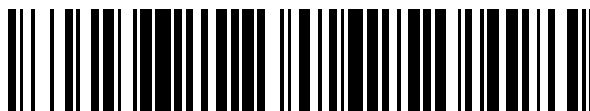


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 264**

51 Int. Cl.:
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09003839 .9**
96 Fecha de presentación: **04.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **2071028**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.2009**

54 Título: **Péptido antigénico de unión a HLA-DR derivado de WT1**

30 Prioridad:
05.11.2003 JP 2003375603

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.04.2012

73 Titular/es:
**INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER
IMMUNOLOGY, INC.
13-9, ENOKI-CHO
SUITA-SHI, OSAKA 564-0053, JP**

72 Inventor/es:
Sugiyama, Haruo

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 378 264 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 antigénico de unión a HLA-DR derivado de WT1

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a péptidos antigénicos de unión a HLA-DRB1*0405 derivados de WT 1.

10 **Técnica antecedente**

10 El gen de WT1 (gen de tumor de Wilms 1) se ha identificado como uno de los genes causales del tumor de Wilms, que es un tumor renal infantil (Cell 60: 509, 1990, Nature 343: 774, 1990). El gen de WT1 codifica el factor de transcripción WT1 que desempeña un papel importante en muchos procesos tales como proliferación, diferenciación y apoptosis de células y desarrollo de tejidos (Int. Rev. Cytol. 181: 151, 1998). El gen de WT1 se definió
15 originariamente como un gen supresor de tumores. Sin embargo, estudios posteriores pusieron de manifiesto que el gen de WT1 se expresa mucho en leucemia y diversos cánceres sólidos, incluyendo cáncer de pulmón y cáncer de mama, indicando que el gen de WT1 ejerce más bien una función oncogénica que promueve el crecimiento del cáncer. Además, se demostró que, cuando se estimularon células mononucleares de sangre periférica positivas para HLA-A*0201 o HLA-A*2402 *in vitro* con péptidos derivados de WT1, se indujeron linfocitos T citotóxicos (CTL)
20 específicos de péptido y se destruyeron células leucémicas o de tumores sólidos que expresan endógenamente WT1. Estos resultados demostraron que WT1 es una molécula diana prometedora de la inmunoterapia del cáncer (Int. J. Hematol 76: 127, 2002).

25 Se ha descrito que la presencia de células T auxiliares específicas para antígeno de cáncer es esencial para una inducción eficaz de CTL (Cancer. Res. 62: 6438, 2002).

Las células T auxiliares (células T positivas para CD4) se inducen (se hacen proliferar) y se activan cuando reconocen un complejo de molécula de MHC de clase II y péptido antigénico en células presentadoras de antígeno. Las células T auxiliares activadas producen citocinas tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 y/o interferones y median el
30 crecimiento, diferenciación y maduración de células B. Las células T auxiliares activadas también funcionan promoviendo el crecimiento, diferenciación o maduración de otros subconjuntos de células T, tales como células Tc y TD. Por lo tanto, las células T auxiliares activadas pueden activar el sistema inmune a través de la promoción del crecimiento y la activación de células B y T. Por lo tanto, se sugirió que era útil aumentar las funciones de las células T auxiliares que estaban bajo la influencia de péptido antigénico de unión a MHC-clase II (también denominado
35 "péptido auxiliar"), por lo que se aumenta la eficacia (potencia) de la vacuna contra el cáncer en la inmunoterapia del cáncer (terapia de vacuna contra el cáncer) (J. Immunother., 24: 195, 2001).

En cuanto a los péptidos derivados de WT1, sólo se conoce un péptido antigénico que se une a un subtipo de molécula de MHC de clase II, es decir, HLA-DRB1*0401 (Cancer Immunol. Immunother. 51: 271, 2002). No hay
40 péptidos derivados de WT1 que se haya descrito que se unen a subtipos diferentes.

Descripción de la invención

45 El propósito de la presente invención es proporcionar péptidos antigénicos de unión a HLA-DRB1*0405 derivados de WT1, y el uso del péptido como potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer (un agente para aumentar la eficacia de una vacuna contra el cáncer).

El presente inventor ha realizado un estudio intensivo sobre péptidos antigénicos derivados de WT1 ("péptidos auxiliares") que tienen una actividad de unión a antígeno de MHC de clase II y que aumentan la eficacia de vacunas
50 contra el cáncer (potencia) en la inmunoterapia del cáncer. En consecuencia, el presente inventor ha descubierto por primera vez que WT1 contiene una porción o porciones peptídicas antigénicas que tienen una actividad de unión a HLA-DRB1*0405 entre varias subclases de MHC de clase II e inducción de células T auxiliares. Este descubrimiento condujo al desarrollo de un nuevo método terapéutico por el que se inducen y se potencian células T auxiliares específicas de WT1 en pacientes con cáncer positivo para HLA-DRB1*0405.

55 Recientes investigaciones pusieron de manifiesto que existen péptidos auxiliares promiscuos que son péptidos auxiliares capaces de unirse a múltiples moléculas de HLA de clase II e inducir células T auxiliares positivas para CD4 (British J. cancer, 85(10), págs. 1527-1534 (2001); J. Immunol., 169 págs. 557-565 (2002)). El presente inventor realizó una investigación sobre WT1₃₃₂₋₃₄₇, que es uno de los péptidos antigénicos de unión a HLA-DRB1*0405 descritos anteriormente (péptidos auxiliares) para elucidar si es o no potencialmente un péptido auxiliar promiscuo. Como resultado, dicho péptido demostró ser un péptido auxiliar promiscuo que se une no sólo a una molécula de HLA-DRB1*0405 sino también a HLA-DRB1*1502. Por lo tanto, el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ de la presente invención es un péptido auxiliar aplicable a pacientes que tienen HLA-DRB1*1502, así como a los que tienen HLA-DRB1*0405. El presente inventor también descubrió que WT1 contiene una porción o porciones de péptido
60 antigénico capaces de unirse a HLA-DRB1*1502, una de varias subclases de MHC de clase II, e inducir células T auxiliares por primera vez.

La presente invención se ha establecido basándose en estos descubrimientos.

La presente invención incluye lo siguiente.

- 5 (1) Un péptido que consiste en 10-25 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de WT1 humano mostrada en la SEC ID N°: 1, que se une a HLA-DRB1*0405 e induce células T auxiliares.
- (2) El péptido del (1) anterior, que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 2-23.
- 10 (3) El péptido del (2) anterior, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24.
- (4) Un péptido de 10-25 aminoácidos, que comprende una secuencia de aminoácidos en la que el resto aminoacídico en la posición 1, 4, 6 y/o 9 de una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 2-23 se sustituye por otro resto aminoacídico, y que se une a un HLA-DRB1*0405 e induce células T auxiliares.
- 15 (5) El péptido del (4) anterior, que comprende una secuencia de aminoácidos en la que el resto aminoacídico en la posición 1, 4, 6 y/o 9 de una secuencia de aminoácidos expuesta en uno cualquiera de las SEC ID N°: 2-23 se sustituye por un resto aminoacídico seleccionado de los aminoácidos siguientes:
- fenilalanina, tirosina, triptófano, valina, isoleucina, leucina y metionina para la posición 1;
 valina, isoleucina, leucina, metionina, ácido aspártico y ácido glutámico para la posición 4;
 20 asparagina, serina, treonina, glutamina, lisina y ácido aspártico para la posición 6; y
 ácido aspártico, ácido glutámico y glutamina para la posición 9.
- (6) El péptido del (5) anterior, que comprende una secuencia de aminoácidos en la que el resto aminoacídico en la posición 3, 6, 8 y/u 11 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24 se sustituye por un resto aminoacídico seleccionado de los aminoácidos siguientes:
- 25 fenilalanina, triptófano, valina, isoleucina, leucina y metionina para la posición 3;
 valina, isoleucina, metionina, ácido aspártico y ácido glutámico para la posición 6;
 asparagina, serina, treonina, glutamina, lisina y ácido aspártico para la posición 8; y
 30 ácido aspártico, ácido glutámico y glutamina para la posición 11.
- (7) Un péptido que consiste en 10-25 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de WT1 humano mostrada en la SEC ID N°: 1, que se une HLA-DRB1*1502 e induce células T auxiliares.
- 35 (8) El péptido del (7) anterior, que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 46-56.
- (9) El péptido del (7) anterior, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24.
- (10) Un péptido que comprende un péptido descrito en uno cualquiera del (1) al (9) anteriores, junto con un péptido antigénico de cáncer.
- 40 (11) Un polinucleótido que codifica un péptido descrito en uno cualquiera del (1) al (10) anteriores.
- (12) Un vector de expresión que contiene el polinucleótido descrito en el (11) anterior.
- (13) Una célula que contiene el vector de expresión descrito en el (12) anterior.
- (14) Un proceso para producir un péptido descrito en uno cualquiera del (1) al (10) anteriores, que comprende cultivar la célula descrita en el (13) anterior en la condición en la que puede expresarse el péptido.
- 45 (15) Un anticuerpo que se une específicamente a un péptido descrito en uno cualquiera del (1) al (9) anteriores.
- (16) Una composición farmacéutica que comprende un péptido descrito en uno cualquiera del (1) al (10) anteriores, un vector de expresión descrito en el (12) anterior o una célula descrita en el (13) anterior, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- (17) La composición farmacéutica del (16) anterior, que es un agente terapéutico o preventivo para el cáncer.
- 50 (18) La composición farmacéutica del (16) anterior, que es un inductor de células T auxiliares, y que comprende un péptido descrito en uno cualquiera del (1) al (9) anterior; un vector de expresión descrito en el (12) relacionado con un péptido de uno cualquiera del (1) al (9) anteriores; o una célula descrita en el (13) anterior relacionada con un péptido de uno cualquiera del (1) al (9) anteriores, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- (19) La composición farmacéutica del (16) anterior, que es un potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer, y que comprende un péptido descrito en uno cualquiera del (1) al (9) anterior; un vector de expresión descrito en el (12) relacionado con un péptido de uno cualquiera del (1) al (9) anterior; o una célula descrita en el (13) anterior relacionada con un péptido de uno cualquiera del (1) al (9) anterior, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 (20) La composición farmacéutica del (16) anterior, que es un agente terapéutico o preventivo para el cáncer y que comprende un péptido descrito en el (10) anterior; un vector de expresión descrito en el (12) relacionado con un péptido del (10) anterior; o una célula descrita en el (13) anterior relacionada con un péptido del (10) anterior, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 60 (21) Uso de un péptido descrito en uno cualquiera del (1) al (10) anteriores, un vector de expresión descrito en el (12) anterior o una célula descrita en el (13) anterior, para la fabricación de un agente terapéutico o preventivo para el cáncer.
- 65

(22) Un procedimiento de tratamiento o prevención del cáncer, que comprende administrar un péptido descrito en uno cualquiera del (1) al (10) anterior, un vector de expresión descrito en el (12) anterior o una célula descrita en el (13) anterior, a un sujeto que lo necesite.

(23) Una composición farmacéutica que comprende un péptido descrito en uno cualquiera del (1) al (9) anteriores en combinación con un péptido antigénico de cáncer.

(24) La composición farmacéutica del (23) anterior, que se usa para tratar o prevenir el cáncer.

(25) Un kit para tratar o prevenir el cáncer, que comprende una composición farmacéutica que comprende un péptido de uno cualquiera del (1) al (9) anteriores en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y una composición farmacéutica que comprende un péptido antigénico de cáncer en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

(26) Uso de un péptido de uno cualquiera del (1) al (9) anteriores en combinación con un péptido antigénico de cáncer en la fabricación de un agente terapéutico o preventivo para el cáncer.

(27) Un método de tratamiento o prevención del cáncer, que comprende administrar un péptido de uno cualquiera del (1) al (9) anteriores en combinación con un péptido antigénico de cáncer a un sujeto que lo necesite.

La presente invención proporciona un péptido antigénico de unión a HLA-DRB1*0405 derivado de WT1, un polinucleótido que codifica el péptido, un inductor de células T auxiliares ("inductor de células T auxiliares") que comprende dicho péptido o polinucleótido, y similares. El inductor de células T auxiliares de la presente invención es útil como potenciador de la eficacia de la vacuna contra el cáncer. El potenciador de la eficacia de la vacuna contra el cáncer de la presente invención es aplicable a muchos pacientes positivos para HLA-DRB1*0405 y es particularmente útil para aumentar la eficacia de la vacuna de WT1.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados del examen sobre sensibilidad de células T positivas para CD4 (células T auxiliares) estimuladas con un péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ derivado de WT1 a diversas células dendríticas. En la figura, la expresión "Sin tratar" representa la sensibilidad a células dendríticas no estimuladas con un péptido; "PHA" los resultados del examen en el que células T positivas para CD4 se trataron con PHA en lugar de células dendríticas, la "estimulación con WT1₁₇₂₋₁₈₆" la sensibilidad a células dendríticas estimuladas con péptido WT1₁₇₂₋₁₈₆, la "estimulación con WT1₂₂₅₋₂₄₃" la sensibilidad a células dendríticas estimuladas con péptido WT1₂₂₅₋₂₄₃, y la "estimulación con WT1₃₃₂₋₃₄₇" la sensibilidad a células dendríticas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇. El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por células T positivas para CD4.

La Figura 2 muestra los resultados del examen sobre la sensibilidad de líneas celulares G2 a células dendríticas estimuladas con un péptido WT1₃₃₂₋₄₃₇ derivado de WT1. En la figura, la expresión "Sin tratar" representa los resultados obtenidos usando células dendríticas no estimuladas con un péptido; y la expresión "estimulación con WT1₃₃₂₋₃₄₇" los resultados obtenidos usando células dendríticas estimuladas con WT1₃₃₂₋₃₄₇. El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por líneas celulares G2.

La Figura 3 muestra los resultados del examen sobre la sensibilidad de la línea celular G2 a células B-LCL(+) que expresan el gen de WT1. En la figura, "B-LCL(-)" representa los resultados obtenidos usando células B-LCL(-) que no expresan gen de WT1, "B-LCL(+)" los resultados obtenidos usando células B-LCL(+) que expresan gen de WT1 y "B-LCL(+) + anticuerpo anti-HLA-DR" los resultados obtenidos usando células B-LCL(+) con anticuerpo anti-HLA-DR. El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por líneas celulares G2.

La Figura 4 muestra los resultados del examen sobre la sensibilidad de la línea celular E04.1 a células dendríticas estimuladas con un péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ derivado de WT1. En la figura, "-" representa los resultados obtenidos usando células dendríticas no estimuladas con un péptido, y "332" los resultados obtenidos usando células dendríticas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇. El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por líneas celulares E04.1.

La Figura 5 muestra los resultados del examen sobre la sensibilidad de la línea celular E04.1 a células estimuladas que se habían estimulado con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ derivado de WT1 y después tratadas con diversos anticuerpos inhibidores anti-HLA. Las células estimuladas usadas eran células B-LCL(-), que es una línea celular B establecida a partir de sangre de un voluntario sano positivo para HLA-DRB1*0405 como se muestra a continuación en la presente memoria en el Ejemplo 3. En la figura, "-" representa los resultados obtenidos usando células estimuladas no estimuladas con un péptido, y "332" los resultados obtenidos usando células estimuladas tratadas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇. Además, "332+ α -clase I" representa los resultados obtenidos usando células estimuladas tratadas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ y anticuerpo anti-HLA-clase I, "332+ α -DR" los resultados obtenidos usando células estimuladas tratadas con el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ y anticuerpo anti-HLA-DR, "332+ α -DQ" los resultados obtenidos usando células estimuladas tratadas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ y anticuerpo anti-HLA-DQ. Además, "332-mIgG" representa los resultados obtenidos usando células estimuladas tratadas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ y anticuerpo anti-IgG de ratón como control negativo para anticuerpo inhibidor. El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por líneas celulares E04.1.

La Figura 6 muestra los resultados del examen sobre la sensibilidad de la línea celular E04.1 a PBMC positivas o negativas para HLA-DRB1*0405 estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ derivado de WT1. En la figura, "-" representa los resultados obtenidos usando PBMC no estimuladas con un péptido, y "332" los resultados obtenidos usando PBMC estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇. Los genotipos de HLA-DRB1 de los donantes

respectivos eran los siguientes. Donante 1 (HLA-DRB1*0405/0803), Donante 2 (HLA-DRB1*0405/0101), Donante 3 (HLA-DRB1*0101/1001) y Donante 4 (HLA-DRB1*1201/0802). El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por líneas celulares E04.1.

La Figura 7 muestra los resultados del examen sobre la sensibilidad de la línea celular E04.1 a células B-LCL(+) que expresan el gen de WT1. En la figura, "B-LCL(-)" representa los resultados obtenidos usando células B-LCL(-) que no expresan el gen de WT1 como células estimuladas, y "B-LCL(+)" los resultados obtenidos usando células B-LCL(+) que expresan gen de WT1 como células estimuladas. El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por líneas celulares E04.1.

La Figura 8 muestra los resultados del examen sobre la sensibilidad de la línea celular E04.1 a células dendríticas estimuladas con células B-LCL(+) en las que se ha inducido apoptosis. En la figura, "B-LCL(+) apoptóticas" representa los resultados obtenidos usando células dendríticas estimuladas con células B-LCL(+) que expresan gen de WT1 y en las que se ha inducido apoptosis, y "B-LCL(-) apoptóticas" representa los resultados obtenidos usando células dendríticas estimuladas con células B-LCL(-) que no expresan gen de WT1 y en la que se ha inducido apoptosis. Además, "E04.1+" representa los resultados obtenidos por cocultivo de células E04.1 con células dendríticas, y "E04.1-" los resultados obtenidos por cocultivo sin células E04.1. El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por líneas celulares E04.1.

La Figura 9 muestra los resultados del examen sobre la producción de citocinas de líneas celulares E04.1 contra células dendríticas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ derivado de WT1. En la figura, "-" representa los resultados obtenidos usando células dendríticas no estimuladas con un péptido, y "332" los resultados obtenidos usando células dendríticas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇. El eje vertical indica el porcentaje (%) de células E04.1 que muestran la producción de IL-4 (barra en blanco) o IFN- γ (barra rellena).

La Figura 10 muestra los resultados del análisis de la línea celular E04.1 teñida con anticuerpo anti-CD4 y anticuerpo anti-CXCR3 mediante citómetro de flujo. En la figura, los ejes horizontal y vertical indican células positivas para CD4 y para CXCR3, respectivamente. El porcentaje de células positivas para tanto CD4 como CXCR3 era del 90,1%.

La Figura 11 muestra los resultados del examen sobre la influencia de péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ derivado de WT1 sobre la inducción de CTL específicos de WT1. Se cultivaron PBMC originadas en un voluntario sano (HLA-A*2402/1101, DRB1*0405/0803) durante 7 días en las condiciones de estimulación de (A) péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃, (B) péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ + péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇, (C) péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ + células E04.1 y (D) péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ + péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ + células E04.1. Después, la mitad de las células recuperadas se analizaron con citómetro de flujo para obtener el porcentaje de precursores de CTL específicos de WT1₂₃₅₋₂₄₃. Los ejes horizontal y vertical indican el porcentaje de células positivas para CD8 y para péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃/HLA-A*2402, respectivamente.

La Figura 12 muestra los resultados del examen sobre la influencia de péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ derivado de WT1 sobre la activación de CTL específicos de WT1. Otra mitad de las células recuperadas en el experimento mencionado en la Figura 11 se estimularon con péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ durante 6 horas y se teñió el IFN- γ intracelular. Los ejes vertical y horizontal indican las células positivas para IFN- γ intracelular y para anticuerpo anti-IgG de ratón, respectivamente. La figura muestra los resultados de la estimulación con (E) péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃, (F) péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ + péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇, (G) péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ + células E04.1, (H) péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ + péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ + células E04.1.

La Figura 13 muestra los resultados del examen sobre la sensibilidad de células T positivas para CD4 estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ derivado de WT1 con diversas células dendríticas. En la figura, "-" representa la sensibilidad con células dendríticas no estimuladas con un péptido, "332" la sensibilidad con células dendríticas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇, "172" la sensibilidad con células dendríticas estimuladas con péptido WT1₁₇₂₋₁₈₆ y "225" la sensibilidad con células dendríticas estimuladas con péptido WT1₂₂₅₋₂₄₃. El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por células T positivas para CD4. El símbolo "****" y "n.s." significan que la diferencia en los grupos de ensayo es estadísticamente significativa o no lo es, respectivamente.

La Figura 14 muestra los resultados del análisis del repertorio de células T de células T positivas para CD4 estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ derivado de WT1. Las células se teñieron con diferentes anticuerpos específicos para las cadenas V β respectivas de TCR, y se analizaron por citometría de flujo. En el panel superior, la población celular en la porción derecha inferior del área dividida en cuatro partes representa células positivas para V β 3. En el panel inferior, la población celular en la porción derecha inferior del área dividida en cuatro partes representa células positivas para V β 20.

La Figura 15 muestra los resultados del examen sobre la sensibilidad de la línea celular E15.1 o la línea celular E15.2 a PBMC autólogas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ derivado de WT1. En la figura, "-" representa los resultados obtenidos usando PBMC autólogas no estimuladas con un péptido, y "332" los resultados obtenidos usando PBMC autólogas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇. El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por líneas celulares separadas. A) y B) muestran los resultados obtenidos usando la línea celular E15.1 y la línea celular E15.2, respectivamente. El símbolo "****" significa que la diferencia en los grupos de ensayo es estadísticamente significativa.

La Figura 16 muestra los resultados del examen sobre la producción de citocinas de la línea celular E15.2 contra PBMC autólogas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ derivado de WT1. En la figura, "-" representa los resultados obtenidos usando células dendríticas no estimuladas con un péptido, y "332" los resultados obtenidos usando PBMC autólogas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇. El eje vertical indica el porcentaje (%) de células E15.2 que muestran la producción de IL-4 (barra en blanco) o IFN- γ (barra rellena).

La Figura 17 muestra los resultados del examen sobre la relación entre la concentración de péptido WT1³³²⁻³⁴⁷ derivado de WT1 estimulado en PBMC autólogas y la sensibilidad de la línea celular E15.2. El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por líneas celulares E15.1. El eje horizontal indica la concentración de péptido WT1³³²⁻³⁴⁷ estimulado en PBMC autólogas.

La Figura 18 muestra los resultados del examen sobre la sensibilidad de la línea celular E15.2 a PBMC positivas o negativas para HLA-DRB1*1502 estimuladas con péptido WT1³³²⁻³⁴⁷ derivado de WT1. En la figura, “-” representa los resultados obtenidos usando PBMC no estimuladas con el péptido WT1³³²⁻³⁴⁷, y “332” los resultados obtenidos usando PBMC estimuladas con el péptido. A) muestra los resultados obtenidos usando PBMC de un voluntario sano positivo para HLA-DRB1*1502 y B) los resultados obtenidos usando PBMC de un voluntario sano negativo para HLA-DRB1*1502. El eje vertical indica la cantidad de captación de [³H]-timidina (cpm) por líneas celulares E15.2. El símbolo “***” y “n.s.” significan que la diferencia en los grupos de ensayo es o no estadísticamente significativa, respectivamente.

Mejor modo de realizar la invención

La presente invención proporciona un péptido que consiste en 10-25 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de WT1 humano expuesta en la SEC ID N^o: 1, uniéndose dicho péptido a HLA-DRB1*0405 e induciendo células T auxiliares. La presente invención incluye péptidos en los que el resto aminoacídico N-terminal y/o C-terminal está modificado, o aquellos en los que un resto o restos aminoacídicos particulares están alterados.

En lo sucesivo, “un péptido que induce células T auxiliares (o un péptido que induce células T positivas para CD4)” puede denominarse “un péptido auxiliar”.

La secuencia de aminoácidos de WT1 humano expuesta en la SEC ID N^o: 1 es una secuencia conocida como se describe en Cell, 60: 509, 1990, y en la base de datos del NCBI (N^o de Acceso XP_034418 y P19544).

El péptido de la presente invención es un péptido parcial que consiste en 10-25 aminoácidos contiguos presentes en la secuencia de aminoácidos de WT1 humano expuesta en la SEC ID N^o: 1. La definición de “10-25 aminoácidos” se basa en los hechos de que péptidos que tienen una actividad de unión a MHC de clase II consisten generalmente en 10 a 25 aminoácidos (Immunogenetics, 41: 178-228, 1995, Biochimica et Biophysica Acta 1316, 85-101 (1996), Immunology, 96, 1-9 (1999), Peptides, Vol. 19, 179-198 (1998), Immunobiology, 5^a Ed., 116-117, Garland Publishing (2001)). Los péptidos preferidos son los que consisten en 13-17 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de WT1 humano.

El péptido de la presente invención puede identificarse por síntesis de un péptido (péptido candidato) que consiste en 10-25 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N^o: 1, y ensayo de si el péptido es o no capaz de unirse a HLA-DRB 1*0405 e inducir células T auxiliares.

La síntesis de un péptido puede realizarse de acuerdo con procesos usados en general en el campo de la química de péptidos. Dicho método puede encontrarse en bibliografías que incluyen Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., Nueva York, 1976; Peptide Synthesis, Maruzen, Inc., 1975; Peptide-Gosei no Kiso to Jikken, Maruzen, Inc., 1985; e *Iyakuhin no Kaihatsu* (Zoku), Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa-syoten, 1991.

Puede examinarse si un péptido candidato se une o no a HLA-DRB1*0405 e induce células T auxiliares usando un método descrito en, por ejemplo, Cancer. Immunol. Immunother. 51: 271 (2002), el método descrito en los Ejemplos de trabajo, o el método descrito justo a continuación.

En concreto, se preparan células dendríticas (células adherentes) por aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de un sujeto humano positivo para HLA-DRB1*0405, y eliminación de las células no adherentes. Por separado, se preparan células T auxiliares (células T positivas para CD4) a partir del mismo sujeto positivo para HLA-DRB1*0405 mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque, y así sucesivamente.

Las células dendríticas descritas anteriormente se cultivan después de la adición de un péptido candidato, y se cultivan adicionalmente con las células T auxiliares descritas anteriormente. Las células T auxiliares se recuperan después y se estimulan varias veces con células dendríticas estimuladas con el péptido candidato de una forma similar. Es posible evaluar si se inducen (activan) o no células T auxiliares en respuesta a la estimulación con un péptido por medición, por ejemplo, de (1) la actividad de crecimiento de células T auxiliares o (2) la actividad de producción de citocinas de células T auxiliares. En concreto, la actividad de crecimiento (1) puede examinarse midiendo la cantidad de captación de [³H]-timidina por células T auxiliares. La actividad de producción de citocinas (2) puede examinarse midiendo la cantidad de citocinas, tales como el IFN- γ producido por células T auxiliares activadas, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o similar.

La secuencia de aminoácidos de péptidos antigénicos que se unen a una molécula de MHC de clase I o MHC de clase II y que se presentan sigue cierta regla (motivo de unión). Hay restos aminoacídicos terminales en ambos

extremos de los péptidos que se unen a una molécula de MHC de clase I que desempeñan un papel significativo en la unión con una molécula de MHC de clase I; sin embargo, no hay aminoácidos de este tipo en ningún extremo de los péptidos que se unen a una molécula de MHC de clase II, y los aminoácidos terminales no se unen a la molécula de MHC de clase II. Dicho péptido se aloja y se inmoviliza (fija) más bien en una hendidura de unión a péptido longitudinalmente. La inmovilización de un péptido en una hendidura de unión a péptido puede conseguirse mediante la unión de las cadenas laterales de aminoácidos que constituyen el péptido a la hendidura de unión a péptido y la unión de la cadena principal del péptido a las cadenas laterales de los aminoácidos bien conservados en la totalidad de la hendidura de unión a péptido para moléculas de MHC de clase II. Una hendidura de unión a péptido tiene bolsillos pequeños o grandes y existe un polimorfismo de aminoácidos en los restos aminoacídicos que constituyen los bolsillos dependiendo de la molécula de MHC de clase II.

La cristalografía de rayos X obtenida hasta ahora puso de manifiesto que las cadenas laterales de los restos aminoacídicos en las posiciones 1, 4, 6 y 9 del péptido de unión a MHC de clase II más pequeño se acoplan con estos bolsillos de unión.

El motivo aminoacídico de los péptidos que se unen a un bolsillo o bolsillos de una hendidura de unión a péptido puede estimarse por análisis del patrón de restos aminoacídicos comúnmente encontrado en los péptidos de unión para las moléculas de MHC de clase II respectivas originadas en diferentes alelos. Se considera que, debido a que los péptidos de aproximadamente 9 aminoácidos que tienen dicho motivo se alojan en la hendidura de unión a péptido de tal forma que ambos extremos terminales sobresalen de ambos sitios de la hendidura, básicamente no existen limitaciones respecto a la longitud de los péptidos que pueden unirse a moléculas de MHC de clase II. Sin embargo, en muchos casos, un péptido largo se escinde en péptidos de 13-17 aminoácidos de longitud por peptidasas (Immunobiology, 5ª Ed., 116-117, Garland Publishing (2001)).

Respecto al péptido que tiene la actividad de unión por HLA-DRB1*0405, se espera que los aminoácidos en las posiciones 1, 4, 6 y 9 en el dominio de unión a HLA (MHC) que consiste en 9 aminoácidos tengan las regularidades (motivos) siguientes (Immunogenetics, 41, 178-228 (1995), Biochimica et Biophysica Acta 1316, 85-101 (1996)).

Posición 1: fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), valina (V), isoleucina (I), leucina (L) y metionina (M).
 Posición 4: valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E).
 Posición 6: asparagina (N), serina (S), treonina (T), glutamina (Q), lisina (K) y ácido aspártico (D).
 Posición 9: ácido aspártico (D), ácido glutámico (E) y glutamina (Q).

Recientemente, se ha hecho posible buscar secuencias peptídicas que se espera que se unan a un antígeno de MHC de clase II usando un *software* para predecir péptidos de unión a MHC de clase II (Propred, Bioinformatics 18: 1236, 2001).

La presente invención se basa en el descubrimiento de que WT1 (SEC ID N°: 1) contiene porciones de péptidos antigénicos que se unen a HLA-DRB1*0405 (una clase de MHC de clase II) e inducen células T auxiliares por primera vez. Los ejemplos de supuestas porciones de 9 aminoácidos de unión a HLA-DRB1*0405 en la secuencia de aminoácidos de dicho WT1 incluyen las porciones de 9 aminoácidos derivadas de WT1 que se muestran en las SEC ID N°: 2-23. Por lo tanto, como una realización específica del péptido de la presente invención, la presente invención proporciona un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 2-23, y que se une a HLA-DRB1*0405 e induce células T auxiliares.

No existen limitaciones respecto a la longitud de dicho péptido con la condición de que dicho péptido sea un péptido parcial de WT1 y comprenda una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 2-23, y tenga una actividad de unión a HLA-DRB1*0405 e inducción de células T auxiliares. Como se ha mencionado anteriormente, un péptido de aproximadamente 9 aminoácidos con un motivo de unión puede alojarse en una hendidura de unión a péptido, sobresaliendo ambos extremos de ambos sitios de la hendidura y, por lo tanto, esencialmente no existen limitaciones respecto a la longitud de los péptidos capaces de unirse a una molécula de MHC de clase II. Sin embargo, los péptidos largos se escinden generalmente por peptidasas, y los péptidos de unión a MHC de clase II que se han descrito hasta ahora son de aproximadamente 10-25 aminoácidos de longitud (Immunogenetics, 41, 178-228 (1995), Biochimica et Biophysica Acta 1316, 85-101 (1996), Immunology, 96, 1-9 (1999), Peptides, Vol.19, 179-198 (1998), Immunobiology, 5ª Ed., 116-117, Garland Publishing (2001)). Teniendo esto en cuenta, los péptidos de la presente invención consisten preferentemente en aproximadamente 10-25 aminoácidos y, más preferentemente, aproximadamente 13-17 aminoácidos.

Por consiguiente, los ejemplos de una realización preferida del péptido de la presente invención que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 2-23 incluyen péptidos parciales derivados de WT1 que consisten en 10-25 aminoácidos (preferentemente, 13-17 aminoácidos), que comprenden una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 2-23 y que tienen una actividad de unión a HLA-DRB1*0405 e inducción de células T auxiliares.

Los ejemplos de realizaciones más preferidas incluyen péptidos parciales derivados de WT1 que consisten en 10-25 aminoácidos (preferentemente, 13-17 aminoácidos), que comprenden una secuencia de aminoácidos expuesta en la

SEC ID N°: 12, y que tienen una actividad de unión a HLA-DRB1*0405 e inducción de células T auxiliares. Los ejemplos de realizaciones todavía más preferidas incluyen péptidos parciales derivados de WT1 que consisten en 16-25 aminoácidos (preferentemente, 16-17 aminoácidos), que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24 y que tienen una actividad de unión a HLA-DRB1*0405 e inducción de células T auxiliares. La secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24 representa un péptido parcial de 16 aminoácidos derivado de WT1 e incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 12.

La realización preferida adicional es el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24.

Los péptidos de la presente invención pueden alterarse según sea apropiado dentro de un intervalo en el que se mantiene la actividad. Como se usa en la presente memoria, la "alteración" de un resto aminoacídico significa una sustitución, deleción y/o adición de un resto o restos aminoacídicos (la adición incluye la adición de un aminoácido o aminoácidos en el extremo N- y/o C-terminal de un péptido). Se prefiere la sustitución de un resto o restos aminoacídicos. Cuando la alteración implica la sustitución de un resto o restos aminoacídicos, cualquier número de restos aminoacídicos en cualquier posición puede sustituirse con la condición de que se conserve la actividad como péptido auxiliar. Sin embargo, puesto que un péptido que se une a una molécula de HLA clase II es generalmente de aproximadamente 10-25 aminoácidos de longitud, la alteración implica preferentemente uno a varios aminoácidos.

Cuando se altera un resto aminoacídico por sustitución, se prefiere que se sustituya el resto aminoacídico en la posición 1, 4, 6 y/o 9 de un péptido de 9 aminoácidos que tiene la estructura para el motivo de unión de HLA-DRB1*0405.

Los ejemplos específicos de péptidos relacionados con sustitución de la presente invención incluyen péptidos de 10-25 aminoácidos, que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que el resto aminoacídico en la posición 1, 4, 6, y/o 9 de una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 2-23 se sustituye por otro resto aminoacídico, y que se unen a un HLA-DRB1*0405 e inducen células T auxiliares.

Los ejemplos preferidos incluyen péptidos de 10-25 aminoácidos, que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que el resto aminoacídico en la posición 1, 4, 6, y/o 9 de una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 2-23 se sustituye por un resto aminoacídico seleccionado de los aminoácidos siguientes:

fenilalanina, tirosina, triptófano, valina, isoleucina, leucina y metionina para la posición 1; valina, isoleucina, leucina, metionina, ácido aspártico y ácido glutámico para la posición 4; asparagina, serina, treonina, glutamina, lisina y ácido aspártico para la posición 6; y ácido aspártico, ácido glutámico y glutamina para la posición 9, y que se unen a un HLA-DRB1*0405 e inducen células T auxiliares.

Por ejemplo, la sustitución de un resto aminoacídico en la posición 1, 4, 6 y/o 9 puede realizarse con el fin de mejorar la actividad de unión a HLA-DRB1*0405 o aumentar la actividad de los péptidos auxiliares de tipo natural mencionados anteriormente de la presente invención, que consisten en secuencias parciales de WT1. Las partes distintas del aminoácido sustituido en la posición 1, 4, 6 y/o 9 de un péptido pueden continuar teniendo la secuencia de tipo natural (es decir, manteniéndose que tengan la secuencia parcial de WT1) o pueden alterarse adicionalmente siempre que se conserve la actividad.

Los ejemplos más preferidos incluyen péptidos de 10-25 aminoácidos que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que el resto aminoacídico en la posición 1, 4, 6, y/o 9 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 12 se sustituye por un resto aminoacídico seleccionado de los aminoácidos siguientes:

fenilalanina, triptófano, valina, isoleucina, leucina y metionina para la posición 1; valina, isoleucina, metionina, ácido aspártico y ácido glutámico para la posición 4; asparagina, serina, treonina, glutamina, lisina y ácido aspártico para la posición 6; y ácido aspártico, ácido glutámico y glutamina para la posición 9, y que se unen a un HLA-DRB1*0405 e inducen células T auxiliares.

Los ejemplos aún más preferidos incluyen péptidos en los que el resto aminoacídico en la posición 3, 6, 8 y/u 11 del péptido parcial de 16 aminoácidos derivado de WT1 expuesto en la SEC ID N°: 24, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 12, se sustituye por un resto aminoacídico seleccionado de los aminoácidos siguientes:

fenilalanina, triptófano, valina, isoleucina, leucina y metionina para la posición 3; valina, isoleucina, metionina, ácido aspártico y ácido glutámico para la posición 6; asparagina, serina, treonina, glutamina, lisina y ácido aspártico para la posición 8; y ácido aspártico, ácido glutámico y glutamina para la posición 11. Los ejemplos preferidos pueden incluir péptidos de 16-25 aminoácidos que comprenden la secuencia de aminoácidos alterada derivada de la SEC ID

Nº: 24.

La presente invención también proporciona un péptido (denominado un péptido epitópico) que comprende un péptido auxiliar (péptido natural o alterado) de la presente invención junto con un péptido antigénico de cáncer.

5 Recientemente, se ha descrito que un péptido epitópico en el que un péptido o péptidos antigénicos de cáncer (también denominado "epítopo de CTL") y un péptido o péptidos auxiliares (también denominado "epítopo auxiliar") están unidos entre sí puede inducir CTL eficazmente. Es decir, las células T auxiliares (células T positivas para CD4) activadas por un péptido auxiliar ejercen diversas actividades incluyendo la inducción de diferenciación y
 10 mantenimiento de CTL, y la activación de efectores tales como macrófagos, etc., y por lo tanto se considera que aumentan la inducción de CTL por antígenos de cáncer. Como un ejemplo concreto de un péptido en el que un péptido o péptidos auxiliares y un péptido o péptidos antigénicos de cáncer están unidos entre sí, se describe que un ADN (minigén) que codifica un péptido epitópico compuesto por péptidos antigénicos restringidos por HLA-A2 originados del HBV (6 péptidos), péptidos antigénicos restringidos por HLA-A11 (3 péptidos) y un péptido auxiliar
 15 induce CTL *in vivo* dirigidos contra los epítopos respectivos eficazmente (Journal of Immunology 1999, 162: 3915-3925). En la práctica, un péptido en el que un epítopo de CTL (péptido antigénico de tumor correspondiente a la posición 280-288 del antígeno de melanoma gp100) y un epítopo auxiliar (epítopo auxiliar T originado de toxina tetánica) están unidos se ha sometido a ensayo clínico (Clinical Cancer Res., 2001, 7: 3012-3024).

20 Por consiguiente, como una realización específica, los péptidos de la presente invención también incluyen péptidos epitópicos que comprenden un péptido auxiliar de la presente invención y un péptido antigénico de cáncer.

Como el péptido antigénico de cáncer puede usarse cualquiera de los péptidos antigénicos de cáncer conocidos; sin embargo, se prefiere usar un péptido antigénico de cáncer derivado de WT1 (péptido natural o alterado). Los
 25 ejemplos concretos incluyen péptidos derivados de WT1 restringidos por HLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602 y similares.

Los ejemplos de péptidos antigénicos de cáncer derivados de WT1 incluyen los enumerados en la Tabla II-Tabla XLVI del documento WO2000/18795 y péptidos alterados de los mismos, que tienen la actividad como péptido
 30 antigénico de cáncer (una actividad de unión a un antígeno HLA e inducción de CTL).

Los ejemplos más concretos de péptidos antigénicos de cáncer derivados de WT1 incluyen los siguientes:

- Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID Nº: 27)
- Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID Nº: 28)
- Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEC ID Nº: 29)
- Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEC ID Nº: 30)
- Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID Nº: 31)
- Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID Nº: 32)
- Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID Nº: 33)
- Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID Nº: 34)
- Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID Nº: 35)
- Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEC ID Nº: 36)
- Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (SEC ID Nº: 37)
- Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (SEC ID Nº: 38)
- Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (SEC ID Nº: 39)
- Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (SEC ID Nº: 40)
- Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe (SEC ID Nº: 41)
- Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe (SEC ID Nº: 42)
- Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe (SEC ID Nº: 43)
- Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEC ID Nº: 44)
- Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val (SEC ID Nº: 45)

En lo anterior, "Abu" se refiere a "ácido α -aminoacético".

35 Entre ellos, los péptidos expuestos en las SEC ID Nº: 27 y 29 son péptidos de unión a antígeno HLA-A24 y antígeno HLA-A2, y los péptidos expuestos en las SEC ID Nº: 44 y 45 son péptidos de unión a antígeno HLA-A2. Los otros

péptidos son péptidos de unión a antígeno HLA-A24.

El péptido antigénico de cáncer preferido es el expuesto en las SEC ID N°: 27, 28, 30, 44 ó 45.

- 5 Los ejemplos más específicos de péptidos epitópicos de la presente invención incluyen los que comprenden un péptido auxiliar que es un péptido parcial derivado de WT1 de 10-25 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 2-23 y tiene una actividad de unión a HLA-DRB1*0405 e inducción de células T auxiliares, junto con un péptido antigénico de cáncer expuesto en una cualquiera de las SEC ID N°: 27-45 anteriores.
- 10 Los péptidos epitópicos comprenden preferentemente un péptido auxiliar que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24 junto con un péptido antigénico de cáncer expuesto en una cualquiera de las SEC ID N°: 27-45.
- 15 Más preferentemente, los péptidos epitópicos comprenden un péptido auxiliar que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24, junto con un péptido antigénico de cáncer expuesto en una cualquiera de las SEC ID N°: 27-30, 44 y 45.
- 20 Los péptidos epitópicos pueden prepararse mediante el método habitual mencionado anteriormente para la síntesis de péptidos. También pueden prepararse mediante un método habitual para síntesis de ADN y obtención por ingeniería genética basándose en la información de secuencia de un polinucleótido que codifica un péptido epitópico en el que se ligan múltiples epitopos. En concreto, un péptido epitópico en el que se ligan múltiples epitopos puede prepararse por inserción de un polinucleótido que codifica el péptido en un vector de expresión conocido, transformación de una célula huésped con el vector de expresión recombinante resultante, cultivo de los transformantes y recuperación del péptido objetivo del cultivo. Estos procesos pueden realizarse de acuerdo con, por ejemplo, un método descrito en la bibliografía (Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)), o el descrito a continuación.
- 25 La actividad de dicho péptido epitópico como péptido auxiliar puede confirmarse de acuerdo con el método mencionado anteriormente. Además, la actividad de dicho péptido epitópico como un péptido antigénico de cáncer puede confirmarse sometiendo el péptido a animales de modelo para seres humanos descritos en el documento WO02/47474 o Int J. Cancer. 100, 565-570, 2002.
- 30 Un péptido epitópico de la presente invención se considera útil para establecer más eficazmente el tratamiento o la prevención del cáncer, debido a que una porción de péptido auxiliar en el péptido epitópico auxiliar puede activar células T auxiliares (células T positivas a CD4) para dar células T auxiliares activadas que ejercen diversas actividades incluyendo la inducción de la diferenciación y mantenimiento de CTL y la activación de efectores tales como macrófagos, por lo que aumenta adicionalmente la inducción de CTL por péptidos antigénicos de cáncer.
- 35 El grupo amino del aminoácido N-terminal o el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal del péptido descrito anteriormente de la presente invención (péptido natural, alterado o epitópico) puede estar modificado. Los péptidos en los que el resto aminoácido N-terminal y/o C-terminal se modifica se incluyen dentro del alcance del péptido de la presente invención.
- 40 Los ejemplos de un grupo que puede usarse en la modificación del grupo amino del aminoácido N-terminal incluyen de 1 a 3 grupos seleccionados de grupo alquilo C₁₋₆, grupo fenilo, grupo cicloalquilo y grupo acilo. Los grupos acilo incluyen grupo alcanilo C₁₋₆, grupo alcanilo C₁₋₆ sustituido por grupo fenilo, grupo carbonilo sustituido por grupo cicloalquilo C₅₋₇, grupo alquilo C₁₋₆-sulfonilo, grupo fenilsulfonilo, grupo alcoxicarbonilo C₂₋₆, grupo alcoxicarbonilo sustituido por grupo fenilo, grupo carbonilo sustituido por grupo cicloalcoxi C₅₋₇, grupo fenoxicarbonilo y similares.
- 45 Los ejemplos de péptidos modificados en el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal incluyen ésteres y amidas. Los ésteres incluyen específicamente ésteres de alquilo C₁₋₆, ésteres de alquilo C₀₋₆ sustituidos por grupo fenilo, ésteres de cicloalquilo C₅₋₇ y similares. Las amidas incluyen específicamente amidas, amidas sustituidas por uno o dos grupos alquilo C₁₋₆, amidas sustituidas por uno o dos grupos alquilo C₀₋₆ que se sustituyen por grupo fenilo, amidas que forman un azacicloalcano de 5 a 7 miembros incluyendo el átomo de nitrógeno del grupo amida, y similares.
- 50 La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica el péptido mencionado anteriormente (péptido natural, alterado o epitópico) de la presente invención. El polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención puede estar en forma de ADN o ARN. Los polinucleótidos de la presente invención pueden prepararse fácilmente basándose en la información acerca de la secuencia de aminoácidos del presente péptido o la secuencia polinucleotídica de ADN que lo codifica. En concreto, la síntesis puede llevarse a cabo usando el método habitual de síntesis de ADN o amplificación por PCR.
- 55 Los ejemplos concretos de polinucleótidos incluyen los que codifican los péptidos epitópicos mencionados anteriormente. Más específicamente, los ejemplos de polinucleótidos incluyen los que codifican péptidos epitópicos
- 60
- 65

que comprenden un péptido auxiliar que es un péptido parcial derivado de WT1 de 10-25 aminoácidos, que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 2-23 y tiene una actividad de unión a HLA-DRB1*0405 e inducción de células T auxiliares, junto con un péptido antigénico de cáncer expuesto en una cualquiera de las SEC ID N°: 27-45 anteriores.

5 Los ejemplos preferidos incluyen un polinucleótido que codifica un péptido epitópico que comprende un péptido auxiliar que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24 y un péptido antigénico de cáncer expuesto en una cualquiera de las SEC ID N°: 27-45.

10 Los ejemplos más preferidos incluyen un polinucleótido que codifica un péptido epitópico que comprende un péptido auxiliar que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24 y un péptido antigénico de cáncer expuesto en una cualquiera de las SEC ID N°: 27-30, 44 y 45.

15 El "polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención" incluye polinucleótidos que pueden hibridar en las condiciones rigurosas con la secuencia complementaria de dicho polinucleótido, y que codifican péptidos que tienen actividades equivalentes al péptido de la presente invención. En relación con la expresión "hibridar la condición rigurosa", la "hibridación" usada en la presente memoria puede llevarse a cabo de acuerdo con el método convencional descrito en, por ejemplo, Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T. ed. *Molecular Cloning* 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory press. La expresión "condiciones rigurosas" significa que la hibridación se realiza en una solución que contiene SSC 6x (SSC 10 x = NaCl 1,5 M, citrato trisódico 1,5 M), formamida al 50% a 45°C, seguido de lavado en una solución de SSC 2x a 50°C (*Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6)) o similar.

20 Un vector de expresión recombinante para la expresión del péptido de la presente invención puede construirse por incorporación de un polinucleótido preparado anteriormente en un vector de expresión.

25 Como vectores de expresión que pueden usarse en la presente memoria, se incluyen plásmidos, vectores de fago, vectores virales y similares.

30 Cuando el hospedador es *Escherichia coli*, los ejemplos de vector incluyen vectores plasmídicos tales como pUC118, pUC199, pBR322, pCR3 y similares; y vectores de fago tales como λZAPII, λgt11 y similares. Cuando el hospedador es una levadura, los ejemplos de vector incluyen pYES2, pYEUra3 y similares. Cuando el hospedador son células de insecto, los ejemplos de vector incluyen pAcSGHisNT-A y similares. Cuando el hospedador son células animales, los ejemplos de vector incluyen vectores plasmídicos tales como pKCR, pCDM8, pGL2, pcDNA3.1, pRc/RSV, pRc/CMV y similares; y vectores virales tales como vector de retrovirus, vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado y similares.

35 El vector de expresión puede contener opcionalmente un factor o factores tales como un promotor capaz de inducir la expresión, un gen que codifica una secuencia de señal, un gen marcador para la selección, un terminador y similares.

40 Además, el vector de expresión puede contener una secuencia adicional para permitir que el péptido se exprese como una proteína de fusión con tiorredoxina, etiqueta de His, GST (glutación S-transferasa) o similar, para facilitar el aislamiento y la purificación. Los vectores que pueden usarse en dicho caso incluyen vectores de proteínas de fusión con GST que contienen un promotor apropiado (lac, tac, trc, trp, CMV, promotor temprano de SV40, etc.) que funcionan en células hospedadoras, tales como pGEX4T; vectores que contienen una secuencia de etiqueta (Myc, His, etc.) tales como pcDNA3.1/Myc-His; y vectores capaces de expresar una proteína de fusión entre tiorredoxina y etiqueta de His tales como pET32a.

45 Las células transformadas que contienen el vector de la presente invención pueden prepararse por transformación de células hospedadoras con un vector de expresión obtenido en lo anterior.

50 Las células hospedadoras que pueden usarse en la presente memoria incluyen *Escherichia coli*, células de levadura, de insecto y células animales. Los ejemplos de *Escherichia coli* incluyen cepas de *E. coli* K-12 tales como HB101, C600, JM109, DH5α y AD494 (DE3). Los ejemplos de levadura incluyen *Saccharomyces cerevisiae*. Los ejemplos de células animales incluyen células L929, BALB/c3T3, C127, CHO, COS, Vero y Hela. Los ejemplos de células de insecto incluyen sf9.

55 La introducción de un vector de expresión en células hospedadoras puede realizarse usando un método convencional adecuado para las células hospedadoras respectivas anteriores. En concreto, la introducción puede realizarse usando el método de fosfato de calcio, el método de DEAE-dextrano, el método de electroporación y un método que use lípidos para la transferencia de genes (Lipofectamine, Lipofectin; Gibco-BRL). Después de la introducción, las células se cultivan en un medio convencional que contiene un marcador de selección, por lo que pueden seleccionarse transformantes que contienen el vector de expresión.

65

El péptido de la presente invención puede producirse por cultivo de las células transformadas en condiciones apropiadas (condiciones en las que pueden expresarse los péptidos). El péptido resultante puede aislarse y purificarse adicionalmente de acuerdo con procedimientos de purificación bioquímicos convencionales. Los procedimientos de purificación incluyen extracción salina, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de absorción, cromatografía de afinidad, cromatografía de filtración en gel, etc. Cuando el polipéptido de la presente invención se ha expresado como un péptido de fusión con tiorredoxina, etiqueta de His, GST o similar, como se ha mencionado anteriormente, el péptido puede aislarse y purificarse mediante procedimientos de purificación apropiados haciendo uso de las características de la proteína o etiquetas de fusión.

La presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un péptido de la presente invención. El anticuerpo de la presente invención no está limitado a ninguna forma y puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal generado contra un péptido de la presente invención como antígeno.

Como se ha mencionado anteriormente, no existen limitaciones respecto al anticuerpo de la presente invención con la condición de que se una específicamente a un péptido de la presente invención. Los ejemplos de anticuerpos preferidos incluyen los que se unen específicamente a un péptido auxiliar que es un péptido parcial derivado de WT1 de 10-25 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 2-23 y tiene una actividad de unión a HLA-DRB1*0405 e inducción de células T auxiliares. Los anticuerpos que se unen específicamente a un péptido auxiliar que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24 son más preferidos.

Se conocen bien en la técnica métodos de preparación de anticuerpos, y los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con uno cualquiera de los métodos convencionales (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Sección 11.12-11.13, Antibodies; *A Laboratory Manual*, Lane, H. D. et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York 1989).

En concreto, los anticuerpos de la presente invención pueden obtenerse por inmunización de un animal no humano tal como un conejo usando un péptido de la presente invención como antígeno, y recuperación de los anticuerpos del suero del animal inmunizado de una forma convencional. En el caso de anticuerpos monoclonales, pueden obtenerse por inmunización de un animal no humano tal como un ratón con un péptido de la presente invención, sometimiento de los esplenocitos resultantes a fusión celular con células de mieloma y recuperación de anticuerpos monoclonales de las células de hibridoma resultantes (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Sección 11.4-11.11).

Los anticuerpos contra el péptido de la presente invención también pueden producirse al tiempo que se aumenta la respuesta inmunológica usando diferentes adyuvantes dependiendo del hospedador. Los ejemplos de adyuvantes incluyen adyuvantes de Freund; geles minerales tales como hidróxido de aluminio; tensioactivos tales como lisolecitina, poliol Pluronic®, polianión, péptido, emulsión oleosa, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol; adyuvantes humanos tales como BCG (Bacilo de Calmette-Guerin) o *Corynebacterium*, etc.

Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos que reconocen un péptido de la presente invención y los anticuerpos que neutralizan la actividad de los mismos pueden prepararse fácilmente por inmunización de un animal de una forma convencional. Los anticuerpos pueden usarse en cromatografía de afinidad, un método de diagnóstico inmunológico y similares. El método de diagnóstico inmunológico puede seleccionarse según sea apropiado de inmunotransferencia, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo fluorescente o luminiscente y similares. El método de diagnóstico inmunológico es eficaz en el diagnóstico del cáncer que expresa un gen de WT1, tal como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de ovario y similares.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido (péptidos de tipo natural, alterados y epitópicos) de la presente invención, un vector de expresión que contiene un polinucleótido de la presente invención o una célula que contiene un vector de expresión de la presente invención, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede usarse eficazmente como un inductor de células T auxiliares o un potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer, como se describe en detalle a continuación.

(1) Un inductor de células T auxiliares que comprende como ingrediente activo un péptido de la presente invención (un potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer)

El péptido de la presente invención tiene una actividad de inducción de células T auxiliares, y las células T auxiliares inducidas a su vez son capaces de aumentar la actividad de inducción de CTL, que son los efectos de la vacuna contra el cáncer, a través de la inducción de la diferenciación y mantenimiento de CTL y de la activación de efectores tales como macrófagos. Por lo tanto, la presente invención proporciona un potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer que comprende como ingrediente activo un péptido de la presente invención (composición farmacéutica como agente para aumentar la eficacia de la vacuna contra el cáncer). Cuando el potenciador de la

presente invención se administra a un paciente positivo para HLA-DRB1*0405 y positivo para WT1, el péptido se presenta al antígeno HLA-DRB1*0405 de una célula presentadora de antígeno; las células T auxiliares específicas (células T positivas para CD4) que reconocen un complejo del péptido y el antígeno HLA-DRB1*0405 se inducen y se activan; y las células T auxiliares activadas pueden ejercer la actividad en relación con la inducción de la diferenciación y el mantenimiento de CTL y la activación de efectores tales como macrófagos. De esta forma, se aumenta la actividad de activación e inducción de CTL como el efecto de una vacuna contra el cáncer.

El potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer de la presente invención puede usarse en la prevención o tratamiento de un cáncer acompañado por un nivel de expresión elevado de gen de WT1, por ejemplo, cánceres sanguíneos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, y cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical y cáncer de ovario.

El potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer de la presente invención puede administrarse al mismo tiempo que, antes o después de la administración de la vacuna contra el cáncer.

El potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer que comprende como ingrediente activo un péptido de la presente invención puede contener como ingrediente activo un péptido o péptidos auxiliares o un péptido epitópico, en el que un péptido o péptidos se ligan con un péptido o péptidos antigénicos de cáncer (epítipo o epítipos de CTL). Como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado recientemente que un péptido epitópico en el que un péptido antigénico de cáncer (epítipo de CTL) y un péptido auxiliar (epítipo auxiliar) pueden inducir CTL eficazmente. Cuando se administra un péptido epitópico de esta forma, dicho péptido se incorpora en células presentadoras de antígeno; entre los péptidos antigénicos generados por degradación intracelular, los péptidos auxiliares se unen a antígeno de MHC de clase II (HLA-DRB1*0405) mientras que los péptidos antigénicos de cáncer a antígeno de MHC de clase I; y los complejos respectivos así formados se presentan en la superficie de células presentadoras de antígeno en alta densidad. Cuando las células T auxiliares reconocen el complejo de antígeno HLA-DRB1*0405 y péptido auxiliar, la actividad de inducción de CTL que es el efecto de la vacuna contra el cáncer se aumenta adicionalmente como resultado de la inducción de la diferenciación y mantenimiento de CTL y la activación de efectores tales como macrófagos. Por otro lado, cuando los CTL reconocen el complejo de péptidos antigénicos de cáncer y antígeno de MHC de clase I, los CTL proliferan y destruyen las células de cáncer. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención que comprende como ingrediente activo un péptido epitópico de la presente invención puede usarse como vacuna contra el cáncer de por sí, así como un potenciador de la eficacia de la vacuna contra el cáncer.

El potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer que comprende como ingrediente activo un péptido de la presente invención puede administrarse junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un adyuvante apropiado, o en forma de partículas de modo que la inmunidad celular pueda establecerse eficazmente. Como adyuvante, son aplicables los descritos en la bibliografía (Clin. Microbiol. Rev., 7: 277-289, 1994) y similares. Los ejemplos concretos incluyen componentes derivados de microorganismos, citocinas, componentes derivados de plantas, componentes derivados de organismos marinos, geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, tensioactivos tales como lisolecitina y polioles Pluronic®, polianiones, péptidos, emulsión oleosa (preparaciones en emulsión) y similares. También se contemplan preparaciones liposomales, preparaciones particulares en las que el ingrediente está unido a perlas que tienen un diámetro de varios μm , preparaciones en las que el ingrediente está unido a lípidos y similares.

La administración puede conseguirse, por ejemplo, por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Aunque la dosificación del péptido de la presente invención en la formulación puede ajustarse según sea apropiado dependiendo de, por ejemplo, la enfermedad a tratar, la edad y el peso corporal de un paciente, habitualmente está dentro del intervalo de 0,0001 mg-1000 mg, preferentemente 0,001 mg-1000 mg, más preferentemente 0,1 mg-10 mg, que pueden administrarse preferentemente una vez de cada varios días a cada varios meses.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación de un péptido de la presente invención y un péptido antigénico de cáncer. De acuerdo con el uso combinado de la presente invención, el efecto de un péptido antigénico de cáncer como vacuna contra el cáncer (es decir, la actividad de inducción y activación de CTL) se aumenta por el péptido de la presente invención, y el tratamiento o prevención del cáncer puede conseguirse más eficazmente.

El término "combinación" incluye ambas formas en las que un péptido de la presente invención y un péptido antigénico de cáncer se administran en una forma mixta o formas separadas.

La administración de los péptidos en la forma mixta puede realizarse usando una formulación preparada previamente que contiene los péptidos como una mezcla, o combinando formulaciones preparadas previamente, comprendiendo cada una los péptidos respectivos, antes del uso.

En el caso en el que los péptidos se administran en formas separadas, las formulaciones discretas pueden administrarse sucesivamente con un intervalo temporal o administrarse al mismo tiempo. Cuando la administración

se realiza con un intervalo temporal, un péptido de la presente invención (potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer) y un péptido antigénico de cáncer (vacuna contra el cáncer) pueden administrarse en este orden o en orden inverso.

- 5 Una realización de la combinación de un péptido de la presente invención y un péptido antigénico de cáncer incluye un kit.

10 Como péptido antigénico de cáncer que puede usarse en combinación con un péptido de la presente invención, puede usarse cualquier péptido antigénico de cáncer conocido convencionalmente, y los ejemplos incluyen péptidos antigénicos de cáncer derivados de WT1 (de tipo natural o alterado). Los ejemplos concretos incluyen un péptido antigénico de cáncer expuesto en una cualquiera de las SEC ID N°: 27-45, preferentemente en las SEC ID N°: 27-30, 40 y 45.

- 15 (2) Inductor de células T auxiliares (potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer) que comprende como ingrediente activo un vector de expresión de la presente invención.

20 Un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención, similar al péptido mencionado anteriormente de la presente invención, tiene una actividad de inducción de células T auxiliares y es útil como ingrediente activo de un potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención proporciona un potenciador de la eficacia de una vacuna contra el cáncer (es decir, una composición farmacéutica como un agente que aumenta la eficacia de una vacuna contra el cáncer) que comprende como ingrediente activo un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención.

- 25 Recientemente, un polinucleótido que codifica un péptido epitópico en el que un péptido antigénico de cáncer (epítipo de CTL) y un péptido auxiliar (epítipo auxiliar) están ligados ha demostrado tener una actividad de inducción de CTL *in vivo* eficazmente. Por ejemplo, se describe que un ADN (minigén) que codifica un péptido epitópico en el que péptidos antigénicos restringidos por HLA-A2 originados del HBV (6 péptidos), péptidos antigénicos restringidos por HLA-A11 (3 péptidos) y un epítipo auxiliar están ligados inducía CTL *in vivo* dirigidos contra los epítipos respectivos eficazmente (Journal of Immunology 1999, 162: 3915-3925).

30 Por consiguiente, un ingrediente activo de potenciador de la eficacia de una vacuna contra el cáncer puede obtenerse por incorporación de un polinucleótido que codifique el péptido epitópico descrito anteriormente de la presente invención en un vector de expresión apropiado.

- 35 Cuando se administra un vector de expresión que contiene un polinucleótido de la presente invención como ingrediente activo de potenciador de la eficacia de una vacuna contra el cáncer, pueden usarse los métodos siguientes.

40 Como un método para introducir un vector de expresión que contiene el polinucleótido de la presente invención en células, son aplicables cualquier medio que incluya los que utilizan vectores virales u otros métodos (Nikkei-Science, abril, 1994, págs. 20-45; Gekkan-Yakuji, 36(1), págs. 23-48 (1994); Jikken-Igaku-Zokan, 12(15), 1994, y referencias citadas en los mismos).

- 45 Los ejemplos de medios que utilizan un vector viral incluyen aquellos en los que un ADN de la presente invención se incorpora en un virus de ADN o ARN tal como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus, virus vaccinia, poxvirus, poliovirus o virus Sindbis, y después se introduce en células. Por encima de todo, se prefiere particularmente un método que utilice retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados o virus vaccinia o similares.

- 50 Los ejemplos de otros métodos incluyen aquellos en los que un vector de expresión se inyecta directamente por vía intramuscular (vacunación con ADN), método de liposoma, método de Lipofectina, microinyección, método de fosfato de calcio y electroporación. Se prefiere particularmente la vacunación con ADN y el método de liposomas.

55 Respecto a un método para hacer que el vector de expresión de la presente invención actúe como medicamento en la práctica, existe un método *in vivo* en el que el vector de expresión se introduce directamente en el cuerpo y un método *ex vivo* en el que el vector de expresión se introduce extracorpóreamente en determinadas células extraídas de un ser humano, y las células se reintroducen en el cuerpo (Nikkei-Science, abril, 1994, 20-45; Gekkan-Yakuji, 36(1), 23-48 (1994); Jikkenn-Igaku-Zokan, 12(15), 1994; y referencias citadas en los mismos). El método *in vivo* es más preferido.

- 60 En el caso del método *in vivo*, la administración puede efectuarse a través de cualquier vía apropiada dependiendo de la enfermedad y de los síntomas a tratar. Por ejemplo, puede administrarse mediante vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intracutánea, intramuscular o similar. Cuando la administración se lleva a cabo mediante un método *in vivo*, las composiciones pueden administrarse en diversas formas tales como solución, y se formulan típicamente, por ejemplo, en forma de inyección que contiene, como ingrediente activo, un vector de expresión de la presente invención al que también pueden añadirse vehículos convencionales si es necesario. En cuanto a los

65

liposomas o liposomas fusionados a membranas (tales como virus Sendai (HVJ)-liposomas) que contienen un vector de expresión de la presente invención, pueden estar en forma de una formulación liposomal tal como suspensión, fármaco congelado, fármaco congelado concentrado por centrifugación o similares.

- 5 Aunque el contenido de un vector de expresión en una formulación puede ajustarse según sea apropiado dependiendo, por ejemplo, de la enfermedad a tratar, la edad y el peso corporal de un paciente, habitualmente pueden administrarse 0,0001 mg-100 mg, preferentemente 0,001 mg-10 mg de un vector de expresión de la presente invención una vez de cada varios días a cada varios meses.
- 10 Cuando el vector de expresión mencionado anteriormente de la presente invención se administra a un paciente positivo para HLA-DRB1*0405 y positivo para WT1, el péptido de la presente invención se presenta al antígeno HLA-DRB1*0405 de una célula presentadora de antígeno; las células T auxiliares específicas (células T positivas para CD4) que reconocen un complejo del péptido y el antígeno HLA-DRB1*0405 se inducen y se activan; las células T auxiliares activadas pueden ejercer la actividad en relación con la inducción de la diferenciación y mantenimiento de CTL y la activación de efectores tales como macrófagos. De esta forma, se aumenta la actividad de inducción de CTL como un efecto de una vacuna contra el cáncer. El potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer que comprende como ingrediente activo un vector de expresión que contiene un polinucleótido de la presente invención puede usarse en la prevención o tratamiento de un cáncer acompañado por un nivel de expresión elevado de gen de WT1, por ejemplo, cánceres sanguíneos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, y cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical y cáncer de ovario.

25 En el caso anterior en el que se administra un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica un péptido epitópico, las células presentadoras de antígeno lo incorporan y generan péptidos antigénicos a través de la degradación intracelular, de los cuales los péptidos auxiliares y los péptidos antigénicos de cáncer se unen a antígeno de MHC de clase II (HLA-DRB1*0405) y antígeno de MHC de clase I, respectivamente, para formar complejos. Los complejos así formados se presentan en la superficie de células presentadoras de antígeno en alta densidad. Cuando las células T auxiliares reconocen al complejo de antígeno HLA-DRB1*0405 y péptido auxiliar, la actividad de inducción de CTL que es el efecto de la vacuna contra el cáncer se aumenta adicionalmente a través de la inducción de la diferenciación y mantenimiento de CTL y de la activación de efectores tales como macrófagos. Por otro lado, cuando los CTL reconocen el complejo de péptidos antigénicos de cáncer y antígeno de MHC de clase I, los CTL proliferan y destruyen las células cancerosas. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención que comprende como ingrediente activo un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica un péptido epitópico de la presente invención puede usarse como vacuna contra el cáncer de por sí, así como un potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer.

40 La presente invención también proporciona un péptido que consiste en 10-25 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de WT1 humano expuesta en la SEC ID N°: 1, uniéndose dicho péptido a HLA-DRB1*1502 e induciendo células T auxiliares. La presente invención incluye péptidos antigénicos que se unen a HLA-DRB1*1502, en los que el resto aminoacídico N-terminal y/o C-terminal está modificado o en los que un resto o restos aminoacídicos particulares están alterados.

45 La síntesis y la determinación de la actividad de péptidos antigénicos que se unen a HLA-DRB1*1502 de la presente invención pueden llevarse a cabo de una forma similar a la descrita en relación con los péptidos antigénicos mencionados anteriormente que se unen a HLA-DRB1*0405 de la presente invención.

50 Los péptidos antigénicos de unión a HLA-DRB1*1502 de la presente invención son un péptido parcial que consiste en 10-25 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de WT1 humano expuesta en la SEC ID N°: 1. Los péptidos preferidos son los que consisten en 13-17 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos de WT1 humano.

55 La presente invención se basa en el descubrimiento de que WT1 humano contiene una porción de péptido antigénico que tiene actividad de unión a HLA-DRB1*1502 e inducción de células T auxiliares. La búsqueda de porciones de 9 aminoácidos que se unan potencialmente a HLA-DRB1*1502 (porciones de 9 aminoácidos capaces de alojarse en una hendidura de unión a péptido de moléculas de MHC de clase II) se realizó usando un *software* para predecir péptidos de unión a MHC de clase II (Propred, Bioinformatics 17: 1236, 2001). Se muestran ejemplos de las porciones de 9 aminoácidos identificadas de WT1 en las SEC ID N°: 45-56. Por lo tanto, los ejemplos específicos de péptidos antigénicos de unión a HLA-DRB1*1502 de la presente invención incluyen un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEC ID N°: 45-56 y que se une a HLA-DRB1*1502 e induce células T auxiliares.

65 Dichos péptidos consisten preferentemente en aproximadamente 10-25 aminoácidos y, más preferentemente, aproximadamente 13-17 aminoácidos. Los ejemplos de realizaciones más preferidas incluyen péptidos parciales derivados de WT1 que consisten en 10-25 aminoácidos (preferentemente, 13-17 aminoácidos), que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 50 y que tienen una actividad de unión a HLA-DRB1*1502 e

inducción de células T auxiliares. Los ejemplos de realizaciones aún más preferidas incluyen péptidos parciales derivados de WT1 que consisten en 16-25 aminoácidos (preferentemente, 16-17 aminoácidos), que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24 y que tienen una actividad de unión a HLA-DRB1*1502 e inducción de células T auxiliares. La secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24 representa un péptido parcial de 16 aminoácidos derivado de WT1 e incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 50.

La realización preferida adicional es el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24.

10 Dicho péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ es un péptido auxiliar promiscuo que se une, no sólo a la molécula de HLA-DRB1*0405, sino también a la molécula de HLA-DRB1*1502. Por consiguiente, WT1₃₃₂₋₃₄₇ es un péptido auxiliar aplicable a pacientes que tienen HLA-DRB1*0405 y a los que tienen HLA-DRB1*1502 también, y por lo tanto es útil desde el punto de vista de una amplia variedad de aplicación de pacientes.

15 El péptido epitópico, polinucleótido, anticuerpo y composición farmacéutica en relación con el péptido antigénico de unión a HLA-DRB1*1502 de la presente invención pueden generarse y usarse (ponerse en práctica) de una forma similar al péptido antigénico de unión a HLA-DRB1*0405 mencionado anteriormente de la presente invención.

Ejemplos

20 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, pero no debería interpretarse como limitada a los mismos.

Ejemplo 1

25 1. Preparación de células dendríticas

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque a partir de sangre de un voluntario sano positivo para HLA-DRB1*0405. Las 8×10^5 PBMC resultantes se suspendieron en 2 ml de medio X-VIVO 15TM (Camblex) que contenía suero AB al 1%, se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos y se cultivaron durante 2 horas. Después del cultivo, se retiraron las células no adherentes y las células adherentes se lavaron con solución de Hanks. Las células adherentes se cultivaron en medio X-VIVO 15TM que contenía suero AB al 1%, IL-4 1000 U/ml y GM-CSF 1000 U/ml. Los días 2 y 4 del cultivo, se sustituyó la mitad del medio por medio recién preparado. El día 6, se añadió TNF- α para llegar a la concentración final de 100 U/ml. Las células existentes el día 7 se usaron como células dendríticas en el experimento.

2. Preparación de células T positivas para CD4 (células T auxiliares)

40 Se usó sangre obtenida del mismo voluntario sano que en el (1). La sangre se diluyó 2 veces con medio RPMI. Aproximadamente 100 ml de la sangre diluida se añadió un cóctel de anticuerpos, RosetteSepTM (Stemcell) para la separación de células T positivas para CD4, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después se recogieron las células T positivas para CD4 mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque.

45 3. Inducción de células T positivas para CD4 específicas de péptido WT1

Se realizó una búsqueda en la secuencia de aminoácidos de la proteína WT1 (base de datos del NCBI, N° de Acceso P19544, XP_034418, SEC ID N°: 1) para péptidos que se unieran potencialmente a HLA-DRB1*0405 usando un programa de predicción (Propred, Bioinformatics 17:1236, 2001). Se seleccionaron tres péptidos y se sintetizaron. Estos péptidos tienen las mismas secuencias de aminoácidos que las presentes en las posiciones siguientes de WT1:

55 Posición 172-186: PNHSFKHEDPMGQQG (WT1₁₇₂₋₁₈₆, SEC ID N°: 25);
 Posición 225-243: NLYQMTSQLCMTWNQMNL (WT1₂₂₅₋₂₄₃, SEC ID N°: 26); y
 Posición 332-347: KRYFKLSHLQMHSRKH (WT1₃₃₂₋₃₄₇, SEC ID N°: 24).

Las células dendríticas preparadas en el (1) anterior se sembraron en una placa de cultivo de 24 pocillos a 3×10^5 células/pocillo y se añadió un péptido de SEC ID N°: 24 hasta 50 μ g/ml. Después de 4 horas de cultivo, el crecimiento de las células se detuvo por irradiación con rayos X (25 Gy). Las células positivas para CD4 preparadas en el (2) anterior se añadieron a cada pocillo a 3×10^6 células/pocillo y se cocultivaron con células dendríticas. Como medio, se usó medio X-VIVO 15TM que contenía suero AB al 1%. Después de que se iniciase el cultivo, se sustituyó la mitad del medio con medio recién preparado cada 2 días y se añadió IL-2 hasta 20 U/ml. Los días 7 y 14 desde el comienzo del cultivo, las células T se recogieron y se sembraron en placas de 24 pocillos a 3×10^6 células/pocillo, y a las mismas se añadieron 3×10^5 células dendríticas que se habían estimulado con 20 μ g/ml de un péptido (SEC ID N°: 24) y sometido a irradiación con rayos X (25 Gy). Después, las células se cocultivaron. Como medio, se usó medio X-VIVO 15TM que contenía suero AB al 1% e IL-2 20 U/ml.

Después de la tercera estimulación, las células T se recuperaron y se sembraron en una placa de 96 pocillos a 3×10^4 células/pocillo. Las células dendríticas que se habían estimulado con $20 \mu\text{g/ml}$ de un péptido (SEC ID N°: 24) y sometido a irradiación con rayos X (25 Gy) se añadieron a 3×10^4 células/pocillo, seguido de cocultivo. Como grupo de control negativo, se cocultivaron células T con células dendríticas no estimuladas con el péptido, y como grupo de control positivo, se añadió PHA al 0,2% en lugar de células dendríticas. Después de 80 horas de cultivo, se añadió [^3H]-timidina (37 kBq/pocillo) y las células se cultivaron durante otras 16 horas. Después se midió la [^3H]-timidina incorporada por las células usando un contador de centelleo β . Los resultados se muestran en la Fig. 1. Las células T positivas para CD4 estimuladas con un péptido en la posición 332-347 de WT1 (WT1₃₃₂₋₃₄₇, SEC ID N°: 24) mostraban una respuesta proliferativa cuando se cocultivaban con células dendríticas estimuladas con WT1₃₃₂₋₃₄₇. Sin embargo, las células T positivas para CD4 no mostraban una respuesta proliferativa cuando se cocultivaban con células dendríticas no estimuladas con el péptido, o con células dendríticas estimuladas con un péptido que tenía la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 25 ó 26, que es diferente de la de la SEC ID N°: 24. Estos resultados demuestran que el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ (SEC ID N°: 24) induce células T positivas para CD4 específicas como péptido antigénico.

Ejemplo 2

Establecimiento de líneas celulares T positivas para CD4 específicas para péptidos WT1

Se sembraron células dendríticas preparadas de una forma similar al Ejemplo 1 en una placa de 96 pocillos a 10^4 células/pocillo y después las células T positivas para CD4 inducidas por péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ (SEC ID N°: 24) se sembraron a 10^3 células/pocillo. Como medio, se usó medio X-VIVO 15™ que contenía suero AB al 1%, IL-2 20 U/ml y PHA $5 \mu\text{g/ml}$. Se estableció la línea celular T positiva para CD4 por cultivo continuo y se denominó "línea celular G2". La sensibilidad de la línea celular G2 a células dendríticas estimuladas con un péptido se midió mediante un método similar al Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 2. La línea celular G2 mostraba una respuesta proliferativa cuando se cocultivaba con células dendríticas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇, pero no cuando se cocultivaba con células dendríticas no estimuladas con el péptido.

Estos resultados demuestran que la línea celular G2 es una línea celular T positiva para CD4 específica para péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇.

Ejemplo 3

Presentación de antígeno de péptido WT1 a molécula de HLA-DR

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque a partir de sangre de un voluntario sano positivo para HLA-DRB1*0405 de una forma similar al Ejemplo 1. Después, las PBMC se sembraron en una placa de 24 pocillos a 10^7 células/pocillo. Como medio, se usó medio RPMI1640 que contenía FCS al 10% y 2ME $55 \mu\text{M}$. Después de añadir medio que contenía virus Epstein-Barr (EBV), el cultivo se continuó durante otras 4 semanas para establecer la línea celular B transformada con EBV, línea celular que se denominó "células B-LCL(-)". El EBV se preparó a partir de sobrenadante de cultivo de B95-8 (Banco de Células JCRB N° 9123), una línea celular que produce EBV. Las células B-LCL(-) se ajustaron a 3×10^7 células/ml, y a las mismas se añadió medio que contenía virus que expresaba gen de WT1 y después polipropileno (concentración final, $8 \mu\text{g/ml}$), y la mezcla se añadió a una placa de 24 pocillos a 1 ml/pocillo . Después de 16 horas de cocultivo, se añadió 1 ml de medio recién preparado a cada pocillo y se continuó con el cultivo. A cada pocillo se añadió G418 (neomicina) hasta $0,7 \mu\text{g/ml}$, y la placa se cultivó durante 5 a 7 días, cuando se seleccionaron las células en las que se introdujo el gen. La línea celular B seleccionada que expresaba WT1 se denominó "células B-LCL(+)" La cantidad de gen de WT1 expresado por células B-LCL(-) y B-LCL(+) se midió mediante técnica de RT-PCR de acuerdo con el método descrito en *Blood*, 89: 1405, 1997. Las mediciones se convirtieron asumiendo que la cantidad de expresión de la línea celular K562 como control positivo era de 1. El valor resultante para las células B-LCL(-) era de $1,6 \times 10^{-4}$, mientras que para las células B-LCL(+) 3,2, indicando que el gen de WT1 está muy expresado. La sensibilidad de células G2 a células B-LCL(+) se examinó de una forma similar al Ejemplo 2. En un grupo de ensayo, las células B-LCL(+) se trataron con anticuerpo anti-HLA-DR antes de mezclarlas con células G2 para confirmar la restricción por HLA-DR. Los resultados se muestran en la Fig. 3. Se puso de manifiesto que G2, que es una línea celular T positiva para CD4 positiva para el péptido, muestra una respuesta proliferativa cuando se cocultiva con células B-LCL(+) que expresan genes de WT1 endógenos, y que dicha respuesta se inhibe por anticuerpo anti-HLA-DR. Estos resultados demuestran que el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ se genera intracelularmente a partir de proteína WT1 y se presenta endógenamente como antígeno a la molécula de HLA-DR.

Ejemplo 4

Establecimiento de líneas celulares T positivas para CD4 E04.1 específicas para péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇

5 Se prepararon células dendríticas usando sangre aislada de un voluntario sano positivo para HLA-DRB1*0405 de una forma similar al Ejemplo 1, excepto por que la concentración final de TNF- α añadido el día 6 era de 200 UI/ml. Se prepararon células T positivas para CD4 usando sangre obtenida del mismo voluntario sano al usado para la preparación de células dendríticas. Las células T positivas para CD4 se separaron de acuerdo con las instrucciones de RosetteSep (StemCell) para la separación de células T positivas para CD4.

10 Las células dendríticas descritas anteriormente y las células T positivas para CD4 se usaron para inducir células T positivas para CD4 específicas para un péptido WT1 (SEC ID N°: 24, WT1₃₃₂₋₃₄₇) de una forma similar al Ejemplo 1. Las células T positivas para CD4 resultantes específicas para péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ se cultivaron de forma continua mediante la técnica de dilución limitante para establecer la línea celular T positiva para CD4 E04.1. Como células alimentadoras en la técnica de dilución limitante, se sembraron PBMC preparadas de una forma similar al Ejemplo 1 y tratadas mediante irradiación con rayos X a 1×10^5 células/pocillo. Como medio, se usó medio X-VIVO 15™ que contenía IL-2 20 UI/ml y PHA 5 μ g/ml.

15 La sensibilidad de la línea celular E04.1 a células dendríticas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ se midió mediante un método similar al Ejemplo 1, excepto por que el cultivo se continuó durante 18 horas después de la adición de [³H]-timidina. Los resultados se muestran en la Fig. 4. Las células E04.1 mostraban una respuesta proliferativa cuando se cocultivaban con células dendríticas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇, pero no cuando se cocultivaban con células dendríticas no estimuladas con el péptido. Estos resultados demuestran que la célula E04.1 es una línea celular T positiva para CD4 específica para péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇.

Ejemplo 5

Unión específica de péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ a HLA-DR

20 Se sembraron células E04.1 establecidas en el Ejemplo 4 en una placa de cultivo de 96 pocillos a 1×10^4 células/pocillo. Células B-LCL(-) de línea celular B establecidas a partir de sangre de un voluntario sano positivo para HLA-DRB1*0405 en el Ejemplo 3 se estimularon con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ a una concentración de 20 μ g/ml y se trataron mediante irradiación con rayos X, se sembraron en una placa de 96 pocillos a 3×10^4 células/pocillo y se cocultivaron con células E04.1. Como grupo de control negativo, células B-LCL(-) no estimuladas con el péptido se cocultivaron con células E04.1.

35 Como grupos de ensayo, células B-LCL(-) que se habían estimulado con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ y que se habían sometido a irradiación con rayos X se trataron con 20 μ g/ml de anticuerpo anti-HLA-DR (G46.6, BD ParMingen), anticuerpo anti-HLA de clase I (G46-2.6, BD ParMingen) o anticuerpo anti-HLA-DQ (SPVL3, Immunotech) durante 40 30 minutos, y se cocultivaron con células E04.1 para confirmar la naturaleza restringida por HLA-DR. Como grupo de control negativo para el tratamiento con anticuerpo, se cocultivaron células tratadas con anticuerpo anti-IgG de ratón con células E04.1 de una forma similar.

45 Después del cocultivo, el crecimiento de células E04.1 se midió de una forma similar al Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Fig. 5. Las células E04.1 mostraban una respuesta proliferativa cuando se cocultivaban con células B-LCL(-) estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇. Sin embargo, cuando células B-LCL(-) estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ se trataron con anticuerpo anti-HLA-DR, se inhibió el crecimiento de las células. Además, las células E04.1 mostraban una respuesta proliferativa contra células B-LCL(-) estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ tratadas con otro anticuerpo, pero no mostraban respuesta proliferativa contra células B-LCL(-) no estimuladas con el péptido. 50 Estos resultados demuestran que el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ se une específicamente a HLA-DR entre moléculas de HLA e induce el crecimiento de la línea celular E04.1 positiva para CD4 específica para péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇.

Ejemplo 6

Unión específica de péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ a HLA-DRB1*0405

55 Se prepararon PBMC a partir de sangre de un voluntario sano positivo o negativo para HLA-DRB1*0405 de una forma similar al Ejemplo 4. Después, las PBMC se estimularon con 20 μ g/ml de péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ y se sometieron a irradiación con rayos X, y se sembraron en una placa de 96 pocillos a 3×10^4 células/pocillo. Después, las células E04.1 se sembraron en la placa de 96 pocillos a 1×10^4 células/pocillo y las células se cocultivaron. Como grupo de control negativo, se cocultivaron PBMC no estimuladas con el péptido y células E04.1.

65 Después del cocultivo, se midió el crecimiento de células E04.1 de una forma similar al Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Fig. 1. El Donante 1 (HLA-DRB1*0405/0803) y el Donante 2 (HLA-DRB1*0405/0101) son positivos para HLA-DRB1*0405, y las células E04.1 cocultivadas con PBMC aisladas de cada donante y estimuladas con

péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ mostraban una respuesta proliferativa. Por otro lado, el Donante 3 (HLA-DRB1*0101/1001) y el Donante 4 (HLA-DRB1*1201/0802) son negativos para HLA-DRB1*0405, y las células E04.1 cocultivadas con PBMC aisladas de cada donante y estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ no mostraban una respuesta proliferativa. Además, en todos los casos, no se observó respuesta proliferativa cuando se usaron PBMC no estimuladas con el péptido.

5 Los resultados anteriores demuestran que el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ se une a HLA-DRB1*0405 entre las moléculas de HLA-DRB1 que muestran polimorfismo, e induce el crecimiento de la línea celular positiva para CD4 específica de WT1₃₃₂₋₃₄₇ E04.1.

Ejemplo 7

Presentación de antígeno de péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ a HLA-DRB1*0405

Células B-LCL(-) (línea celular B) y células B-LCL(+) (línea celular B que expresa WT1) que se establecieron a partir de sangre de un voluntario sano positivo para HLA-DRB1*0405 como se ha descrito en el Ejemplo 3, se sometieron cada una a irradiación con rayos X y se sembraron en placas de 96 pocillos a 3×10^4 células/pocillo. Las células E04.1 se sembraron en cada pocillo a 1×10^4 células y se cocultivaron. La respuesta de crecimiento de las células E04.1 se midió después de una forma similar al Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Fig. 7. Las células E04.1 mostraban una respuesta proliferativa cuando se cocultivaban con células B-LCL(+) que expresaban WT1, pero no cuando se cocultivaban con células B-LCL(-) que no expresaban WT1.

A continuación, células B-LCL(-) o B-LCL(+) (1×10^5 células de cada) en las que se había inducido apoptosis se cocultivaron durante 16 horas con células dendríticas (3×10^4 células) preparadas a partir de sangre de un voluntario sano positivo para HLA-DRB1*0405 de una forma similar al Ejemplo 4, se sembraron en un pocillo de una placa de 96 pocillos y se cocultivaron con células E04.1 (1×10^4 células). La respuesta de crecimiento de las células E04.1 se midió después de una forma similar al Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 8. Las células E04.1 mostraban una respuesta proliferativa cuando se cocultivaban con células dendríticas estimuladas con células B-LCL(+) con apoptosis inducida, pero no cuando se cocultivaban con células dendríticas estimuladas con células B-LCL(-) con apoptosis inducida. Estos resultados indican que el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ se genera primero a través de la degradación de proteína WT1 en células B-LCL(+), después se presenta a HLA-DRB1*0405 e induce la proliferación de células E04.1.

La inducción de apoptosis en células B-LCL(-) y B-LCL(+) se realizó por choque osmótico. En concreto, se suspendieron 1×10^6 células en 500 μ l de un medio hiperosmótico (medio RPMI que contenía sacarosa 0,5 M, polietilenglicol 1000 al 10% p/v y HEPES 10 mM, pH 7,2) y se dejaron reposar a 37°C durante 10 minutos. El cultivo se diluyó después 30 veces con un medio hipoosmótico (RPMI al 60%, agua al 40%) previamente ajustado a 37°C y se dejó reposar a 37°C durante 2-3 minutos. Las células se recogieron por centrifugación a temperatura ambiente durante 5 minutos y se usaron como células con apoptosis inducida. La inducción de apoptosis se confirmó mediante un colorante fluorescente para tinción de células muertas (Yoduro de Propidio y Anexina V, es decir, un reactivo de unión a fosfatidil serina).

Ejemplo 8

Activación de células E04.1 con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇

Células dendríticas preparadas a partir de sangre de un voluntario sano positivo para HLA-DRB1*0405 de una forma similar al Ejemplo 4 se estimularon con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇, se mezclaron con células E04.1 y se cultivaron durante 24 horas. Como grupo de control negativo, se mezclaron células dendríticas no estimuladas con el péptido con células E04.1. Después de 24 horas de cultivo, se añadió Brefeldina A a una concentración final de 10 μ g/ml para inhibir la exocitosis de células E04.1. Además, se recuperaron las células T positivas para CD4 después del cultivo durante otras 6 horas, y se fijaron con PBC que contenía formaldehído al 2% y se trataron mediante solución de permeabilización que contenía saponina al 0,1% para aumentar la permeabilidad de membrana celular del anticuerpo. Las células tratadas se tiñeron después intracelularmente por tratamiento con anticuerpo anti-IFN- γ marcado con PE (BD PharMingen) y anticuerpo anti-IL-4 marcado con FITC (BD PharMingen), y se analizaron usando un citómetro de flujo. Los resultados se muestran en la Fig. 9. Se puso de manifiesto que las células E04.1, cuando se cocultivaban con células dendríticas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇, se inducían fuertemente a producir IFN- γ , que es una citocina de tipo Th-1, pero no a producir IL-4, que es una citocina de tipo Th-2.

Se tiñeron células E04.1 sin estimular por tratamiento con anticuerpo anti-CD4 y anticuerpo anti-CXCR3 y se analizaron mediante un citómetro de flujo. Los resultados se muestran en la Fig. 10. Se puso de manifiesto que más del 90% de las células E04.1 son células T positivas para CD4 del tipo Th-1 que son positivas para CD4 y CXCR3. Se sabe que CXCR3 es un receptor de quimiocina que se expresa mucho en inmunocitos de tipo Th-1.

Los resultados anteriores indican que el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ activa células E04.1, la línea de celular positiva para CD4 específica de WT1₃₃₂₋₃₄₇, e induce a las células a producir IFN- γ , que es una citocina de tipo Th-1. Estos resultados demuestran que el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ se activa y hace que las células T positivas para CD4 se diferencien en tipo

Th-1.

Ejemplo 9

5 Aumento de la inducción y activación de CTL específicos de WT1 por péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇

Las PBMC se prepararon usando sangre del mismo voluntario sano (HLA-A*2402/1101, DRB1*0405/0803) al uso para el establecimiento de células E04.1 de una forma similar al Ejemplo 4, y se sembraron en una placa de cultivo de 24 pocillos a 3×10^4 células/pocillo. Al pocillo se añadió péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ (SEC ID N°: 27) y células E04.1 de las formas siguientes, y la placa se cultivó a 37°C durante 7 días. Péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ (20 µg/ml); péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ (20 µg/ml) + péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ (20 µg/ml); péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ (20 µg/ml) + células E04.1 ($1,5 \times 10^6$ células/pocillo); o péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ (20 µg/ml) + péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ (20 µg/ml) + células E04.1 ($1,5 \times 10^6$ células/pocillo). Como medio, se usó medio X-VIVO 15™ que contenía suero AB al 10%. El péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ usado aquí es un péptido antigénico de cáncer que tiene actividad de inducción de CTL restringidos por HLA-A*2402 (documento WO2004/024175).

Después de un cultivo de 7 días, se recuperaron las células y se tiñeron la mitad de las células usando anticuerpo anti-CD8 (BD PharMingen) y péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃/tetrámero marcado con PE específico de HLA-A*2402, y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Fig. 11 (A-D). Se ha descrito que la estimulación de PBMC con péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ conduce a la inducción de precursores de CTL específicos de péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ positivos tanto para CD8 como para péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃/HLA-A*2402 (Cancer Immunol Immunother, 51 págs. 614-620 (2002)). Cuando se estimularon PBMC con péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ solamente, el porcentaje de precursores de CTL específicos de péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ era del 0,12% (Fig. 11-A). Cuando la estimulación se realizó usando péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ más péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇, el porcentaje de precursores de CTL específicos de péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ aumentaba hasta el 0,69% (Fig. 11-B). Cuando la estimulación se realizó usando péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ más células E04.1, el porcentaje de precursores de CTL específicos de péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ aumentaba adicionalmente hasta el 4,51% (Fig. 11-C). Cuando la estimulación se realizaba usando péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ más péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ más células E04.1, el porcentaje de precursores de CTL específicos de péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ aumentaba todavía más hasta el 7,12% (Fig. 11-D).

Otra mitad de las células recuperadas (3×10^5 células) se cocultivaron durante 6 horas con células dendríticas estimuladas con péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ y sometidas a irradiación con rayos X (30 Gy). Una hora después del inicio del cultivo, se añadió Brefeldina A para inhibir la exocitosis de las células. El cultivo se continuó durante otras 5 horas y las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD8 y péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃/tetrámero marcado con PE específico de HLA-A*2402. Las células se fijaron y se trataron con una solución de permeabilización para aumentar la permeabilidad de membrana celular, y se tiñeron intracelularmente mediante anticuerpo anti-IFN-γ marcado con PE de una forma similar al Ejemplo 8. Como grupo de control negativo, las células se tiñeron con anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con APC (BD PharMingen) y las poblaciones celulares positivas para tanto IFN-γ como IgG de ratón se excluyeron como tinción inespecífica.

Los resultados se muestran en la Fig. 12 (A-D). Cuando los precursores de CTL específicos de péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ se estimulan con péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ durante 6 horas, se inducen CTL que son específicos para péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ activado y son positivos para CD8, péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃/HLA-A*2402 e IFN-γ. Cuando la estimulación se realizó usando péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ solamente, el porcentaje de CTL específicos para péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ activado era del 17,0% (Fig. 12-A). Cuando la estimulación se realizó usando péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ más péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇, el porcentaje de CTL específicos para péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ activado se aumentó hasta el 23,3% (Fig. 12-B). Cuando la estimulación se realizó usando péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ más células E04.1, el porcentaje de CTL específicos para péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ activado se aumentó hasta el 25,7% (Fig. 12-C). Cuando la estimulación se realizó usando péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ más péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ más células E04.1, el porcentaje de CTL específicos para péptido WT1₂₃₅₋₂₄₃ activado se aumentó hasta el 39,0% (Fig. 12-D).

A partir de los resultados anteriores, se puso de manifiesto que el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ es un péptido auxiliar que aumenta la inducción y la activación de precursores de CTL específicos de WT1. También se puso de manifiesto que la célula E04.1 es una célula T auxiliar que potencia la activación de CTL específicos de WT1 y que su función auxiliar se aumenta por péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ y la activación de CTL específicos de WT1 se potencia.

Ejemplo 10

Investigación sobre la naturaleza promiscua del péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇

Se examinó si el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ también puede unirse a una molécula de HLA-DRB1*1502, que se dice que poseen muchos japoneses, e inducir células T positivas para CD4 específicas de WT1₃₃₂₋₃₄₇ como un péptido auxiliar promiscuo.

1. Método experimental

1) Preparación de células dendríticas (DC)

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre periférica de un voluntario sano (HLA-DRB1*1502/1403) y se sembraron en una placa de plástico de 6 pocillos usando suero de tipo AB al 1% (Nabi, Miami, FL) y medio X-VIVO 15™ (Cambrex) a 1×10^7 células/pocillo y se cultivaron durante 2 horas. Después de eliminar las células no adherentes, las células adherentes restantes se cultivaron en un medio que contenía IL-4 1000 UI/ml (PeproTech), GM-CSF 1000 UI/ml (PetroTech), suero de tipo AB al 1% y medio X-VIVO 15™. Los días 2 y 4, el medio se cambió y se añadió IL-4 y GM-CSF, y el día 6 se añadió TNF- α hasta 100 UI/ml para hacer madurar las células dendríticas.

2) Inducción de células T positivas para CD4 específicas de WT1₃₃₂₋₃₄₇

Se aislaron células T positivas para CD4 a partir de sangre del mismo voluntario usando RosetteSep (StemCell) para separar células T positivas para CD4. Las células T positivas para CD4 resultantes se sembraron en una placa de 24 pocillos a 3×10^6 células/pocillo y se estimularon con células dendríticas autólogas (3×10^5 células) estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ (20 μ g/ml) y sometidas a irradiación con radiación (25 Gy). El día siguiente a la estimulación, se añadió IL-2 hasta 20 UI/ml. De una forma similar, las células T positivas para CD4 estimuladas se estimularon cada semana con células dendríticas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ (20 μ g/ml). Además, se realizó un cambio de medio usando medio que contenía IL-2 cada dos días después de la segunda estimulación. En los experimentos, las células T positivas para CD4 inducían 3 veces de estimulación en total.

3) Ensayo de crecimiento

Se realizó un ensayo de crecimiento mediante el método de incorporación de [³H]-timidina. Células T positivas para CD4 inducidas por estimulación con un péptido (3×10^4 células; respondedoras) se cocultivaron con PBMC estimuladas con un péptido seleccionado de los péptidos WT1₃₃₂₋₃₄₇, WT1₁₇₂₋₁₈₆ y WT1₂₂₅₋₂₄₃ y sometidas a irradiación con radiación (1×10^5 células, "estimuladoras") en una placa de 96 pocillos. Como control negativo, se usaron DC(-) no estimuladas con un péptido. Después de un cocultivo de 80 horas, se añadió [³H]-timidina (Amersham Biosciences) a 37 kBq/pocillo. La placa se incubó durante otras 16 horas y se midió con un contador de centelleo β . La unidad de medición es "recuentos por minuto (cpm)" y cada ensayo se llevó a cabo por triplicado.

4) Análisis de la producción de citocinas por citometría de flujo

De la misma forma que en el ensayo de crecimiento, se cocultivaron células T positivas para CD4 con estimuladoras durante 2 horas y a las mismas se añadió Brefeldina A. Cuatro horas después, se recuperaron las células, se sometieron a tratamiento para fijación y permeación, se tiñeron con anticuerpo anti-IL-4 marcado con FITC (BD Pharmingen) y anticuerpo anti-IFN- γ marcado con PE (BD Pharmingen) y se analizaron mediante citometría de flujo.

5) Ensayo de ELISA

PBMC (6×10^5 células) estimuladas o no estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ se trataron mediante irradiación con radiación (25 Gy) y cada grupo de células se cocultivó con células T positivas para CD4 inducidas con WT1₃₃₂₋₃₄₇ (6×10^5 células). Después de 72 horas de cultivo, se recuperó el sobrenadante y se usaron 300 μ l de la solución para la medición de IL-4 e IFN- γ .

6) Ensayo de repertorio de TCR

El repertorio de cadena β de receptor de célula T (TCR) para células T positivas para CD4 inducidas por péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ se analizó usando el kit de repertorio de V β de TCR (BECKMAN COULTER), FACsort (BECTON DICKINSON).

2. Resultados experimentales

Células T positivas para CD4 aisladas de sangre de un voluntario sano (HLA-DRB1*1502/1403) se estimularon tres veces en total con células dendríticas autólogas estimuladas con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇. Las células T positivas para CD4 así inducidas se examinaron para determinar la especificidad del péptido por ensayo de crecimiento usando cada uno de los péptidos WT1₁₇₂₋₁₈₆, WT1₂₂₅₋₂₄₃ y WT1₃₃₂₋₃₄₇. Como resultado, las células T positivas para CD4 inducidas por péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ no proliferaban en ausencia del péptido o bajo la estimulación con WT1₁₇₂₋₁₈₆ o WT1₂₂₅₋₂₄₃, pero proliferaban para convertirse en aproximadamente 10 veces más cuando se estimulaban con WT1₃₃₂₋₃₄₇ (Fig. 13). A partir de estos resultados, las células T positivas para CD4 inducidas tenían una especificidad por WT1₃₃₂₋₃₄₇.

Las células T positivas para CD4 inducidas por péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ se sometieron a ensayo de repertorio de TCR. Los resultados se muestran en la Fig. 14. Las células que tenían V β 3 y las que tenían V β 20 eran dominantes y

cada una representaba el 10% del total.

5 Se separaron estas células T positivas para CD4 dominantes por separación y la línea celular que tenía Vβ3 se denominó sublínea E15.1, mientras que la que tenía Vβ20 sublínea E15.2. De estas dos líneas celulares, la sublínea E15.2 mostraba mayor sensibilidad a péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ (Fig. 15).

10 La sublínea E15.2 se estimuló después con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ y la IL-4 y el IFN-γ secretados se midieron por un método de tinción intracelular. Como resultado, se puso de manifiesto que el IFN-γ (citocina de tipo Th-1) y no la IL-4 (citocina de tipo Th-2) se producían de forma dominante por dicha línea celular (Fig. 16). También se puso de manifiesto que la respuesta proliferativa específica de WT1₃₃₂₋₃₄₇ de la sublínea E15.2 depende de la concentración de WT1₃₃₂₋₃₄₇ (Fig. 17). Estos resultados indicaban que la sublínea E15.2 es una línea celular T positiva para CD4 de tipo Th-1 específica para WT1₃₃₂₋₃₄₇.

15 Como se ha mencionado anteriormente, era posible inducir líneas celulares T positivas para CD4 de tipo Th-1 específicas para WT1₃₃₂₋₃₄₇ a partir de células T positivas para CD4 obtenidas de un voluntario sano que es positivo para la molécula de HLA-DRB1*1502 pero negativo para la molécula de HLA-DRB1*0405. Basándose en estos resultados, se considera que dichas células T positivas para CD4 participan en la inmunidad celular y pueden activar CTL a través de la secreción de citocinas. Por lo tanto, se demostró que los efectos antitumorales pueden aumentarse adicionalmente usando WT1₃₃₂₋₃₄₇ en combinación con péptido WT1 restringido por HLA de clase I (péptido antigénico de cáncer) capaz de activar CTL.

25 PBMC obtenidas de un voluntario sano positivo para HLA-DRB1*1502 (1502/0901) o un voluntario sano negativo para HLA-DRB1*1502 (1302/0803) se estimularon con péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ para obtener estimuladoras. Cada una de estas estimuladoras se cocultivó con la sublínea E15.2 y se analizó para determinar la proliferación específica de WT1₃₃₂₋₃₄₇ por ensayo de crecimiento. Los resultados se muestran en la Fig. 18. En un voluntario sano positivo para HLA-DRB1*1502, se observó proliferación específica de WT1₃₃₂₋₃₄₇, pero en un voluntario sano negativo para HLA-DRB1*1502, no se observó proliferación (Fig. 18). Esto indicaba que la proliferación específica de WT1₃₃₂₋₃₄₇ de la sublínea E15.2 está restringida por HLA-DRB1*1502.

30 Como se ha descrito anteriormente, el análisis realizado usando la sublínea E15.2 que es una línea celular T positiva para CD4 de tipo Th-1 específica para el péptido WT1₃₃₂₋₃₄₇ demostró que WT1₃₃₂₋₃₄₇ es un péptido auxiliar promiscuo que se une, no sólo a la molécula de HLA-DRB1*0405, sino también a la molécula de HLA-DRB1*1502, moléculas que se encuentran en la primera y tercera frecuencias, respectivamente, entre los japoneses.

35 **Aplicabilidad industrial de la invención**

40 La presente invención proporciona un péptido antigénico de unión a HLA-DRB1*0405 derivado de WT1, un polinucleótido que codifica dicho péptido, un inductor de células T auxiliares que comprende dicho péptido o polinucleótido y similares. El inductor de células T auxiliares de la presente invención es útil como potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer. El potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer de la presente invención es aplicable a muchos pacientes con cáncer positivos para HLA-DRB1*0405 y, en particular, útil como potenciador de la eficacia de una vacuna de WT1.

45 **Listado de secuencias**

- 45 <110> International Institute of Cancer Immunology, Inc.
- <120> PÉPTIDO ANTIGÉNICO DE UNIÓN A HLA-DR DERIVADO DE WT1
- 50 <130> M1826EP/1 S3
- <140> EP 04 79 9497.5
- <141> 04-11-2004
- 55 <150> JP 2003/375603
- <151> 05-11-2003
- <160> 56
- 60 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 449
- <212> PRT
- 65 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
 50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 435 440 445

Leu

5 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 2

Leu Val Arg His His Asn Met His Gln
 1 5

15 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 3

Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu
 1 5

30 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 4

Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln
 1 5

40 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

50

<400> 5

Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser
1 5

5 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 6

15

Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu
1 5

20 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 7

Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp
1 5

30

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

35

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 8

Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn
1 5

45 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 9

Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly
1 5

55

ES 2 378 264 T3

5 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
10 <400> 10

Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu
1 5

15 <210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
20 <400> 11

Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His
1 5

25 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
30 <400> 12

Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met
1 5

35 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
40 <400> 13

Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln Met
1 5

45 <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 14

5

Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg
 1 5

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

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 15

Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly
 1 5

20

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

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

30

<400> 16

Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe Ser
 1 5

35

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

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 17

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly
 1 5

45

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 18

Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu
1 5

5 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 19

Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly
1 5

15 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 20

Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
1 5

30 <210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 21

Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala
1 5

40 <210> 22
<211> 9
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 22

Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn
1 5

55 <210> 23

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

10 <400> 23

Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys
 1 5

15 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 24

Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His
 1 5 10 15

25 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

35 <400> 25

Pro Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly
 1 5 10 15

40 <210> 26
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 26

50 **Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln**
 1 5 10 15

Met Asn Leu

<210> 27
 <211> 9

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 27

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
1 5

10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

15

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

20

<400> 28

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
1 5

25

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

35

<400> 29

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

40

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

45

<400> 30

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe
1 5

50

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<221> fuente

ES 2 378 264 T3

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 31

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
1 5

5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 32

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
1 5

20

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<223> Xaa en la posición 1 representa Abu.

30

<400> 33

Xaa Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
1 5

35

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 34

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
1 5

45

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

55

<400> 35

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
1 5

5 <210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 36

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

15 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 37

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
1 5

30 <210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 38

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
1 5

40 <210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 39

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu
1 5

55 <210> 40

ES 2 378 264 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

10 <400> 40

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
1 5

15 <210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 41

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe
1 5

25 <210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

35 <400> 42

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe
1 5

40 <210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
<223> Xaa en la posición 5 representa Abu.

50 <400> 43

Arg Tyr Pro Ser Xaa Gln Lys Lys Phe
1 5

55 <210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

5 <400> 44

Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

10 <210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 45

Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val
1 5

20 <210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 46

Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe
1 5

30 <210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 47

Leu Val Arg His His Asn Met His Gln
1 5

40 <210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 48

Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys
1 5

5 <210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 49

Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr
1 5

15 <210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 50

Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met
1 5

30 <210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 51

Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys
1 5

40 <210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 52

Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr
1 5

ES 2 378 264 T3

5 <210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

10 <400> 53

Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr
1 5

15 <210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

20 <400> 54

Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro
1 5

25 <210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

30 <400> 55

Val Arg His His Asn Met His Gln Arg
1 5

40 <210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

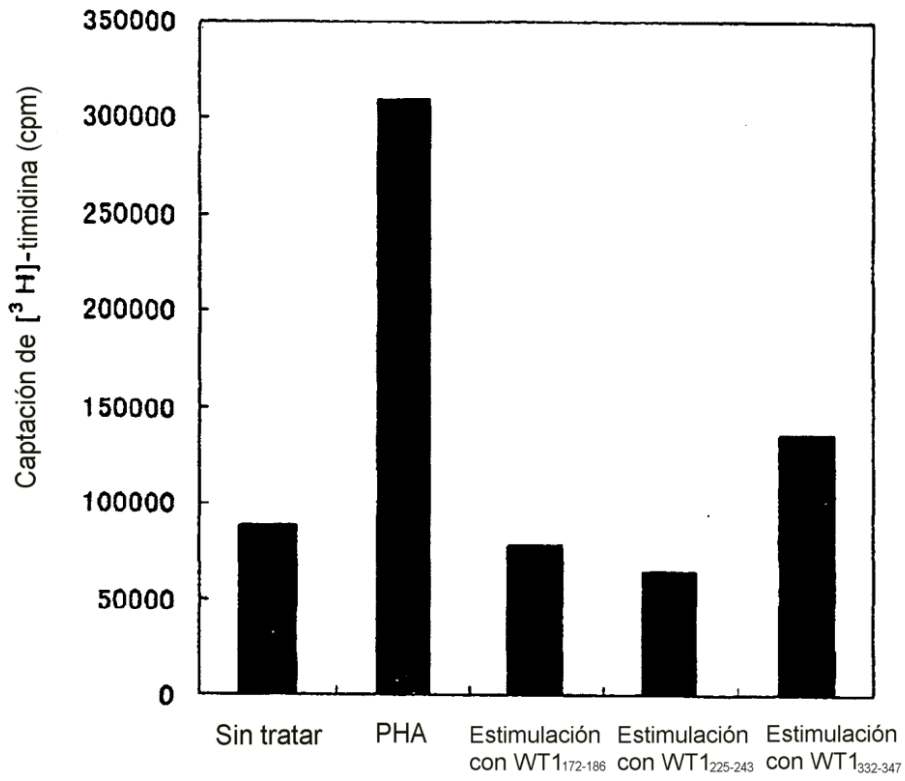
45 <400> 56

Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser
1 5

REIVINDICACIONES

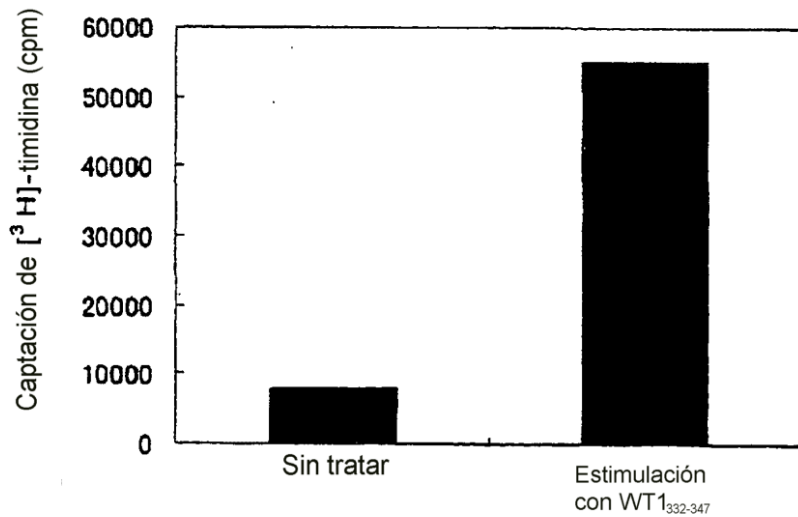
1. Un péptido de una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 24.
- 5 2. Un polinucleótido que codifica el péptido descrito en la reivindicación 1.
3. Un vector de expresión que contiene el polinucleótido descrito en la reivindicación 2.
- 10 4. Una célula que contiene el vector de expresión descrito en la reivindicación 3.
5. Un proceso para producir el péptido descrito en la reivindicación 1, que comprende cultivar la célula descrita en la reivindicación 4, con la condición de que pueda expresarse el péptido.
- 15 6. Un anticuerpo que se une específicamente al péptido descrito en la reivindicación 1.
7. Una composición farmacéutica que comprende el péptido descrito en la reivindicación 1, un vector de expresión descrito en la reivindicación 3 o una célula descrita en la reivindicación 4, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, que es un agente terapéutico o preventivo para el cáncer.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, que es un inductor de células T auxiliares.
- 25 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, que es un potenciador de la eficacia de vacunas contra el cáncer.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que la vacuna contra el cáncer es una vacuna de péptido antigénico de cáncer.
- 30 12. Uso del péptido descrito en la reivindicación 1, un vector de expresión descrito en la reivindicación 3 o una célula descrita en la reivindicación 4, para la fabricación de un agente terapéutico o preventivo para el cáncer.
13. Una composición farmacéutica que comprende el péptido descrito en la reivindicación 1 en combinación con un péptido antigénico de cáncer.
- 35 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, que se usa para tratar o prevenir el cáncer.
15. Uso de un péptido de la reivindicación 1 en combinación con un péptido antigénico de cáncer en la fabricación de un agente terapéutico o preventivo para el cáncer.
- 40

Fig. 1



Tratamiento de células dendríticas para estimulación

Fig. 2



Células dendríticas para estimulación

Fig. 3

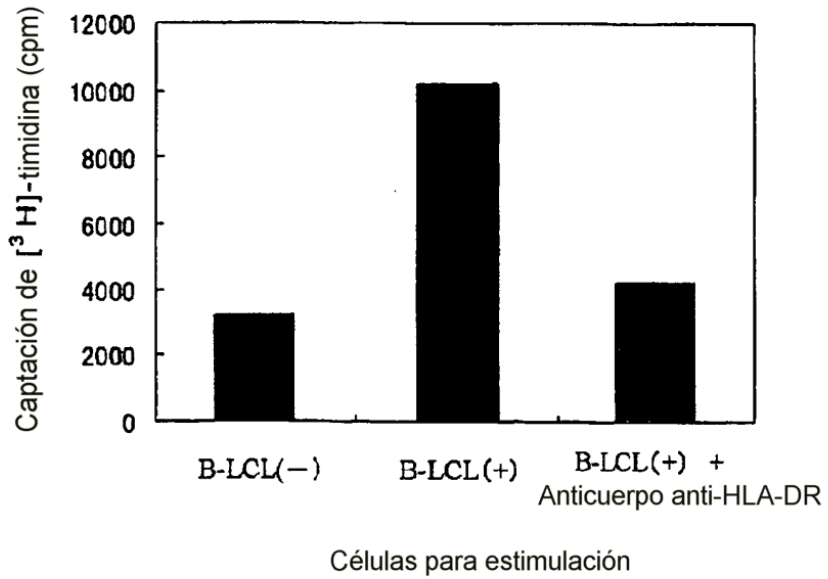


Fig. 4

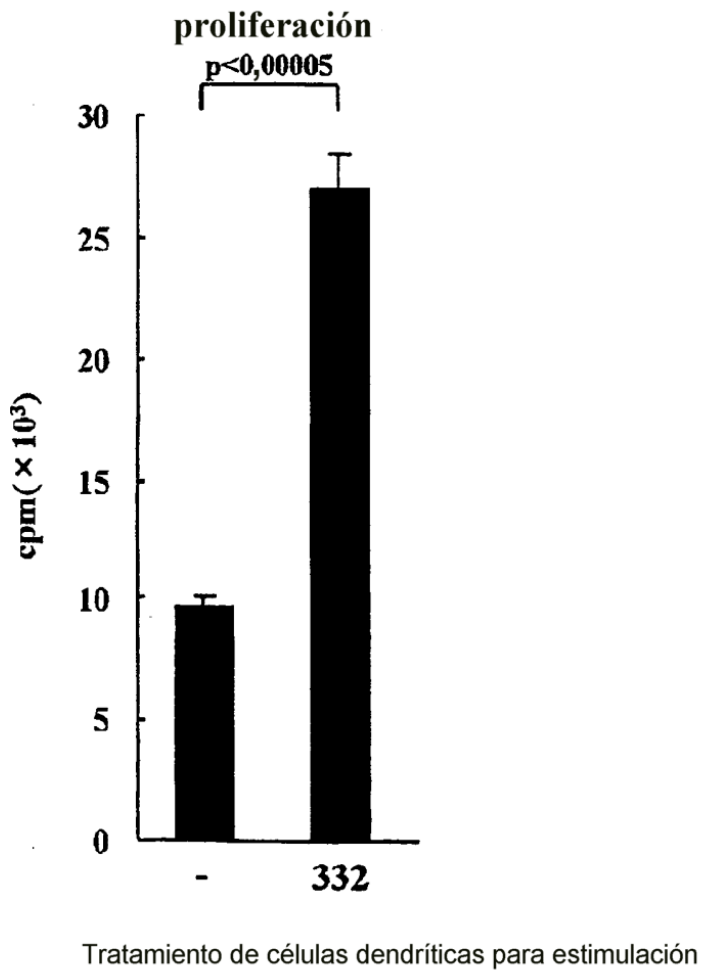
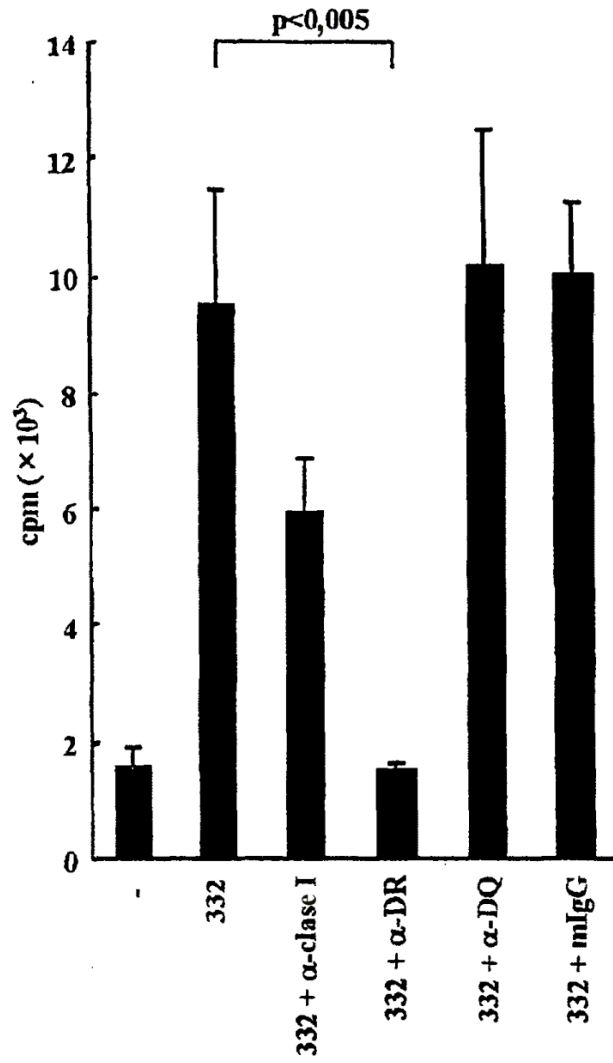
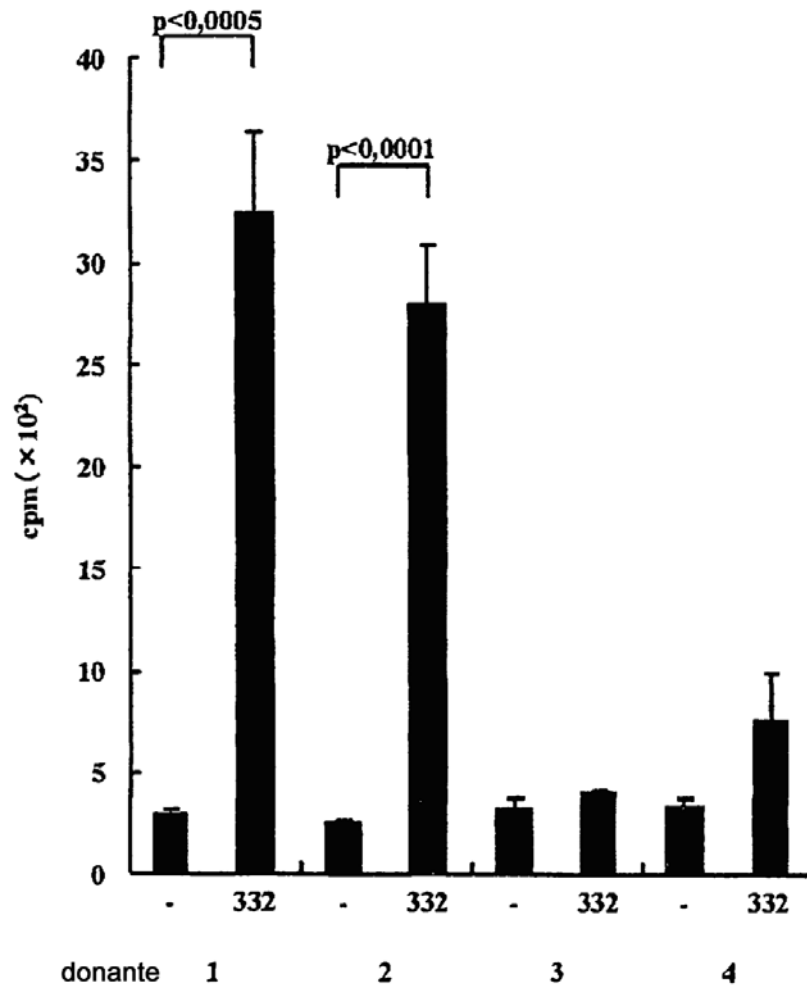


Fig. 5



Tratamiento de células dendríticas para estimulación

Fig. 6



Tratamiento de células dendríticas para estimulación

Fig. 7

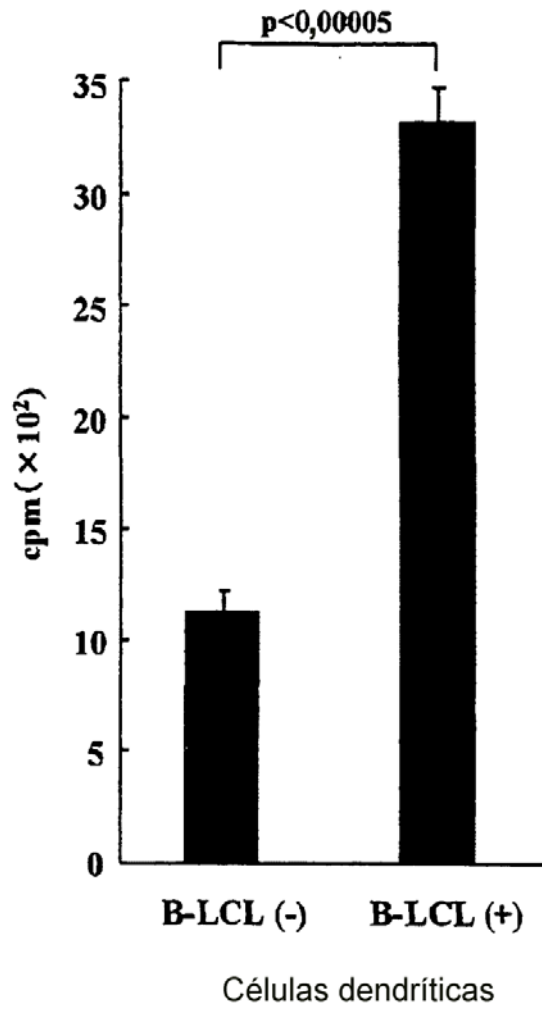


Fig. 8

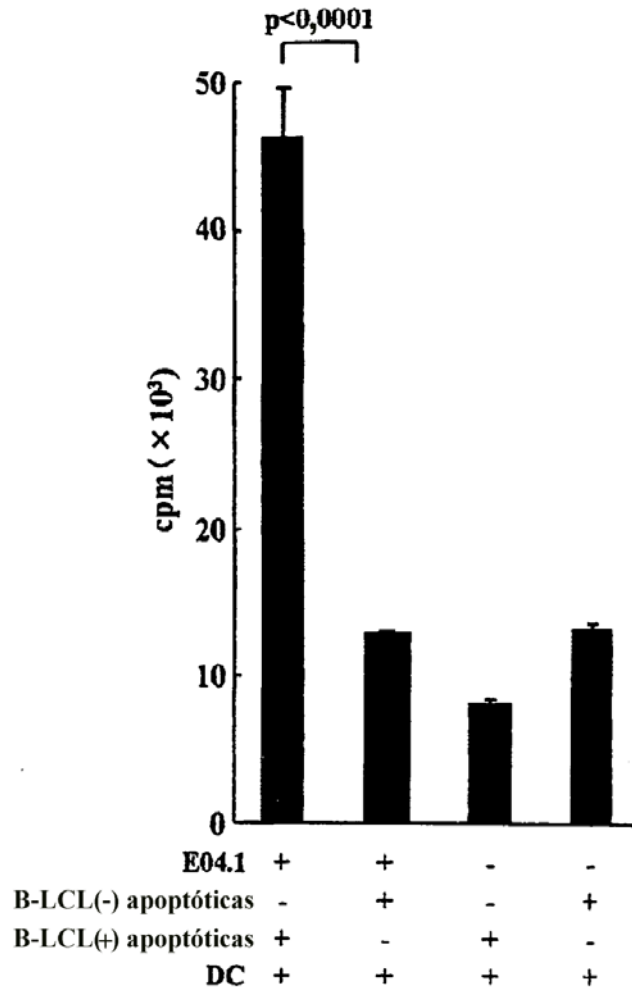
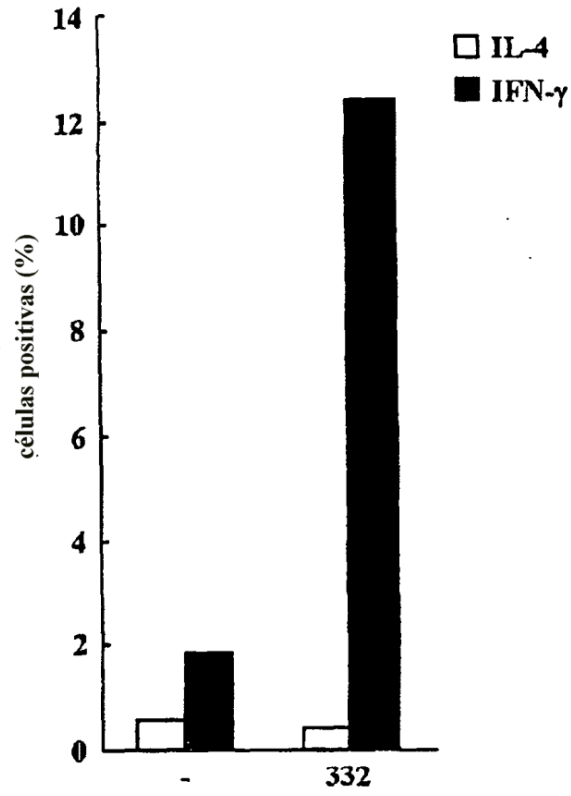


Fig. 9



Tratamiento de células dendríticas para estimulación

Fig. 10

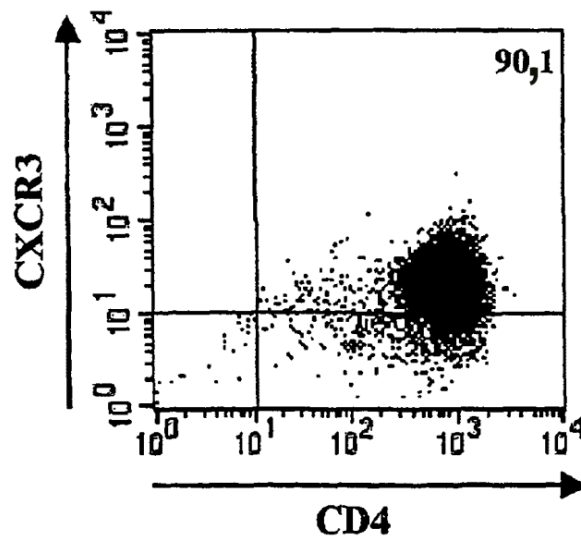


Fig. 11

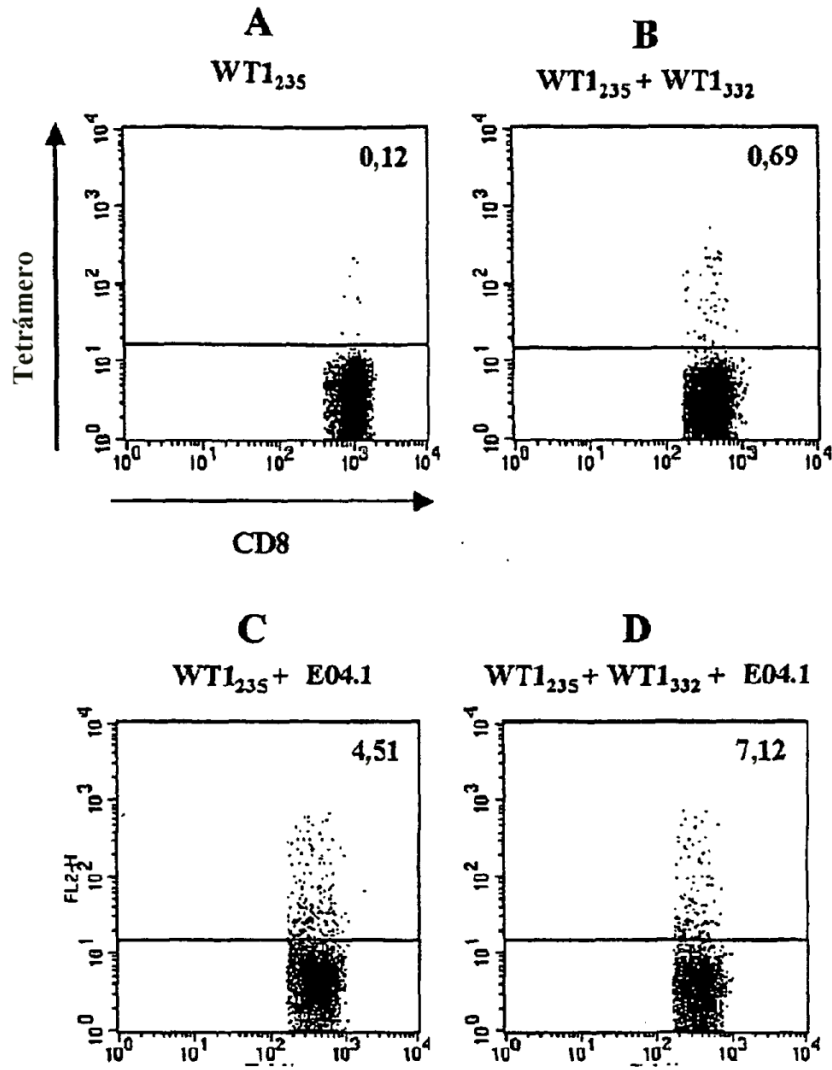


Fig. 12

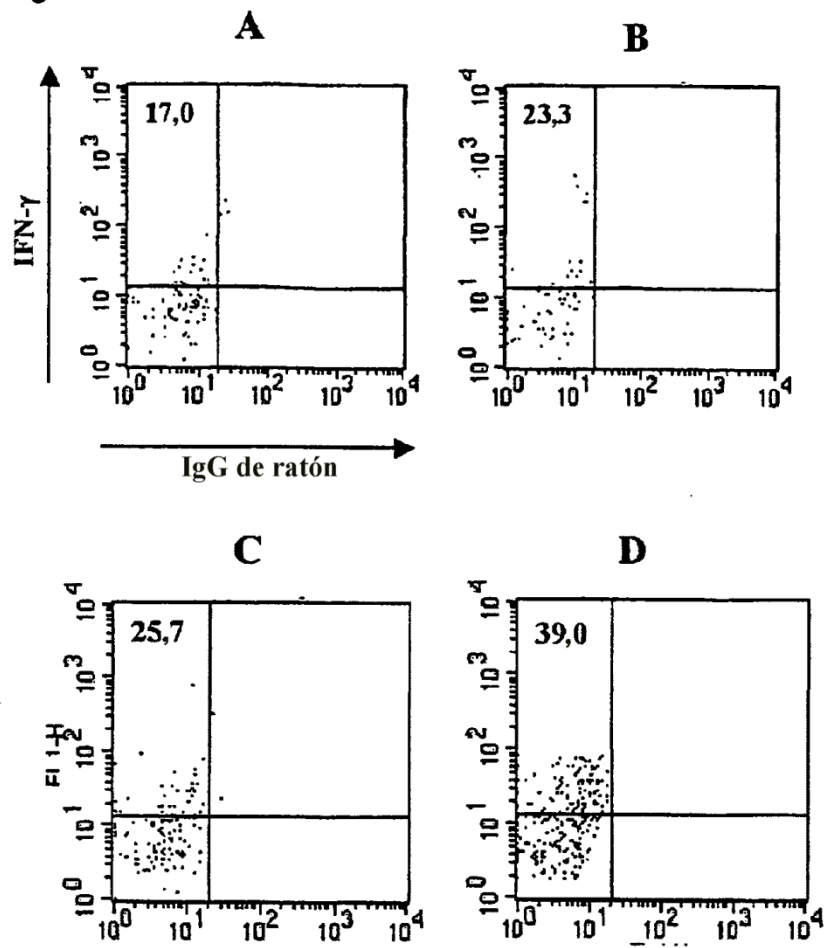


Fig. 13

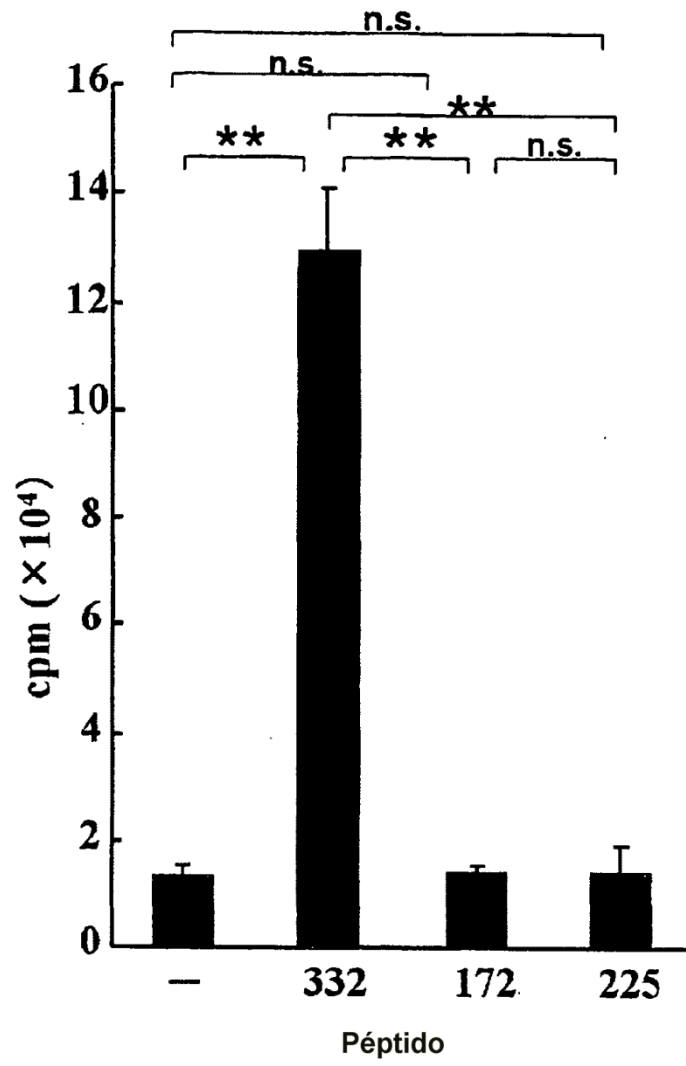


Fig. 14

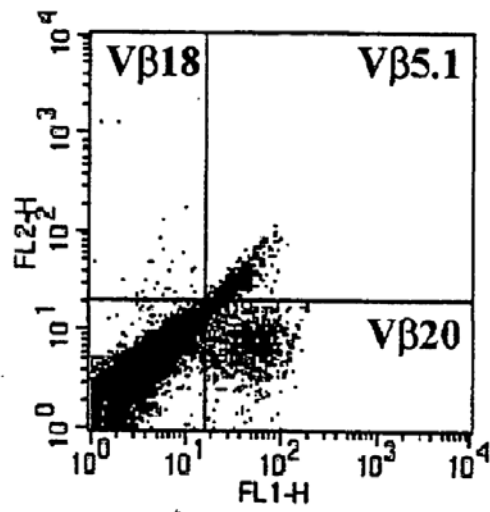
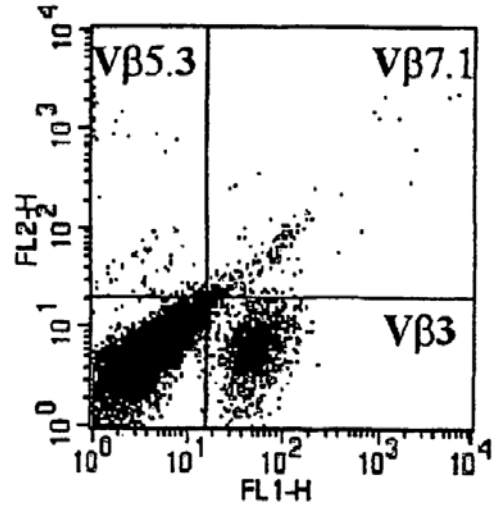


Fig. 15

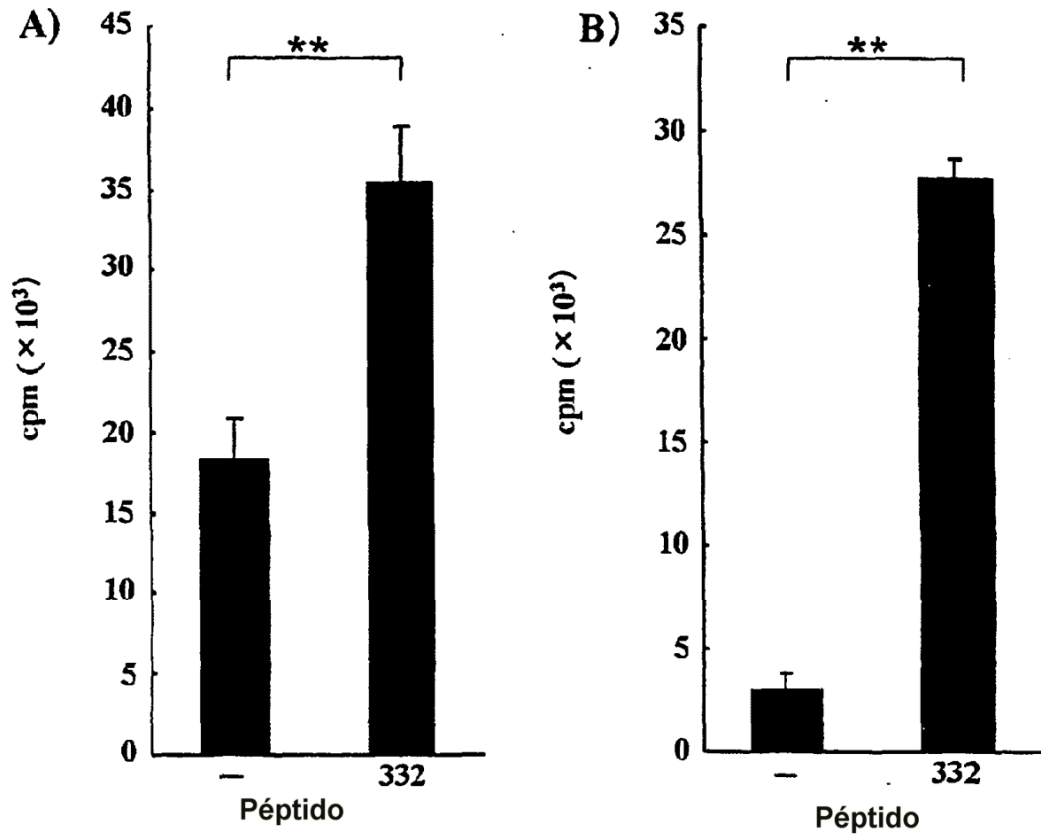


Fig. 16

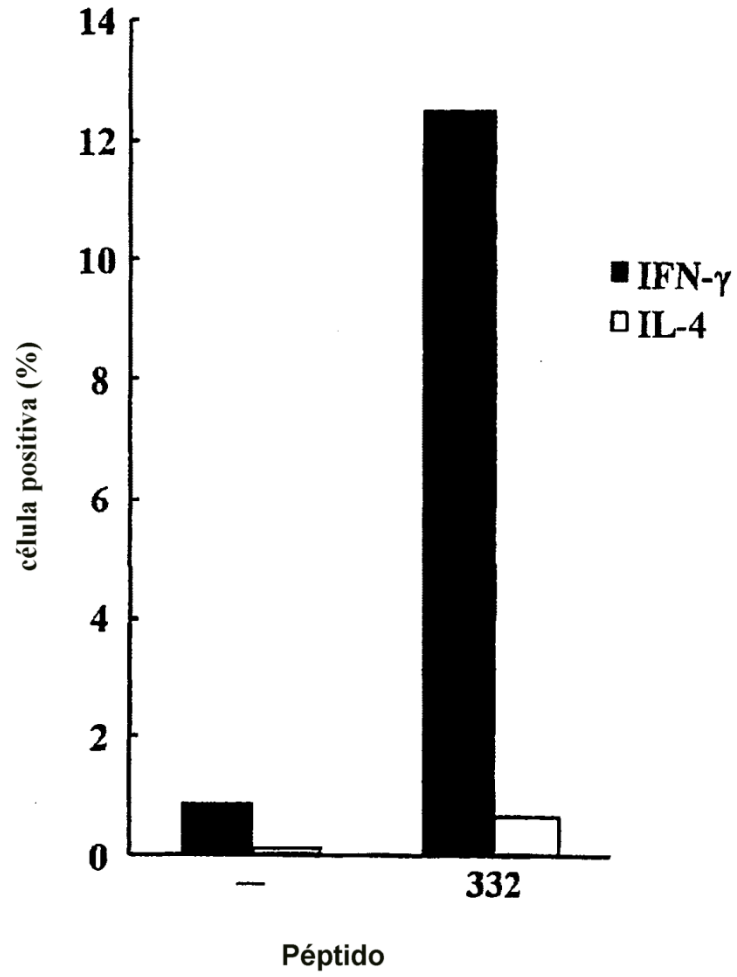


Fig. 17

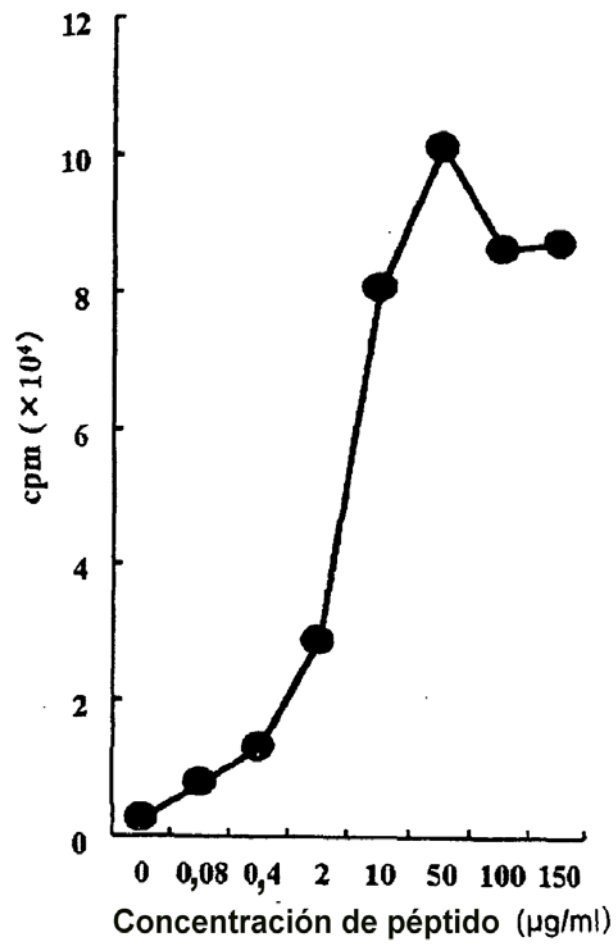


Fig. 18

