la presente invención a un paciente con cáncer particular da como resultado que el péptido en la composición farmacéutica se presente en un estado en el que se une a una molécula de HLA en la superficie de la célula presentadora de antígeno. Al reconocer el péptido en una célula presentadora de antígeno de este tipo, la CTL se activa, prolifera y circula de manera sistémica. Cuando la CTL específica de péptido ingresa en el tejido canceroso, reconoce el mismo péptido derivado de un antígeno canceroso específico, que se une de manera natural a una molécula de HLA presente en la superficie de la célula cancerosa para destruir la célula cancerosa. Una acción de este tipo contribuye al tratamiento del cáncer.

35 La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse no sólo para tratar el cáncer sino también para prevenir el cáncer. Por ejemplo, la administración de la composición farmacéutica de la presente invención a un organismo humano sano induce la CTL, y la célula T citotóxica inducida permanece en el organismo y, por tanto, cuando se produce una célula cancerosa particular, puede dañar la célula cancerosa. De manera similar, la composición puede administrarse a un organismo humano después de tratar el cáncer para prevenir la recidiva del cáncer.

45 Cualquier cáncer que exprese GPC3 está contemplado como cáncer que va a tratarse o prevenirse. Los ejemplos más específicos del cáncer de interés incluyen, pero sin pretender limitarse a, cáncer hepatocelular, cáncer cutáneo, tal como melanoma, y cáncer de ovario. Por ejemplo, dado que el GPC3 a partir del cual se deriva el péptido de la presente divulgación se sobreexpresa en cáncer hepatocelular, se considera que el péptido de la presente divulgación es eficaz particularmente en el tratamiento o la prevención del cáncer hepatocelular. Cuando están presentes una pluralidad de cánceres que van a tratarse o prevenirse, pueden estar contenidos una pluralidad de principios activos, incluyendo el péptido inmunogénico, en la composición farmacéutica de la presente invención.

50 La composición farmacéutica de la presente invención puede disolverse en un disolvente acuoso, formularse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable y administrarse a pacientes. Los ejemplos de la forma de una sal farmacéuticamente aceptable de este tipo incluyen una forma tamponada a pH fisiológico en forma de una sal fisiológicamente aceptable soluble en agua, por ejemplo, una sal de sodio, potasio, magnesio o calcio. Además del disolvente soluble en agua, también puede usarse un disolvente insoluble en agua; los ejemplos de un disolvente insoluble en agua de este tipo incluyen alcoholes, tales como etanol y propilenglicol.

60 La formulación que contiene la composición farmacéutica de la presente realización puede contener agentes con diversos fines; los ejemplos de tales agentes incluyen un conservante y un agente tamponante. Los ejemplos del conservante incluyen bisulfito de sodio, bisulfato de sodio, tiosulfato de sodio, cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercurio, nitrato fenilmercurio, metilparabeno, poli(alcohol vinílico), alcohol feniletílico, amoniaco, ditiotreitól y beta-mercaptoetanol. Los ejemplos del agente tamponante incluyen carbonato de sodio, borato de sodio, fosfato de sodio, acetato de sodio y bicarbonato de sodio. Estos agentes pueden estar presentes en una cantidad capaz de mantener el pH de un sistema a de 2 a 9, preferiblemente de 4 a 8.

65 La forma de dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención no está particularmente limitada;

5 sin embargo, cuando se usa en forma de una vacuna, los ejemplos de su forma de dosificación incluyen inyecciones (intramuscular, subcutánea e intracutánea), formulaciones orales y formulaciones de gotas nasales. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención está en forma de una vacuna, puede ser una vacuna de cóctel mixta que contiene una pluralidad de principios activos. Por ejemplo, una vacuna de este tipo puede contener cualesquiera dos o más de los péptidos de las SEQ ID NO: 1 a 11, o contener una pluralidad de principios activos por combinación con otros principios activos.

10 La vacuna de la presente invención puede ser una vacuna que contiene un principio inerte que contiene un principio que es un principio distinto de la composición farmacéutica, no tiene actividad *per se* y tiene el efecto de potenciar adicionalmente el efecto de la composición farmacéutica como vacuna. Los ejemplos del principio inerte incluyen un adyuvante y un toxoide. Los ejemplos del adyuvante incluyen, pero sin pretender limitarse a, los del tipo precipitación, tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio, y los del tipo oleosos, tales como adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund.

15 Cuando está presente en forma de una vacuna, la composición farmacéutica de la presente invención se administra preferiblemente en el organismo mediante inyección o infusión, tal como administración intracutánea, subcutánea o intramuscular, o mediante administración dérmica o inhalación a través de la mucosa de la nariz, la faringe o similares. Su dosis única puede ajustarse entre una dosis capaz de inducir significativamente células T citotóxicas y una dosis a la que un número significativo de células no cancerosas experimentan daño.

20 La composición farmacéutica de la presente invención se contempla no sólo para la administración a un organismo humano sino también para uso extracorporal. Más específicamente, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse con el fin de estimular una célula presentadora de antígeno *in vitro* o *ex vivo* para aumentar su actividad de inducción de CTL. Por ejemplo, en un caso en el que la composición farmacéutica de la presente invención se usa para terapia con células dendríticas para el cáncer, la composición puede ponerse en contacto con células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, derivadas de un paciente que necesita tratamiento o prevención contra el cáncer de antemano, seguido por la administración de las células presentadoras de antígeno al paciente devolviéndolas al organismo del paciente. El péptido contenido en la composición farmacéutica puede introducirse en una célula presentadora de antígeno, por ejemplo, mediante un método de lipofección o un método de inyección. Cuando se usa un polinucleótido que codifica para el péptido de la presente divulgación en una aplicación de este tipo, el polinucleótido puede introducirse en una célula presentadora de antígeno mediante una técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, una célula presentadora de antígeno derivada de un paciente puede transformarse *in vitro* usando un polinucleótido de interés o un vector que codifica para el polinucleótido mediante un método de lipofección, un método de electroporación, un método de microinyección, un método de fusión celular, un método de DEAE-dextrano, un método de fosfato de calcio, o similares.

3. Inductor de inmunidad

40 El inductor de inmunidad según la presente invención contiene, como principio activo, por ejemplo, un péptido que contiene 8 o más residuos de aminoácido consecutivos en una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 11 y que consiste en 11 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 9 o menos residuos de aminoácido. El péptido contenido en el inductor de inmunidad puede ser un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 11. El péptido es tal como se definió anteriormente en el presente documento.

45 Se considera que el péptido de la presente divulgación induce inmunidad presentándose en una célula presentadora de antígeno. Por tanto, el principio activo del inductor de inmunidad de la presente invención no se limita al péptido de la presente divulgación, y puede ser un componente capaz de inducir directa o indirectamente inmunidad, por ejemplo, un polinucleótido que codifica para el péptido de la presente divulgación o un vector de expresión que contiene el péptido, o una célula presentadora de antígeno que presenta un complejo del péptido y una molécula de HLA en la superficie o un exosoma secretado de la célula presentadora de antígeno, o una combinación de los mismos. Los ejemplos de la célula presentadora de antígeno usada incluyen un macrófago y una célula dendrítica; sin embargo, es preferible usar la célula dendrítica, que tiene una alta capacidad de inducción de CTL.

50 El inductor de inmunidad de la presente invención se contempla no sólo para la administración a un organismo humano sino también para uso extracorporal. Más específicamente, el inductor de inmunidad de la presente invención puede usarse con el fin de estimular una célula presentadora de antígeno *in vitro* o *ex vivo* para aumentar su actividad de inducción de CTL. Por ejemplo, en un caso en el que el inductor de inmunidad de la presente invención se usa para terapia con células dendríticas, el inductor puede ponerse en contacto con células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, derivadas de un paciente que necesita inducción de inmunidad de antemano, seguido de la administración de las células presentadoras de antígeno al paciente devolviéndolas al organismo del paciente. El péptido contenido en el inductor de inmunidad puede introducirse en una célula presentadora de antígeno, por ejemplo, mediante transfección a través de un liposoma (un método de lipofección) o un método de inyección. Cuando se usa un polinucleótido que codifica para el péptido de la presente divulgación en una aplicación de este tipo, el polinucleótido puede introducirse en una célula presentadora de antígeno mediante una técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, una célula presentadora de antígeno derivada de un paciente puede transformarse *in vitro* usando un polinucleótido

de interés o un vector que expresa el polinucleótido mediante un método de lipofección, un método de electroporación, un método de microinyección, un método de fusión celular, un método de DEAE-dextrano, un método de fosfato de calcio, o similares.

5 Tal como se usa en el presente documento, "inducción de inmunidad" significa inducir una respuesta inmunitaria, por ejemplo, aumentando la actividad de inducción de CTL de una célula presentadora de antígeno y aumentando
 10 adicionalmente la actividad citotóxica de CTL contra una célula cancerosa. Tal como se usa en el presente documento, "inducción de CTL" significa inducir o proliferar una CTL que reconoce específicamente un antígeno determinado, o diferenciar una célula T indiferenciada en una célula efectora que tiene la capacidad de destruir una célula diana
 15 (actividad citotóxica), tal como una célula cancerosa, y/o aumentar la actividad citotóxica de CTL mediante la presentación del péptido de la presente divulgación en la superficie de la célula presentadora de antígeno *in vitro* o *in vivo*. La actividad de inducción de CTL puede medirse evaluando la producción de citocinas (por ejemplo, interferón (IFN- γ)) por CTL. Por ejemplo, la actividad de inducción de CTL puede medirse evaluando un aumento en células que producen citocinas inducidas a partir de células precursoras por células presentadoras de antígeno, tales como monocitos de sangre periférica, estimulados con el péptido de la presente divulgación, usando un inmunoensayo de alta sensibilidad conocido, tal como ensayo ELISPOT (ensayo ImmunoSpot ligado a enzimas) y ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas). La actividad citotóxica también puede medirse mediante un método conocido, tal como un método de liberación de ^{51}Cr . Cuando la actividad se aumenta significativamente, por ejemplo, en un 5% o más, un 10% o más, un 20% o más, preferiblemente un 50% o más, en comparación con el control, puede evaluarse
 20 que se ha inducido inmunidad o CTL.

4. Método para producir una célula presentadora de antígeno

25 El método para producir una célula presentadora de antígeno según la presente invención incluye una etapa de poner en contacto, por ejemplo, un péptido que contiene 8 o más residuos de aminoácido consecutivos en una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 11 y que consiste en 11 o menos, preferiblemente 10 o menos, más preferiblemente 9 o menos residuos de aminoácido en total, con una célula presentadora de antígeno *in vitro*. El péptido usado en el método de producción de la presente invención puede ser un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 11. El péptido es tal como se definió anteriormente en el presente documento.

35 Se considera que el péptido usado en el método de producción de la presente invención se une a una molécula de HLA de clase I en la superficie de la célula presentadora de antígeno, se presenta a CTL como péptido antigénico y, por tanto, induce la actividad de CTL de la célula presentadora de antígeno. Por tanto, el componente que va a ponerse en contacto con una célula presentadora de antígeno no se limita al péptido de la presente divulgación, y puede ser un componente capaz de inducir directa o indirectamente CTL, por ejemplo, un polinucleótido que codifica para el péptido o un vector que contiene el polinucleótido, o una célula presentadora de antígeno que presenta un complejo del péptido y una molécula de HLA en la superficie o un exosoma secretado de la célula presentadora de antígeno, o una combinación de los mismos. Los ejemplos de la célula presentadora de antígeno usada incluyen un macrófago y una célula dendrítica; sin embargo, es preferible usar la célula dendrítica, que tiene una alta capacidad de inducción de CTL.

45 La célula presentadora de antígeno producida mediante el método de producción de la presente invención se contempla no sólo para usarse como principio activo de la composición farmacéutica o el inductor de inmunidad sino también para usarse para inmunoterapia y similares. Por ejemplo, en un caso en el que las células presentadoras de antígeno producidas se usan para terapia con células dendríticas para el cáncer, las células pueden ponerse en contacto con células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, que tienen una baja capacidad de inducción de CTL, derivadas de un paciente que necesita inducción de inmunidad de antemano, seguido de la administración de las células presentadoras de antígeno al paciente devolviéndolas al organismo del paciente. El péptido de la presente divulgación puede introducirse en una célula presentadora de antígeno, por ejemplo, mediante transfección a través de un liposoma (un método de lipofección) o un método de inyección. Cuando se usa un polinucleótido que codifica para el péptido de la presente divulgación en una aplicación de este tipo, el polinucleótido puede introducirse en una célula presentadora de antígeno mediante una técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, una célula presentadora de antígeno derivada de un paciente puede transformarse *in vitro* usando un polinucleótido
 50 de interés o un vector que codifica para el polinucleótido mediante un método de lipofección, un método de electroporación, un método de microinyección, un método de fusión celular, un método de DEAE-dextrano, un método de fosfato de calcio, o similares.

Ejemplo 1

60 La presente invención se describirá más específicamente a continuación con referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no pretende limitarse a los mismos.

65 Específicamente, los procedimientos de predicción, experimento y evaluación en este ejemplo se llevaron a cabo basándose en el diseño de experimento de aprendizaje activo descrito en la publicación internacional n.º WO 2006/004182. Se construyó una regla repitiendo las siguientes etapas como un conjunto.

(1) Se prueba una vez un algoritmo de aprendizaje de rango bajo que se describirá a continuación en el presente documento. Es decir, se generan una pluralidad de hipótesis basándose en el remuestreo al azar a partir de datos acumulados y se elige el punto en el que la varianza de los valores predichos de puntos de consulta (péptidos) candidatos generados al azar es mayor como punto de consulta que va a someterse a experimentación.

(2) Se produce el péptido en el punto de consulta elegido mediante métodos de síntesis y purificación que se describirán a continuación en el presente documento. La capacidad de unión real se mide mediante un experimento que se describirá a continuación en el presente documento, y se añade a los datos acumulados.

La realización de un método de aprendizaje activo de este tipo pudo reducir el número de experimentos de unión que de otro modo sería necesario llevar a cabo para todas las 500 mil millones (= 20^9) o más sustancias candidatas de péptidos de unión a HLA que consisten en 9 residuos de aminoácido.

Usando la regla tal como se describió anteriormente, se extrajeron las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 11.

<Síntesis y purificación de péptidos>

Se sintetizaron manualmente los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 11 mediante el método en fase sólida de Merrifield usando Fmoc-aminoácidos. Se desprotegeron los productos resultantes y luego se sometieron a purificación mediante HPLC de fase inversa usando una columna C18 hasta una pureza del 95% o más. La identificación de los péptidos y la confirmación de la pureza de los mismos se realizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (AB SCIEX MALDI-TOF/TOF5800). La cuantificación del péptido se llevó a cabo mediante un ensayo Micro BCA (Thermo Scientific Co., Ltd.) usando BSA como proteína patrón.

<Experimento de unión del péptido a la molécula HLA-A*24:02>

Se midió la capacidad de unión de cada péptido a la molécula HLA-A*24:02 como producto del gen de HLA-A*24:02 usando células C1R-A24 que expresan la molécula HLA-A*24:02 (las células, preparadas por el Prof. Masafumi Takeguchi, Universidad de Kumamoto, se donaron amablemente por el Prof. Asoc. Masaki Yasukawa, Universidad de Ehime, con su permiso).

En primer lugar, se expusieron células C1R-A24 a condiciones ácidas de pH 3,3 durante 30 segundos para disociar y retirar los péptidos endógenos que se unieron originalmente a la molécula HLA-A*24:02 y una cadena ligera, β 2m, que comúnmente se asociaba con moléculas de HLA de clase I. Después de la neutralización, se añadió β 2m purificada a las células C1R-A24, que luego se añadió a series de dilución de los péptidos. Luego se incubó cada una de las mezclas en hielo durante 4 horas. Se tiñó el conjunto de 3 moléculas (MHC-pep) que consistía en la molécula HLA-A*24:02, el péptido y β 2m, que se habían vuelto a asociar durante la incubación, con un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia, 17A12, que reconoce el conjunto.

Posteriormente, se midió de manera cuantitativa el número de MHC-pep por célula C1R-A24 (que es proporcional a la intensidad de fluorescencia del anticuerpo fluorescente anterior) usando un analizador de células fluorescentes, FACScan (Becton, Dickinson and Company). Se calculó la constante de disociación de unión, valor Kd, entre la molécula HLA-A*24:02 y el péptido a partir de la intensidad de fluorescencia promedio por célula usando un método que se publicó en un artículo (Udaka *et al.*, Immunogenetics, 51, 816-828, 2000) por el presente inventor.

<Experimento de unión del péptido a la molécula HLA-A*02:01>

Se midió la capacidad de unión de cada péptido a la molécula HLA-A*02:01 como producto del gen de HLA-A*02:01 usando una línea celular, T2 (adquirida de ATCC), que expresa la molécula HLA-A*02:01.

Se añadieron células T2 y β 2m purificada a series de dilución por etapas de un péptido cuya capacidad de unión iba a medirse, que luego se incubaron a 37°C durante 4 horas. Se tiñó la molécula HLA-A*02:01, cuyo nivel de expresión se aumentó de manera dependiente de la concentración en este momento, con un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia específico del conjunto, BB7.2.

Después de eso, se midió la cantidad de fluorescencia por célula usando un citómetro de flujo, y se calculó la constante de disociación, valor Kd, usando un método que se publicó en un artículo por el presente inventor (Udaka *et al.*, Immunogenetics, 51, 816-828, 2000).

<Experimento de unión del péptido a la molécula HLA-A*02:06>

Se midió la capacidad de unión de cada péptido a la molécula HLA-A*02:06 como producto del gen de HLA-A*02:06 usando células RA2.6 (una línea celular recién preparada en la Universidad de Kochi) en las que el ADNc del gen de HLA-A*02:06 se introdujo en RMAS como línea celular deficiente en TAP (transportador asociado con procesamiento

antigénico) de ratón.

En primer lugar, se cultivaron las células RA2.6 durante la noche a 26°C para acumular las moléculas HLA-A*02:06 sin unir al péptido en la superficie celular. Se añadieron a las mismas series de dilución de péptidos para su unión a 26°C durante 60 minutos.

Posteriormente, se cultivó la mezcla a 35°C durante 4 horas, dando como resultado la desnaturalización de la molécula HLAA*02:06 vacía sin unir al péptido y la pérdida de su estructura estérica. Se añadió a la misma un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia, BB7.2, que reconoce específicamente una molécula HLA-A*02:06 unida a péptido, que luego se incubó en hielo durante 20 minutos para teñir las células.

Después de eso, se midió la cantidad de fluorescencia por célula usando un citómetro de flujo, y se calculó la constante de disociación, valor Kd, usando un método que se publicó en un artículo por el presente inventor (Udaka *et al.*, Immunogenetics, 51, 816-828, 2000).

<Resultados de evaluación de los experimentos de unión>

Como resultado, se obtuvieron los datos de experimentos de unión de los péptidos de la presente divulgación a cada molécula de HLA tal como se muestra en la siguiente tabla.

[Tabla 2]

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:)	Posición en GPC3	Datos de experimentos de unión		
		a A*24:02	a A*02:01	a A*02:06
MVNELFDSL (SEQ ID NO: 1)	166	-4,699595957	-5,305836823	-6,140220372
LFDSLFPVI (SEQ ID NO: 2)	170	-7,427547379	-5,06520602	> -3
SALDINECL (SEQ ID NO: 3)	190	> -3	> -3	-6,316321482
SLQVTRIFL (SEQ ID NO: 4)	222	-5,336368455	-6,210154227	-5,213788842
SLTPQAFEF (SEQ ID NO: 5)	136	-7,113561896	-4,9256496	-4,515516445
GYICSHSPV (SEQ ID NO: 6)	407	-6,548090575	> -3	> -3
ALNLGIEVI (SEQ ID NO: 7)	232	-3,956124763	-5,917879215	-4,161231756
LLQSASMEL (SEQ ID NO: 8)	92	-5,48762276	-6,136635191	-5,877071673
KLTTTIGKL (SEQ ID NO: 9)	340	-5,211802039	-4,970696549	-5,033936719
GMIKVKQL (SEQ ID NO: 10)	512	-6,904149343	-4,757453097	-3,357850496
ARLNMEQLL (SEQ ID NO: 11)	85	-5,203320264	-3,84036042	-2,764152073

Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 11 se derivan de la secuencia de longitud completa de la proteína genómica predeterminada de GPC3 registrada en GENBANK (SEQ ID NO: 12) (precursor de la isoforma 2 de glipecano-3, >gi|4758462|ref|NP_004475.1| [*Homo sapiens*]).

<Prueba de inducción de inmunidad de péptidos>

(1) Preparación de células dendríticas estimuladas con péptido

• Día 0 a 9 (inducción de células dendríticas)

De los monocitos de sangre periférica obtenidos mediante aféresis del paciente [0] tratado con terapia con células dendríticas HSP70, se cultivó una fracción de células que se adhirieron al matraz de cultivo en medio AIM-CM (nombre comercial "Gibco" de Thermo Fisher Scientific Co., Ltd.) a 37°C durante 10 días. Durante el cultivo, se añadieron 15 µl de IL-4 y 30 µl de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) al medio en el día 0 y el día 3, y se añadieron 15 µl de IL-4, 30 µl de GM-CSF y 75 µl de factor de necrosis tumoral (TNF)-α en el día 5.

• Día 10 (estimulación con péptido y recuperación de células dendríticas)

Se recuperaron de nuevo las células dendríticas inducidas en medio AIM-CM, y se añadieron cada uno de los péptidos de la presente divulgación (SEQ ID NO: 1 a 11) a 20 µg/ml. A continuación, se cultivó el medio que contenía las células dendríticas a 37°C durante 2 horas. Se usaron los siguientes péptidos como controles positivos y negativos.

5 Control positivo para HLA-A*24:02 (EBV LMP2, 419-427: TYGPVFMCL (SEQ ID NO: 13))

Control negativo para HLA-A*24:02 (HIV env gp160, 584-592: RYLRDQQLL (SEQ ID NO: 14))

10 Control positivo para HLA-A*02:01 (Flu A MP, 58-66: GILGFVFTL (SEQ ID NO: 15))

Control negativo para HLA-A*02:01 (HIV gap p17, 77-85: SLYNTVATL (SEQ ID NO: 16))

15 Control positivo para HLA-A*02:06 (EBV LMP2 453-461: LTAGFLIFL (SEQ ID NO: 17))

Control negativo para HLA-A*02:06 (HIV gap p24 341-349: ATLEEMMTA (SEQ ID NO: 18))

Se recuperaron las células dendríticas, se lavaron 3 veces o más con una cantidad suficiente de medio AIM-CM y se contaron.

20 (2) Preparación de células T CD8

• Día 0 a 9

25 De los monocitos de sangre periférica obtenidos mediante aféresis del paciente tratado 2 veces o más con la vacuna anterior, se cultivó una fracción de células flotantes (incluyendo linfocitos) que no se adhirieron al matraz de cultivo en medio AIM-CM (de GIBCO Co., Ltd.) a 37°C durante 10 días. Durante el cultivo, se añadieron 40 µl de IL-2 al medio en el día 4 y el día 6.

30 • Día 10

Usando el kit de selección negativa de CD8 (de Miltenyi Biotec), se separaron las células T CD8 del medio y se contaron.

35 (3) Cocultivo

Se cocultivaron las células dendríticas y las células T CD8 obtenidas en (1) y (2) anteriores en medio AIM a 37°C en las siguientes condiciones.

40 ○ Células T CD8: 5 x 10⁵ células/pocillo

○ Célula dendríticas: 2 x 10⁵ células/pocillo

45 • Día 12 ó 13

Al medio anterior se le añadieron 0,4 ml/pocillo de medio AIM-CM que contenía IL-2 en una cantidad de 20 U/ml.

(4) Ensayo ELISPOT

50 • Día 17

Se añadieron las células T CD8 a una placa de 96 pocillos para ELISPOT (de Millipore), se recubrieron con un anticuerpo monoclonal anti-TFN-γ (de Mabtech AB) a 2 x 10⁴ células/pocillo. Para cada muestra, se usaron 3 o más pocillos. A cada pocillo se le añadieron 100 µl de AIM-V (del nombre comercial "Gibco" de Thermo Fisher Scientific Co., Ltd.). Se cultivó la placa de 96 pocillos para ELISPOT a 37°C.

55 • Día 18

Se añadió el anticuerpo anti-TFN-γ a cada pocillo y se hizo reaccionar adicionalmente con un anticuerpo secundario marcado con la enzima HRP para medir el número de células que producen IFN-γ mediante reacción de color. Como resultados típicos del ensayo ELISPOT, aquellos para pacientes cuyo tipo de HLA era 24:02/24:02 se muestran en la figura 1; aquellos para pacientes, 02:01/24:02, en la figura 2; y aquellos para pacientes, 02:01/33:03, en la figura 3. En cada figura, se indica el promedio de 3 resultados de ensayo.

65 (5) Ensayo ELISA

• Día 17

5 Se diluyó un sobrenadante de cultivo en el día 7 después del cocultivo de células T con célula dendríticas pulsadas con cada uno de los péptidos anteriores hasta los 4 niveles de x 1, x 5, x 25 y x 125 para identificar el nivel de dilución que se encuentra dentro del límite de medición usando un conjunto ELISA MAX Deluxe para IFN- γ humano (de BioLegend Inc.). Después de eso, se midió cada muestra 3 veces al nivel de dilución identificado. Como resultados típicos del ensayo ELISA, aquellos para pacientes cuyo tipo de HLA era 24:02/26:01, aquellos para pacientes cuyo tipo de HLA era 24:02/24:02, aquellos para pacientes cuyo tipo de HLA era 11:01/24:02, aquellos para pacientes cuyo tipo de HLA era 02:01/24:02 y aquellos para pacientes cuyo tipo de HLA era 02:01/33:03, se muestran en las figuras 4 a 8, respectivamente.

15 La presente invención se ha descrito anteriormente basándose en el ejemplo. Este ejemplo es simplemente ilustrativo, y los expertos en la técnica deben entender que pueden hacerse diversas modificaciones.

Lista de secuencias

<110> NEC Corporation

20 <120> Péptidos derivados de GPC3, composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de cáncer, agente de inducción de inmunidad y método para preparar células presentadoras de antígeno

<130> 6470A98014

25 <150> Documento JP2015-46463

<151> 09-03-2015

<160> 12

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu
1 5

40

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 2

Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro Val Ile
1 5

50

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

<400> 3

Ser Ala Leu Asp Ile Asn Glu Cys Leu
1 5

60

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ser Leu Gln Val Thr Arg Ile Phe Leu
1 5

5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 5

Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
1 5

15

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 6

Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val
1 5

25

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 7

Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile
1 5

35

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu
1 5

40

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45

<400> 9

Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu
1 5

50

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55

<400> 10

Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu
1 5

ES 2 805 829 T3

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 11
 Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu
 1 5
 10
 <210> 12
 <211> 580
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 12
 Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp
 20 25 30
 Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
 35 40 45
 Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
 50 55 60
 Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
 65 70 75 80
 Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
 85 90 95
 Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
 100 105 110
 Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
 115 120 125
 Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
 130 135 140
 Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp
 145 150 155 160
 Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro
 165 170 175

ES 2 805 829 T3

Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu
180 185 190

Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe
195 200 205

Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln
210 215 220

Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile
225 230 235 240

Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu
245 250 255

Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys
260 265 270

Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly
275 280 285

Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
290 295 300

Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu
305 310 315 320

Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys
325 330 335

Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser
340 345 350

Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile
355 360 365

Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu
370 375 380

Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser
385 390 395 400

Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala
405 410 415

Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr
420 425 430

ES 2 805 829 T3

Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His
 435 440 445

Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp
 450 455 460

Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys
 465 470 475 480

Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly
 485 490 495

Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly
 500 505 510

Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr
 515 520 525

Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro
 530 535 540

Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser
 545 550 555 560

Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe
 565 570 575

Phe Leu Val His
 580

<210> 14
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

Thr Tyr Gly Pro Val Phe Met Cys Leu
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 17

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
1 5

15

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 18

Leu Thr Ala Gly Phe Leu Ile Phe Leu
1 5

25

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 19

Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer, que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 y 7 a 11, en la que el péptido es capaz de unirse a una pluralidad de alelotipos del gen A de HLA-A.
- 10 2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición está en forma de una vacuna.
- 15 3. Inductor de inmunidad para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer, que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 y 7 a 11, en el que el péptido es capaz de unirse a una pluralidad de alelotipos del gen A de HLA-A.
- 20 4. Inductor de inmunidad para su uso según la reivindicación 3, en el que el inductor es para inducir una célula T citotóxica.
5. Método para producir una célula presentadora de antígeno que tiene una actividad de inducción de CTL, que comprende una etapa de poner en contacto un péptido con una célula presentadora de antígeno *in vitro*, en el que el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 y 7 a 11, en el que el péptido es capaz de unirse a una pluralidad de alelotipos del gen A de HLA-A.

FIG.1

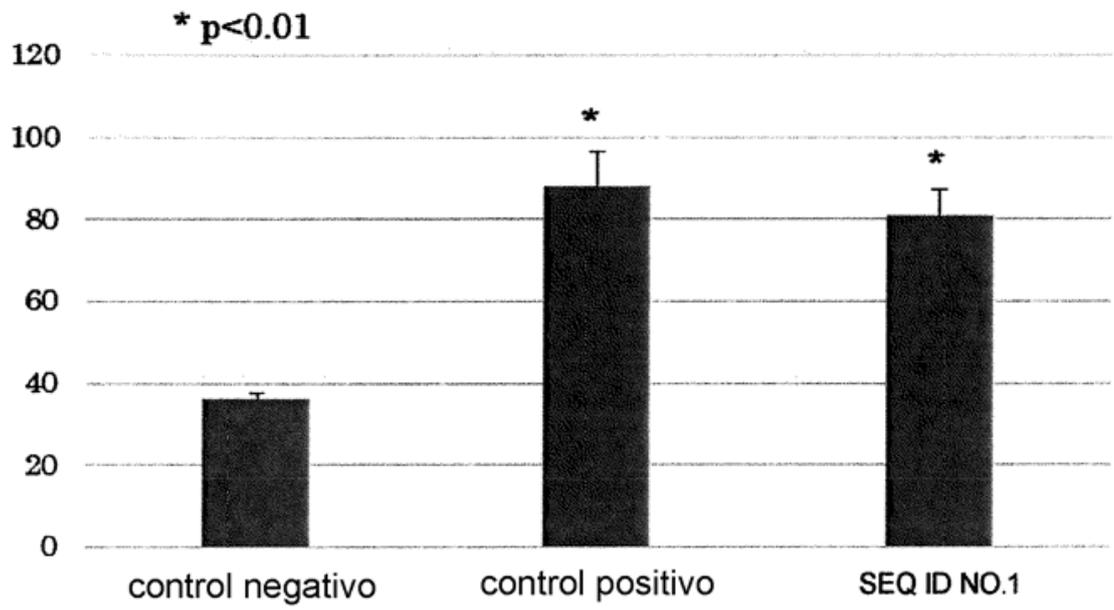


FIG.2

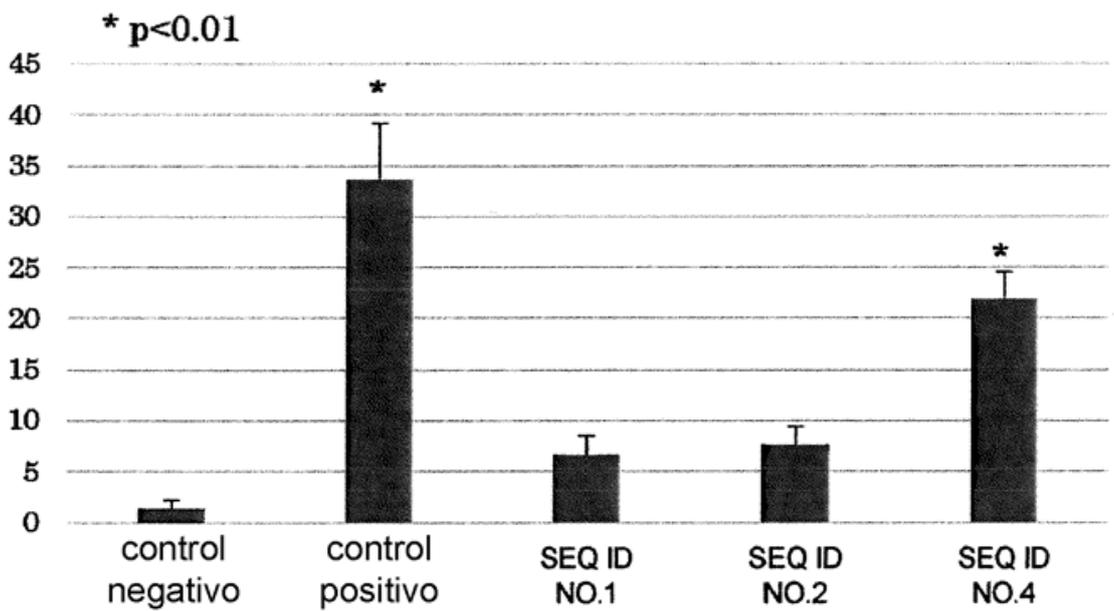


FIG.3

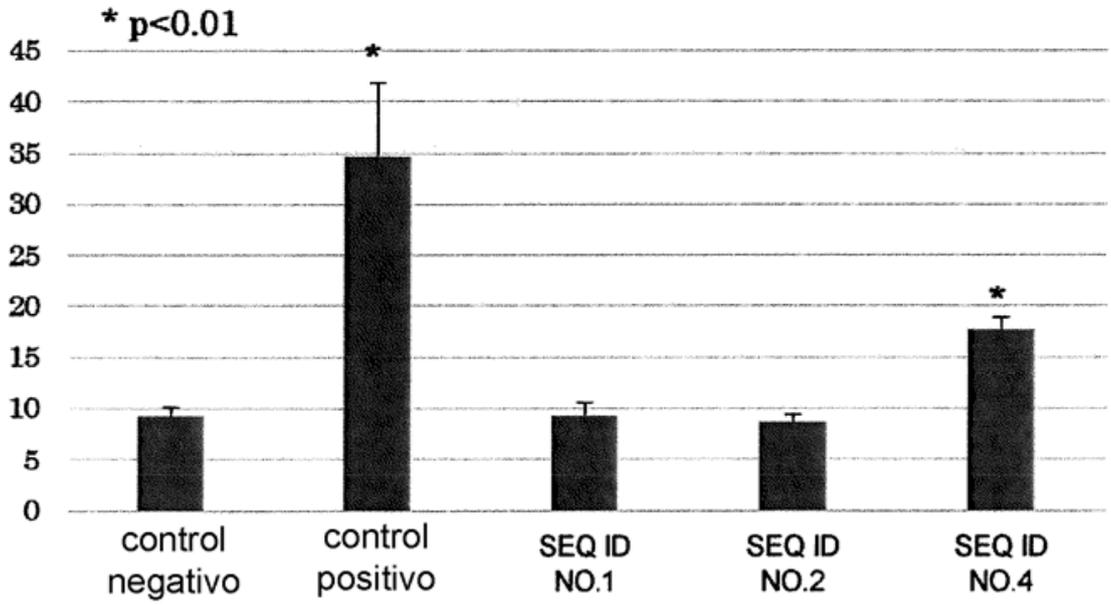


FIG.4

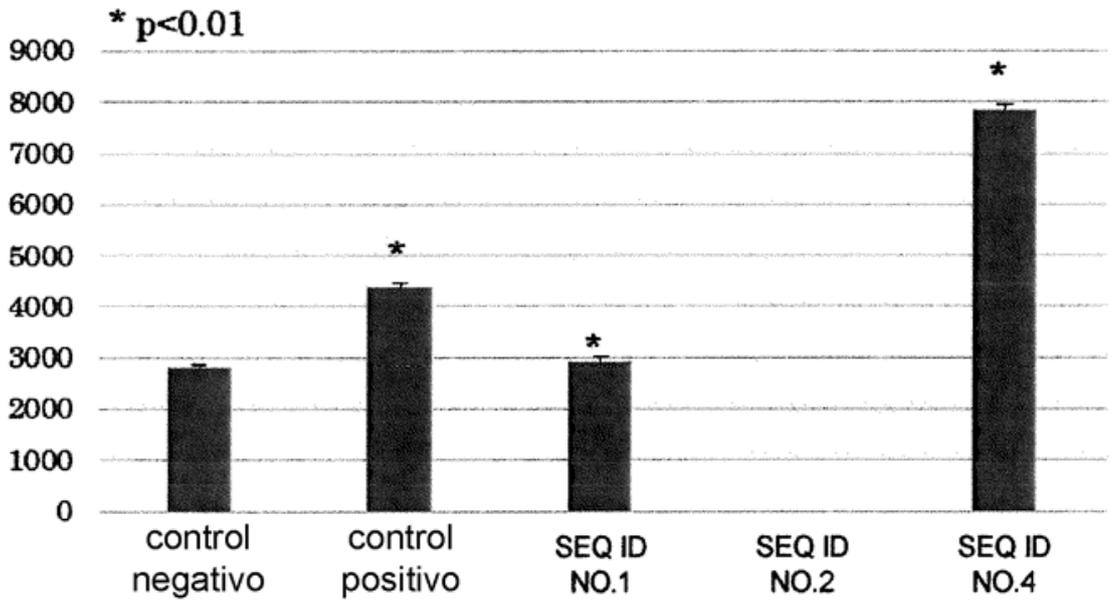


FIG.5

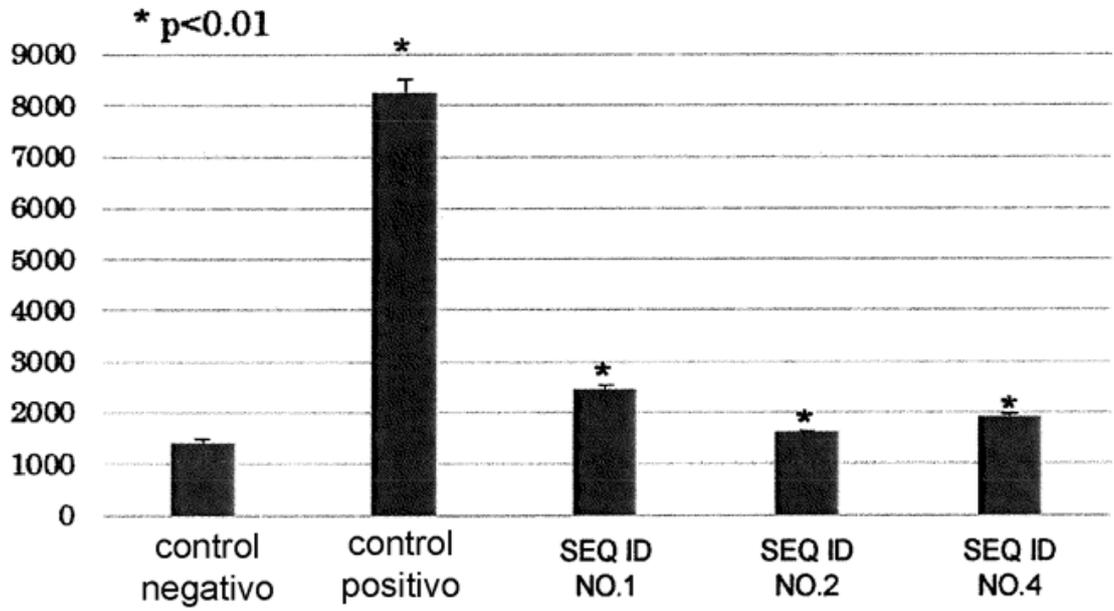


FIG.6

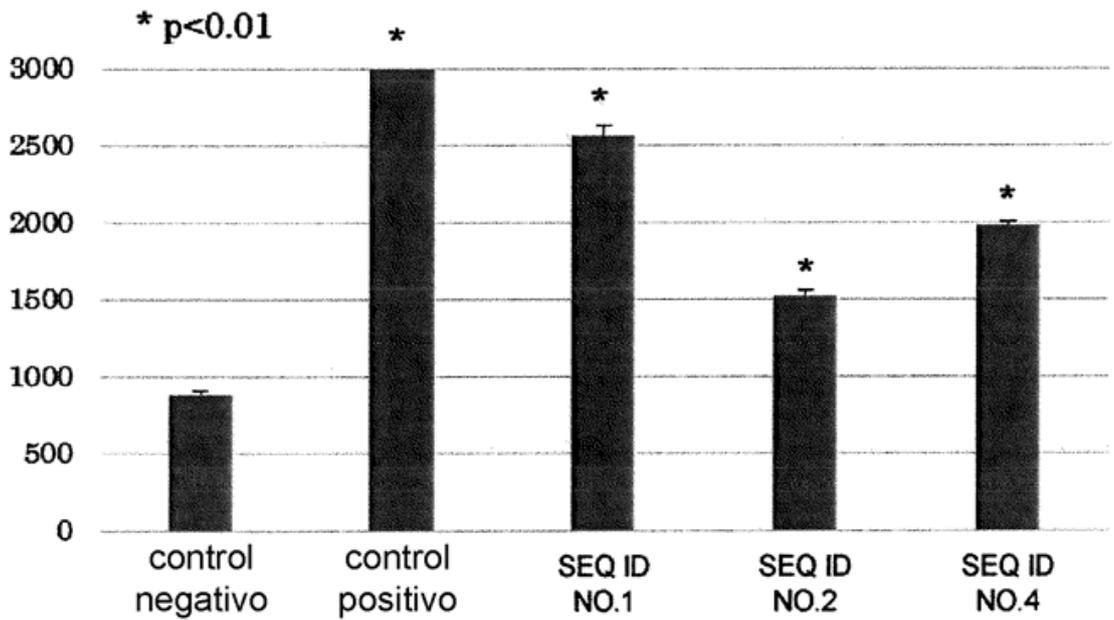


FIG.7

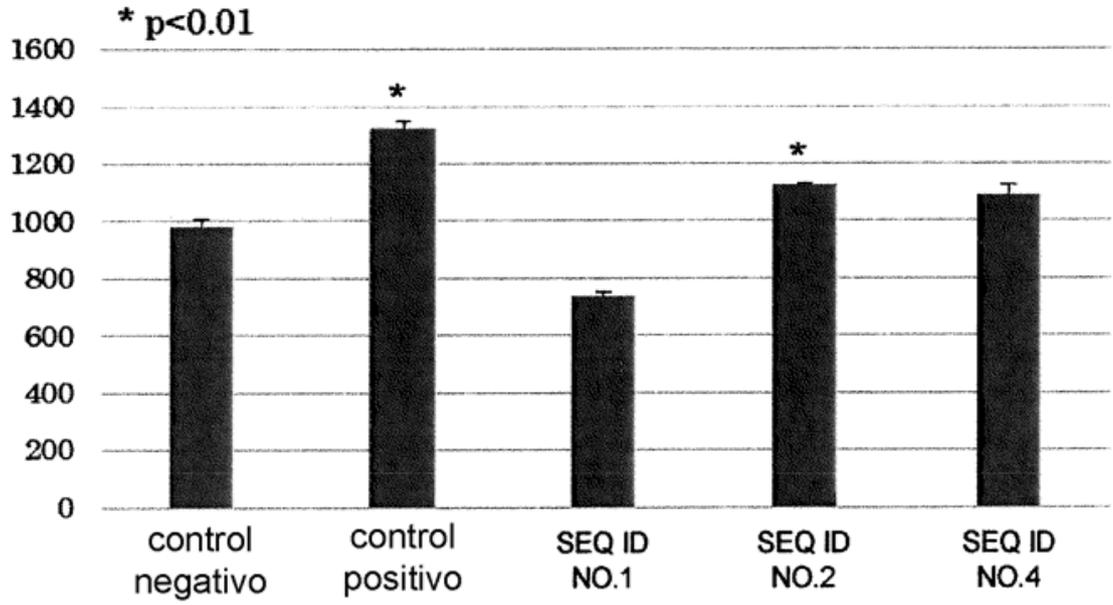


FIG.8

