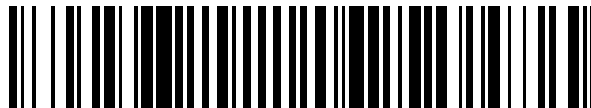


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 184**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/08** (2006.01)  
**A61K 39/09** (2006.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**C12P 21/06** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2004 E 04812790 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1708732**

54 Título: **Análogos de péptidos de unión a HLA sintéticos y sus usos**

30 Prioridad:

**01.12.2003 US 525955 P**

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

**29.04.2013**

73 Titular/es:

**SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER  
RESEARCH (100.0%)  
1275 YORK AVENUE  
NEW YORK 10021, US**

72 Inventor/es:

**SCHEINBERG, DAVID y  
PINILLA-IBARZ, JAVIER**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 402 184 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

Análogos de péptidos de unión a HLA sintéticos y sus usos.

**Antecedentes de la invención**Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de la inmunología y la terapia de la leucemia. De forma más específica, esta invención se refiere a péptidos análogos sintéticos, según se definen en la reivindicación 1, que pueden inducir respuestas de células T humanas heteroclíticas contra péptidos nativos de los análogos sintéticos.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 La leucemia mielógena crónica (CML) es un trastorno de las células precursoras pluripotenciales que se caracteriza por la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph). El cromosoma Filadelfia representa una translocación en la que el oncogén c-abl se ha movido desde el cromosoma 9 a la región de agrupamiento de los puntos de corte (bcr) dentro del gen bcr en el cromosoma 22, que produce un gen bcr-abl quimérico. Los genes fusionados codifican un ARNm quimérico de 8,5 kb que normalmente se traduce en una proteína de 210 kDa o 190 kDa. Esta proteína bcr-abl es una tirosina quinasa que está presente exclusivamente en las células de leucemia de pacientes con leucemia mielógena crónica, y es necesaria y suficiente para la transformación.

- 15 En la leucemia mielógena crónica, el punto de corte en el gen bcr aparece entre el exón 2 (b2) y 3 (b3) de bcr, o entre el exón 3 (b3) y 4 (b4) de bcr. Aunque pueden aparecer genes de fusión bcr-abl y un corte y empalme del ARNm de bcr-abl aberrantes, la mayoría de los pacientes con leucemia mielógena crónica expresan, por tanto, p210-b3a2 o p210-b2a2; a menudo ambas proteínas p210 y p190 se expresan junto con niveles bajos de proteínas bcr-abl p190-e1a2. En la leucemia linfocítica aguda Ph1-positiva (ALL), el punto de corte predominante está en el sitio e1a2.

- 20 Las proteínas de fusión quiméricas son antígenos potenciales. En primer lugar, las proteínas se expresan exclusivamente en células de leucemia mielógena crónica en las que las regiones de juntas contienen una secuencia de aminoácidos que no se expresa en ninguna proteína normal. En segundo lugar, como resultado de la división de codones en el mensaje condensado, un nuevo aminoácido, lisina en b3a2, y un aminoácido conservado, ácido glutámico en b2a2, están presentes en el punto de fusión exacto en cada una de las proteínas. Por tanto, las secuencias de aminoácidos exclusivas que incluyen la región del punto de corte b3a2 y b2a2 pueden considerarse verdaderamente antígenos específicos de tumor. A pesar de la localización intracelular de estas proteínas, pueden presentarse sobre la superficie celular péptidos cortos producidos mediante el procesamiento celular de los productos de las proteínas de fusión, dentro de la hendidura de las moléculas de HLA y en esta forma puede ser reconocidos por las células T.

- 25 Recientes ensayos clínicos han demostrado que una vacuna multivalente derivada de bcr-abl específica de tumor puede administrarse de modo seguro a pacientes con leucemia mielógena crónica en fase crónica. La vacuna provoca de forma fiable una respuesta inmunológica de CD4 específica del péptido de bcr-abl, según se mide mediante DTH *in vivo*, mediante la proliferación de células T CD4+ *ex vivo*, y mediante la secreción de interferón-gamma en un ensayo ELISPOT. Sin embargo, no se detectaron respuestas de CD8 en pacientes HLA A0201 y sólo se detectaron respuestas débiles en pacientes HLA A0301 utilizando un ensayo ELISPOT de interferón-gamma sensible.

- 30 La proteína tumoral de Wilms 1 (WT1) es un factor de la transcripción de dedo de cinc expresado durante la ontogénesis normal, tal como en el riñón, el testículo y el ovario fetales. En adultos, la expresión de WT1 está limitada a unos niveles bajos en células precursoras hematopoyéticas, células progenitoras mioepiteliales, podocitos renales y algunas células en testículos y ovarios. La reciente demostración de que WT1 se sobreexpresa en varios tipos de leucemia sugiere que WT1 sería una diana atractiva para la inmunoterapia. Se han identificado tres nonámeros peptídicos a partir de WT1 que generan una respuesta citotóxica específica de WT1 en el contexto de HLA 0201 y HLA 2402. Sin embargo, puesto que la proteína WT1 es un autoantígeno, la tolerancia a la rotura es un problema potencial.

- 35 Para la estimulación de respuestas, la potencia de las respuestas CD8 depende de la afinidad de unión del péptido diana a moléculas MHC de clase I, la estabilidad del complejo de péptido-HLA, y la avidéz de la unión del receptor de células T por el complejo del péptido. La destrucción de las células de CML nativas también requiere un procesamiento y presentación adecuados del antígeno natural. Por tanto, la falta de respuestas CD8 reproducibles en estos ensayos clínicos podría ser el resultado de la bioquímica de estas interacciones de HLA-péptido de clase I, que dan como resultado su débil inmunogenicidad frente a células CD8 citotóxicas. No se indicado que ninguno de los péptidos CML nativos se una a MHC humano unido al bolsillo de HLA con alta afinidad. Esto puede explicar, en parte, la falta de respuesta inmunológica detectable frente a péptidos de bcr-abl como proteínas que se observa en pacientes con leucemia mielógena aguda, a pesar de la aparición de este antígeno en las células de CML.

- 5 En algunos sistemas antigénicos se emplean análogos de péptidos para evitar una mala respuesta inmunológica. Se ha descubierto una alta correlación entre las afinidades globales de los análogos de péptidos por moléculas de MHC de clase I y la inmunogenicidad de péptidos *in vivo* en ratones transgénicos HLA-A2Kb. Se ha indicado una correlación mejor entre la capacidad de un péptido para formar complejos HLA-A0201 estables y la inmunogenicidad. También se ha indicado una mejor inmunogenicidad en ratones transgénicos HLA-A0201/Kb para los análogos de un autopéptido, gp100154-162, que muestra una afinidad mayor y una estabilidad del complejo más prolongada que el péptido natural.
- 10 Para diseñar análogos de péptidos se han empleado con éxito varios algoritmos en los que secuencias grandes de proteínas son exploradas para detectar la presencia de motivos de unión adecuados, lo cual ha conducido a la identificación de antígenos predichos que después se han validado de modo experimental. Se han formulado análogos de péptidos antigénicos mediante modificaciones directas de posiciones de anclaje de MHC, que se denominan "ligandos con anclaje a MHC modificado", o modificaciones de los sitios de contacto de TCR, que se denominan en general "ligandos peptídicos alterados". Se cree que la identificación de análogos de epitopo peptídicos que refuerzan la estabilidad del complejo de MHC-péptido *in vivo* e *in vitro* aumentará la potencia de péptidos inmunogénicos intrínsecamente débiles para la activación y la amplificación de subconjuntos de células T pertinentes. Este concepto fue descrito por primera vez en un modelo de células T CD4+ murino empleando péptidos del VIH (1), y ahora se ha extendido a una diversidad de sistemas inmunológicos víricos y tumorales.
- 15 Se han diseñado variantes artificiales de autopéptidos de unión a MHC de clase I (2). Puesto que estos variantes peptídicos son extraños para el sistema inmunológico del hospedante, se induce una fuerte respuesta de CTL. A diferencia de las respuestas débiles de células T a los complejos de autopéptido-MHC, las respuestas de CTL a los péptidos variantes pueden mantenerse durante un periodo más largo sin provocar la aniquilación de los clones debido a que no hay señales suficientes para la división o la supervivencia celular. Puesto que una fracción sustancial de dichos CTL presenta reacción cruzada con autopéptidos no mutados expresados en células tumorales en cantidades mucho más pequeñas, la inmunización con péptidos variantes puede ser un método más eficaz para inducir CTL contra tumores. El sistema de puntuación para los péptidos de unión a MHC de clase I debería proporcionar un método conveniente para el diseño de péptidos de autoimitación que presenten reacción cruzada para la inmunización.
- 20 La mayor inmunogenicidad *in vivo* y la importancia de los ligandos con anclaje a MHC modificado se demostró formalmente por primera vez en una enfermedad neoplásica humana en un estudio controlado de pacientes con melanoma maligno utilizando un péptido restringido A0201 asociado a melanoma derivado de gp100. En fechas recientes se ha demostrado, con métodos de detección basados en HLA-tetrámero, que los péptidos antigénicos Melan-A originales son agonistas débiles que activan células específicas de antígeno de modo subóptimo (3). En contraste, se han identificado análogos de péptidos de melan-A que se comportan como agonistas completos e inducen una activación de células T completa que conduce a fuertes respuestas de CTL específicas de antígeno tumoral (4).
- 25 Pueden emplearse motivos sencillos y matrices de unión estadísticas para realizar una búsqueda bruta de péptidos de unión a MHC. Por desgracia, la presencia de un motivo de secuencia sencillo no se correlaciona bien con la unión. Por tanto, estos motivos sencillos no siempre son necesarios o suficientes para la unión. Sólo 30% de los péptidos que portan estos motivos sencillos se unen bien cuando se estudian en un ensayo de unión bioquímico. Las predicciones de unión pueden mejorar considerablemente cuando se utilizan motivos extendidos, en lugar de motivos sencillos. Aproximadamente 70% de los péptidos que portan un motivo extendido se unen bien.
- 30 Suponiendo que cada aminoácido en cada posición aporta una cierta energía de unión independiente de los restos vecinos, y que la unión de un péptido concreto es el resultado de combinar las aportaciones de los diferentes restos, la multiplicación de los valores de la matriz pertinente debería proporcionar una indicación de la unión del correspondiente péptido. Estas predicciones realizadas con la matriz estadística han tenido algo más de éxito, sugiriendo con ello que la unión a MHC es, en alguna medida, el resultado de una especificidad combinatoria. La identificación de péptidos análogos basándose en estos métodos se ha aplicado recientemente a la identificación de epitopos de CTL deducidos de la proteínaasa 3, el antígeno del melanoma 3, la mucina 1 y la telomerasa.
- 35 La débil inmunogenicidad de los péptidos de fusión bcr-abl nativos, según se demuestra por la poca lisis de las células, o el problema de la tolerancia utilizando péptidos nativos de un autoantígeno, tal como WT1, ha impedido el uso de estos péptidos nativos como vacuna eficaz contra CML. En la técnica resulta necesario el desarrollo de estrategias terapéuticas que empleen una vacunación contra un antígeno verdaderamente específico de tumor que también sea la proteína oncogénica requerida para la neoplasia. Son necesarios análogos de péptidos sintéticos mejorados, diseñados para provocar una mayor respuesta inmunogénica.
- 40 La técnica anterior no incluye péptidos análogos sintéticos que puedan generar una respuesta inmunológica que no sólo reconozcan a los epitopos inmunizantes, sino que también presenten reacción cruzada con los péptidos nativos originales. De modo específico, la técnica anterior no incluye análogos de péptidos sintéticos con una mejor unión a HLA y una mejor capacidad para provocar una mayor respuesta inmunogénica contra células cancerosas. La presente invención satisface esta antigua necesidad y deseo de la técnica.
- 45
- 50
- 55

## Sumario de la invención

5 La presente invención se dirige un péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos que es un péptido análogo de un péptido nativo que se une de modo específico a una molécula de HLA A0201 sobre una célula característica de un estado patofisiológico en un mamífero, en el que la secuencia de aminoácido del péptido análogo es YMFNPAPYL (SEQ ID NO:18), y la secuencia de aminoácidos del péptido nativo es RMFPNPAPYL (SEQ ID NO:17). El péptido sintético puede derivarse de péptidos nativos de la proteína WT1.

10 También se describe un péptido sintético relacionado con una secuencia de aminoácido seleccionada de YLKALQRPV (SEQ ID NO:2), KQSSKALQV (SEQ ID NO:4), KLSSKALQV (SEQ ID NO:5), KLLQRPVAV (SEQ ID NO:7), TLFKQSSKV (SEQ ID NO:9), YLFKQSSKV (SEQ ID NO:10), LLINKEEAL (SEQ ID NO:12), LTINKVEAL (SEQ ID NO:13), YLINKEEAL (SEQ ID NO:14), YLINKEEAV (SEQ ID NO:15), o YLINKVEAL (SEQ ID NO:16), NMYQRNMTK (SEQ ID NO:36), NMHQRVMTK (SEQ ID NO:37), NMYQRVMTK (SEQ ID NO:38), QMYLGATLK (SEQ ID NO:40), QMNLGVTLK (SEQ ID NO:41), QMYLGVTLK (SEQ ID NO:42), FMYAYPGCNK (SEQ ID NO:44), FMCAYPFCNK (SEQ ID NO:45), FMYAYPFCNK (SEQ ID NO:46), KLYHLQMHSR (SEQ ID NO:48), KLSHLQMHSK (SEQ ID NO:49), o KLYHLQMHSK (SEQ ID NO:50).

15 La presente invención también se dirige a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de los péptidos sintéticos de SEQ ID NO:18, o a un ADN que codifica el péptido sintético y un vehículo adecuado.

20 La presente invención también se dirige a una composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunogénicamente eficaz del péptido sintético de SEQ ID NO:18, y un vehículo, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable, o sus combinaciones.

25 La presente invención también se dirige a un péptido de SEQ ID NO:18 para su uso en un método para tratar un cáncer en un ser humano. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se administran al ser humano. Una respuesta heteroclítica es inducida por células T citotóxicas que reconocen al menos un segmento del análogo del péptido sintético de SEQ ID NO:18 contra células cancerosas que presentan un péptido nativo a partir del cual se deriva el segmento del análogo. Por tanto, las células T citotóxicas reconocen o destruyen a las células cancerosas, tratando con ello el cáncer, que puede ser leucemia.

30 El tratamiento del cáncer según la presente invención implica inducir la formación y la proliferación de células T citotóxicas humanas que producen una respuesta inmunológica heteroclítica contra células cancerosas. Las células inmunológicas humanas se ponen en contacto con un péptido sintético de SEQ ID NO:18. Con ello, se induce la formación y la proliferación de células T citotóxicas humanas reactivas contra las células activadas que presentan un segmento del análogo del péptido sintético. Las células T en proliferación presentarán reacción cruzada con las células cancerosas que presenten un péptido nativo del cual se deriva el segmento del análogo, de modo que las células T citotóxicas humanas producen con ello una respuesta inmunológica heteroclítica contra las células cancerosas.

35 Otros aspectos, características, beneficios y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones de la invención preferidas en la presente que se ofrecen como descripción.

## Breve descripción de los dibujos

40 Para lograr las características, las ventajas y los objetos de la invención descritos anteriormente, así como otros que serán evidentes, y para que puedan comprenderse en detalle, se resumen brevemente descripciones más concretas de la invención. Los detalles de los anteriores pueden hacer referencia a ciertas realizaciones que se ilustran en los dibujos adjuntos. Estos dibujos forman parte de la memoria descriptiva. Sin embargo, debe advertirse que los dibujos adjuntos ilustran realizaciones preferidas de la invención, y por tanto no deben considerarse como limitantes de su alcance.

45 Las **figuras 1A-1B** muestran ensayos de estabilización de T2 que emplean péptidos derivados de una translocación de b3a2 (**figura 1A**) y una translocación de b2a2 (**figura 1B**).

Las **figuras 2A-2B** muestran los resultados de un ELISPOT de gamma-interferón de CD8+ de un donante HLA A0201 sano (**figura 2A**) utilizando los péptidos p210C y p210F, y de un paciente con CML en fase crónica HLA A0201 (**figura 2B**) utilizando el péptido p210C.

50 Las **figuras 3A-3B** muestran los resultados de un ELISPOT de gamma-interferón de CD3+ de un donante HLA A0201 sano utilizando los péptidos b2a2 A3-A5 (**figura 3A**), y de un paciente con leucemia mielógena aguda en fase crónica HLA A0201 (**figura 3B**) utilizando el péptido b2a2 A3.

Las **figuras 4A-4B** muestran los resultados de ensayos de citotoxicidad con células T de un donante HLA A0201 sano utilizando los péptidos p210C, p210F y p190B (**figura 4A**), y el péptido b2a2 A3 (**figura 4B**).

Las **figuras 5A-5E** muestran la unión de péptidos WT-1 nativos y sintéticos a células HLA A0201 (**figura 5A**) y a células HLA A0301 (**figuras 5B-5E**).

Las **figuras 6A-6B** muestran los resultados de un ELISPOT de gamma-interferón de CD3+ (**figura 6A**), y de citotoxicidad (**figura 6B**) de un donante HLA A0201 sano contra células T2 cargadas con péptido nativo y sintético.

5 Las **figuras 7A-7D** muestran los resultados de un ELISPOT de gamma-interferón de CD8+ (**figura 7A**) y CD3+ (**figuras 7B-7D**) de donantes HLA A 0201 sanos empleando péptidos WT-1 nativos y sintéticos.

Las **figuras 8A-8B** muestran los resultados de ensayos de citotoxicidad utilizando células T CD8+ estimuladas con péptidos WT-1 A1 sintéticos de un donante HLA A0201 contra blastos de CML con HLA correspondiente que presentan secuencias del péptido nativo.

## 10 Descripción detallada de la invención

En una realización de la presente invención se proporciona un péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos que es un péptido análogo de un péptido nativo que se une de modo específico a una molécula de HLA A0201 sobre una célula característica de un estado patofisiológico en un mamífero, en el que la secuencia de aminoácidos del péptido análogo es YMFPNAPYL (SEQ ID NO:18), y la secuencia de aminoácidos del péptido nativo es RMFPNAPYL (SEQ ID NO:17).

En todos los aspectos de esta invención, el estado patofisiológico puede ser un cáncer. El cáncer puede ser una leucemia, tal como leucemia mielógena crónica. Como alternativa, el cáncer puede ser cáncer de mama, linfoma, mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer testicular, o cáncer de ovario. Además, en todos los aspectos, el mamífero puede ser un ser humano.

20 Además, en todos los aspectos de esta realización, el péptido sintético puede comprender un vehículo inmunogénico unido a él. Los ejemplos de vehículos son una proteína, un péptido, o una célula presentadora de antígenos. Los ejemplos representativos de una proteína o un péptido son la hemocianina de lapa, una albúmina o un poliaminoácido. Un ejemplo representativo de una célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica.

25 En un aspecto de esta realización, los aminoácidos comprenden un precursor del segmento del análogo que es un producto de la degradación de este. El precursor puede ser WT1, en el que el segmento del análogo reemplaza a un péptido nativo de WT1.

El segmento del análogo se deriva de un péptido nativo que comprende una proteína WT1. La secuencia de aminoácidos del segmento del análogo derivado de WT1 es YMFPNAPYL (SEQ ID NO:18).

30 En otra realización relacionada, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido sintético de la reivindicación 1, o un ADN que codifica el péptido sintético; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En aspectos de esta realización en los que la composición farmacéutica comprende un ADN que codifica el péptido sintético, el ADN puede insertarse en un vector o en una célula presentadora de antígenos. Un ejemplo de una célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica.

35 En otra realización relacionada de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunogénicamente eficaz del péptido sintético de SEQ ID NO:18, y un vehículo, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable, o sus combinaciones. El vehículo puede ser una proteína, un péptido, o una célula presentadora de antígenos unidos al péptido sintético. Los ejemplos de un vehículo de proteína o de péptido son la hemocianina de lapa, una albúmina o un poliaminoácido. Un ejemplo de una célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica.

40 En otra realización de la presente invención se proporciona un péptido sintético de SEQ ID NO:18 para su uso en un método para tratar el cáncer induciendo la formación y la proliferación de células T citotóxicas humanas que producen una respuesta inmunológica heteroclítica contra células cancerosas, en el que el péptido sintético activa las células inmunológicas; se induce la formación y la proliferación de células T citotóxicas humanas reactivas contra las células activadas que presentan al menos un segmento del análogo del péptido sintético, presentando las células T en proliferación una reacción cruzada con las células cancerosas que presentan un péptido nativo del cual se deriva dicho segmento del análogo, de modo que las células T citotóxicas humanas son capaces de producir una respuesta inmunológica heteroclítica contra las células cancerosas.

45 En esta realización, el método comprende también proporcionar un ADN que codifica el péptido sintético, y la expresión del ADN. El ADN puede insertarse en un vector adecuado. Como alternativa, el ADN puede insertarse en una célula presentadora de antígenos. Un ejemplo de una célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica.

50 En un aspecto de esta realización, las células inmunológicas humanas se ponen en contacto *in vivo* con un individuo que tiene cáncer. En un aspecto relacionado, las células inmunológicas humanas se ponen en contacto *in vivo* con un donante, y el método comprende además obtener las células T citotóxicas del donante e infundir las células T

citotóxicas en un receptor que tiene cáncer.

En otro aspecto, las células se ponen en contacto *ex vivo*, y el método comprende además obtener las células inmunológicas humanas de un donante antes de poner en contacto las células inmunológicas humanas con la composición farmacéutica, e infundir las células inmunológicas activadas en un individuo que tiene cáncer antes de inducir la formación y la proliferación de células T citotóxicas. En un aspecto relacionado, las células se ponen en contacto *ex vivo*, y el método comprende además obtener células inmunológicas humanas de un donante antes del contacto con las células inmunológicas humanas. En este aspecto, el contacto con las células inmunológicas humanas y la formación y la proliferación de las células T citotóxicas se producen *ex vivo*, infundiendo las células T citotóxicas en un individuo que tiene cáncer.

En todos los aspectos de esta realización, las células inmunológicas humanas representativas pueden ser células mononucleares de sangre periférica, células de médula ósea, células dendríticas o macrófagos. El péptido de SEQ ID NO:18 puede inducir una respuesta heteroclítica contra células leucémicas o células de cáncer de mama, linfoma, mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer testicular, o cáncer de ovario.

En la presente se proporciona un péptido inmunogénico sintético con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 que es un análogo de un péptido nativo que muestra una mejor unión con respecto a los péptidos nativos a HLA A0201. Este péptido sintético puede estimular a las células T para que presenten reacción cruzada con los péptidos nativos, produciendo así una respuesta inmunológica heteroclítica que reconocerá o destruirá a las células que presentan los péptidos nativos. Estas células son características de un estado patofisiológico tal como, pero sin limitarse a un cáncer. El péptido sintético se unirá con mayor afinidad a las moléculas de HLA de clase I y clase II que contribuyen más decisivamente a la presentación del análogo a las células T que el propio péptido nativo.

Los segmentos de análogos de péptidos sintéticos pueden diseñarse realizando una o dos sustituciones de aminoácidos en los restos de anclaje o auxiliares. Aunque los péptidos nativos particularmente descritos en la presente son noámeros que incluyen los restos de anclaje o auxiliares, pueden diseñarse análogos para que tengan de aproximadamente 70% a aproximadamente 130% de los aminoácidos del péptido nativo. Los análogos del péptido sintético pueden tener aproximadamente 8-12 aminoácidos. Estas sustituciones se determinan mediante un sistema de modelo bioinformático (BIMAS) que emplea una estrategia de matriz para predecir la unión y clasifica los péptidos basándose en la unión predicha a la molécula HLA. Las secuencias de aminoácidos y las puntuaciones predichas para la unión a HLA A0201 y HLA A0301 son generadas mediante el programa informático en línea BIMAS disponible en <http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken-parker-comboform>, y SYFPEITHI disponible en <http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/>.

El péptido sintético puede ser un precursor del segmento del análogo que puede ser un producto de la degradación del péptido sintético. Dicho precursor puede ser una proteína de fusión de bcr-abl, de modo que el análogo sintético abarca la región del punto de corte de la proteína de fusión. Como alternativa, el precursor puede ser una proteína WT1, de modo que los segmentos del análogo reemplazan a una secuencia del péptido nativo dentro de WT1.

En la presente se describen ejemplos en los que el péptido sintético es o comprende segmentos de un análogo que pueden ser análogos de la región del punto de corte de la proteína de fusión de bcr-abl, que es la proteína oncogénica requerida para la neoplasia en la leucemia mielógena crónica. Los péptidos sintéticos son o comprenden segmentos de un análogo derivados de las secuencias de juntura de p210-b3a2, p210-b2a2, y p190-e1a2. Los péptidos sintéticos o los segmentos del análogo pueden derivarse de p210-b3a2 y p210-b2a2, en los que se introducen sustituciones de uno o dos aminoácidos en los péptidos en las posiciones de unión a HLA A0201 claves. Estos análogos de péptidos de alta afinidad son capaces de generar células T CD8+ específicas con mucha más eficacia que los péptidos nativos, y son capaces de estimular respuestas heteroclíticas de CTL CD8+ humanos que presentan reacción cruzada con las secuencias nativas presentadas sobre células de leucemia.

Los ejemplos descritos de péptidos sintéticos o segmentos de análogos son los análogos de p210-b3a3 p210C, p210D, y p210F, más preferiblemente p210C, y los análogos de p210-b2a2 b2a2 A3, b2a2 A4, y b2a2 A5, más preferiblemente b2a2 A3. La tabla 1 muestra las secuencias de aminoácidos y las predicciones de unión de análogos nativos y sintéticos. La K subrayada en b3a3 y la E subrayada en B2a2 son los aminoácidos del punto de corte. Los restos en negrita representan las modificaciones de la secuencia nativa. Sólo el péptido de SEQ ID NO:18 forma parte de la presente invención.

Tabla 1: Péptidos nativos HAL 0201 de la proteína de fusión de bcr-abl y análogos de péptidos sintéticos

Nombre	Secuencia nativa	Secuencia del análogo	Puntuación BIAS
CMLA2	SSK <b>K</b> ALQRPV SEQ ID NO: 1		0,003
p210F		YL <b>K</b> ALQRPV SEQ ID NO:2	2,240
CMLA3	KQSS <b>K</b> ALQR SEQ ID NO:3		0,005

Nombre	Secuencia nativa	Secuencia del análogo	Puntuación BIAS
p210A		KQSSKALQV SEQ ID NO:4	24,681
p210B		KLSSKALQV SEQ ID NO:5	243,432
p210Cn	KALQRPVAS SEQ ID NO:6		0,013
p210C		KLLQRPVAV SEQ ID NO:7	900,689
p210Dn	TGFKQSSKA SEQ ID NO:8		0,120
p210D		TLFKQSSKV SEQ ID NO:9	257,342
p210E		YLFKQSSKV SEQ ID NO:10	1183,775
b3a2 A	LTINKEEAL SEQ ID NO:11		0,247
b3a2 A1		LLINKEEAL SEQ ID NO:12	17,795
b3a2 A2		LTINKVEAL SEQ ID NO:13	21,996
b3a2 A3		YLINKEEAL SEQ ID NO:14	48,151
b3a2 A4		YLINKEEAV SEQ ID NO:15	156,770
b3a2 A5		YLINKVEAL SEQ ID NO:16	110,747

5 Los péptidos inmunogénicos sintéticos pueden ser segmentos de análogos o comprender segmentos de análogos derivados de una proteína WT1. Los análisis de predicción por ordenador, tal como se describen en la presente, predicen análogos de péptidos sintéticos derivados de las secuencias no numeradas de la proteína WT1 en los que se introduce una única sustitución de un aminoácido en la posición de unión a HLA A0201, y en los que se introduce una o dos sustituciones de aminoácidos en las posiciones de unión a A0301. Estos análogos de péptidos sintéticos o segmentos de análogos son capaces de generar células T CD8+ o CD3+ específicas con más eficacia que los péptidos nativos, y son capaces de estimular respuestas heterocliticas de CTL CD8+ o CD3+ humanos que presentan reacción cruzada con las secuencias nativas presentadas sobre las células leucémicas u otras células que presenten estos péptidos WT-1 nativos. Las tablas 2 y 3 muestran las secuencias de aminoácidos y las predicciones de unión de WT-1 nativo y de análogos de péptidos WT-1 sintéticos. Los restos en negrita representan las modificaciones de la secuencia nativa.

10

Tabla 2: Péptidos nativos HLA 0201 de WT-1 y análogos sintéticos

Nombre	Secuencia nativa	Secuencia del análogo	Puntuación BIAS
WT-1 A	RMFPNAPYL SEQ ID NO:17		313
WT-1 A1		YMFPNAPYL SEQ ID NO:18	1444
WT-1 B	SLGEQQYSV SEQ ID NO:19		285
WT-1 B1		YLGEQQYSV SEQ ID NO:20	1311
WT-1 C	ALLPAVPSL SEQ ID NO:21		181
WT-1 C1		YLLPAVPSL SEQ ID NO:22	836
WT-1 D	NLGATLKGV SEQ ID NO:23		159
WT-1 D1		YLGATLKGV SEQ ID NO:24	735
WT-1 E	DLNALLPAV SEQ ID NO:25		11

Nombre	Secuencia nativa	Secuencia del análogo	Puntuación BIAS
WT-1 E1		YLNALLPAV SEQ ID NO:26	735
WT-1 F	GVFRGIQDV SEQ ID NO:27		51
WT-1 F1		GLRRGIQDV SEQ ID NO:28	591
WT-1 G	KFYFKLSHL SEQ ID NO:29		1
WT-1 G1		KLYFKLSHL SEQ ID NO:30	550
WT-1 H	ALLLRTPYS SEQ ID NO:31		1
WT-1 H1		ALLLRTPYV SEQ ID NO:32	1415
WT-1 J	CMTWNQMNL SEQ ID NO:33		15
WT-1 J1		YMTWNQMNL SEQ ID NO:34	70

Tabla 3: Péptidos nativos HLA 0201 de WT-1 y análogos sintéticos

Nombre	Secuencia nativa	Secuencia del análogo	Puntuación BIAS
A3WT-1 A	NMHQRNMTK SEQ ID NO:35		40
A3WT-1 A1		NMYQRNMTK SEQ ID NO:36	200
A3WT-1 A2		NMHQRVMTK SEQ ID NO:37	120
A3WT-1 A3		NMYQRVMTK SEQ ID NO:38	600
A3WT-1 B	QMNLGATLK SEQ ID NO:39		20
A3WT-1 B1		QMYLGATLK SEQ ID NO:40	100
A3WT-1 B2		QMNLGVTLK SEQ ID NO:41	60
A3WT-1 B3		QMYLGVTLK SEQ ID NO:42	300
A3WT-1 C	FMCAYPGCNK SEQ ID NO:43		30
A3WT-1 C1		FMYAYPGCNK SEQ ID NO:44	150
A3WT-1 C2		FMCAYPFCNK SEQ ID NO:45	90
A3WT-1 C3		FMYAYPFCNK SEQ ID NO:46	450
A3WT-1 D	KLSHLQMHSR SEQ ID NO:47		18
A3WT-1 D1		KLYHLQMHSR SEQ ID NO:48	90
A3WT-1 D2		KLSHLQMHSK SEQ ID NO:49	90
A3WT-1 D3		KLYHLQMHSK SEQ ID NO:50	450

5 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica de una cantidad terapéutica del péptido sintético de SEQ ID NO:18, o una secuencia genética o un ADN que la codifica, y un vehículo farmacéutico, tal como se conoce en la técnica. La composición farmacéutica puede formularse con el vehículo farmacéutico para su administración mediante cualquiera de las muchas técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la



composición farmacéutica puede administrarse por vía parenteral, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramucósica, tópica, oral, o mediante inhalación.

5 Por tanto, se contempla que el péptido sintético de SEQ ID NO:18 o sus composiciones farmacéuticas puedan utilizarse para la preparación de una composición inmunogénica adecuada para realizar la inmunización de un sujeto. La composición inmunogénica puede comprender un vehículo o un adyuvante adecuado para reforzar una respuesta inmunológica, o sus combinaciones, según se conoce en la técnica. La composición inmunogénica también puede comprender un diluyente convencional en la técnica, tal como se describe en la presente. La composición inmunogénica puede comprender una vacuna.

10 Un vehículo puede comprender una o más proteínas o péptidos. Los ejemplos de vehículos son muy conocidos y pueden ser, aunque no se limitan a hemocianina de lapa, una albúmina, tal como albúmina de suero humana, o un poliaminoácido. Además, un vehículo puede comprender una célula presentadora de antígenos viva, tal como una célula dendrítica, que presente los péptidos sintéticos descritos en la presente. Un adyuvante adecuado puede ser el adyuvante de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, QS21, BCG. Estas composiciones también pueden comprender un diluyente fisiológicamente aceptable, por ejemplo, agua, disolución salina tamponada con fosfato, o disolución salina.

15 Además, una secuencia genética que codifica un péptido sintético o un segmento de un análogo de este, puede administrarse como un ADN desnudo a un individuo por medio de métodos apropiados conocidos en la técnica. Como alternativa, la secuencia genética puede introducirse o insertarse en un vector adecuado, tal como por ejemplo, pero sin limitarse a vectores víricos o bacterianos atenuados, tal como resulta convencional en la técnica. 20 Además, el ADN desnudo o los vectores que comprenden la secuencia genética o el ADN pueden transducirse en una célula presentadora de antígenos, por ejemplo, una célula dendrítica. La secuencia genética, el ADN, el vector, o la célula presentadora de antígenos transducida pueden introducirse en un individuo que necesite tratamiento o en un donante sano, tras lo cual el ADN que codifica la secuencia genética expresa el péptido sintético para producir una respuesta de células T citotóxicas. Las células T donantes entonces pueden infundirse en un paciente que lo necesite.

25 Las composiciones farmacéuticas o inmunogénicas pueden utilizarse para tratar una enfermedad o un trastorno, tal como cáncer. La administración de las composiciones farmacéuticas que comprenden el péptido sintético de SEQ ID NO:18 induce una respuesta heteroclítica contra péptidos nativos expresados sobre células cancerosas, produciendo con ello un resultado terapéutico. Los péptidos nativos de la región del punto de corte de las proteínas de bcr-abl y los péptidos nativos de la proteína WT-1 se expresan sobre células leucémicas en la leucemia mielógena crónica. Los péptidos WT-1 nativos se expresan sobre otras células leucémicas y, además, sobre células cancerosas de diferentes tumores sólidos. Estos cánceres pueden ser, aunque no se limitan a cáncer de mama, linfoma, mesotelioma, cáncer de pulmón, testicular u ovárico.

35 Se contempla que el péptido sintético de SEQ ID NO:18, o las secuencias genéticas que lo codifican, o sus composiciones farmacéuticas o inmunogénicas, puedan inducir a células T citotóxicas humanas para que produzcan una respuesta inmunológica heteroclítica contra células cancerosas, por ejemplo, células de leucemia. Poniendo en contacto células inmunológicas humanas con los péptidos sintéticos se activa a las células inmunológicas para inducir la formación y la proliferación de células T citotóxicas humanas que reconocen o reaccionan contra una célula que presenta el péptido sintético. Estas células T citotóxicas presentan reacción cruzada con células humanas que 40 presentan los péptidos nativos de los cuales se deriva el péptido análogo, produciendo con ello una respuesta heteroclítica.

45 Los expertos en la técnica reconocerán que la expresión "poner en contacto" con relación a la activación de células inmunológicas diana para producir una posterior respuesta inmunológica, se refiere a cualquier método de administración apropiado para poner en contacto un agente inmunogénico con las células diana. Esto se logra, *in vitro* o *ex vivo*, exponiendo las células diana al agente en un medio adecuado. Para aplicaciones *in vivo*, cualquier método de administración conocido resulta adecuado, según se describe en la presente.

50 Así, el péptido sintético de SEQ ID NO:18 puede utilizarse para activar células T *ex vivo* o *in vivo*. *In vivo*, los péptidos sintéticos o el ADN que los codifica pueden administrarse a un paciente o un donante sano para inducir células T citotóxicas. Si se administran a un donante, estas células T citotóxicas se obtienen del donante y se infunden en un individuo que lo necesite, tal como un individuo con un cáncer activo, en remisión de un cáncer, o en riesgo de desarrollar un cáncer.

55 *Ex vivo*, las células T se obtienen de un paciente o un donante sano y se incuban en presencia de células presentadoras de antígenos y un péptido sintético de SEQ ID NO:18 para activar las células T. Las células T activadas posteriormente se vuelven a infundir al paciente, en donde reconocerán y/o destruirán a las células que presentan el péptido nativo. Como alternativa, las células inmunológicas humanas pueden incubarse con el péptido sintético, tras lo cual las células inmunológicas activadas se vuelven a infundir al paciente para inducir la

producción de células T contra las células activadas y las células que presentan el péptido nativo. Los ejemplos de células inmunológicas pueden ser células monocíticas mononucleares de sangre periférica, células de médula ósea, células dendríticas, o macrófagos.

- 5 También se contempla que la administración del péptido sintético, o al menos de un segmento de análogo del mismo o de composiciones farmacéuticas del mismo, induzca una respuesta inmunológica en un sujeto, preferiblemente aunque no se limita a una respuesta inmunológica de CD8/HLA A o CD3/HLA A de clase I. Como tales, los péptidos sintéticos, o al menos uno de sus segmentos de análogos, pueden utilizarse en un método para inmunizar un sujeto contra un trastorno o una enfermedad patofisiológica que presente moléculas HLA, por ejemplo, una leucemia, tal como la leucemia mielógena crónica. Además, los péptidos sintéticos WT-1, o al menos uno de sus segmentos de análogos, pueden utilizarse para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto con otras leucemias o cánceres tales como, pero sin limitarse a cáncer de mama, linfoma, mesotelioma, cáncer de pulmón, testicular u ovárico. Tal como se emplea en la presente, la inmunización de un sujeto incluye la inmunización total y parcial, por las cuales el sujeto se hace totalmente inmune al trastorno o parcialmente inmune al trastorno. El sujeto puede ser un mamífero, preferiblemente un ser humano.
- 10
- 15 El sujeto puede tener un trastorno o una enfermedad que puede estar activo o en remisión antes de la inmunización. Como alternativa, si está en riesgo de desarrollar la enfermedad o el trastorno, el sujeto puede inmunizarse antes de dicho desarrollo. Los expertos en la técnica serán capaces de evaluar los factores de riesgo, tales como factores de riesgo ambientales o factores de riesgo personales, tales como la historia familiar, la constitución genética o el comportamiento, para determinar el riesgo en el sujeto.
- 20 Las composiciones farmacéuticas y las composiciones inmunogénicas pueden administrarse una o más veces para lograr un efecto terapéutico o un efecto inmunogénico. Está dentro del conocimiento de los expertos en la técnica la determinación de la dosificación o si una dosificación adecuada comprende una única dosis administrada o múltiples dosis administradas. Una dosificación apropiada depende de la salud del sujeto, el avance o la remisión de la enfermedad, la vía de administración y la formulación utilizada.
- 25 Los siguientes ejemplos se ofrecen como ilustración de diversas realizaciones de la invención, y no pretenden limitar la presente invención de ninguna manera.

### Ejemplo 1: Péptidos sintéticos

30 Cada uno de los péptidos utilizados en este estudio se adquirió y fue sintetizado en Genemed Synthesis Inc., CA, utilizando la química de fluorenilmetoxicarbonilo y la síntesis en fase sólida, y se purificó mediante una cromatografía líquida de alta presión. La calidad de los péptidos se evaluó mediante un análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento, y se observó el peso molecular esperado utilizando una espectrometría de masas de desorción de láser con matrices. Los péptidos eran estériles y >90% puros. Los péptidos se disolvieron en DMSO y se diluyeron en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4 o disolución salina para producir una concentración de 5 mg/ml y se conservaron a -80 °C. Para los experimentos *in vitro* se empleó un péptido control irrelevante, HLA A24 consenso.

35

### Ejemplo 2: Líneas celulares

40 Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 5%, penicilina, estreptomina, glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol a 37 °C en aire humidificado que contenía CO<sub>2</sub> al 5%. SKLY-16 es un linfoma de células B humano que expresa HLA A0201, y T2 es una línea celular humana que carece de TAP1 y TAP2 y así no puede presentar péptidos derivados de proteínas citosólicas.

### Ejemplo 3: Ensayo de T2 para la unión de péptidos y la estabilización de moléculas HLA A0201

45 Las células T2 (TAP-, HLA A0201+) se incubaron durante la noche a 27 °C a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI sin FCS suplementado con  $\beta$ 2m humana 5  $\mu$ g/ml (Sigma, St. Louis, MO) en ausencia (control negativo) o en presencia de un péptido de tirosinasa de referencia positiva o de péptidos de ensayo a diversas concentraciones finales de 50, 10, 1 y 0,1  $\mu$ g/ml. Después de 4 h de incubación de brefeldina A 5  $\mu$ g/ml (Sigma), las células T2 se marcaron durante 30 min a 4 °C con una concentración saturante de mAb anti-HLA-A2.1 (BB7.2), y después se lavaron dos veces. Las células después se incubaron durante 30 min a 4 °C con una concentración saturante de F(ab')<sub>2</sub> de IgG de cabra conjugada con FITC anti-Ig de ratón (Caltag, South San Francisco, CA), se lavaron dos veces, se fijaron en PBS/paraformaldehído al 1% y se analizaron utilizando un citofluorómetro FACS Calibur (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San José, CA).

50

La intensidad de fluorescencia media (MIF) observada para cada concentración de péptido, después de restar la MIF observada sin péptido, se empleó como cálculo de la unión del péptido. Se realizaron ensayos de estabilización de

modo similar. Tras una evaluación inicial de la unión del péptido en el tiempo 0, las células se lavaron en medio completo RPMI para retirar los péptidos libres y se incubaron en presencia continua de brefeldina A 0,5 µg/ml durante 2, 4, 6 y 8 horas. La cantidad de complejos de péptido-HLA-A2.1 estables se calculó como se describió anteriormente mediante un análisis de inmunofluorescencia indirecto. El semitiempo de los complejos es un cálculo del tiempo requerido para una reducción del 50% del valor de la intensidad de fluorescencia media en el tiempo 0.

#### Ejemplo 4: Radioinmunoensayo de competición

Las células diana se lavaron dos veces en PBS con albúmina de suero bovina al 1% (Fisher Chemicals, Fairlawn, NJ). Las células se resuspendieron a  $10^7$ /ml sobre hielo y los péptidos unidos a la superficie celular nativos se extrajeron durante 2 minutos a 0 °C utilizando tampón citrato-fosfato en presencia de beta<sub>2</sub>-microglobulina 3 mg/ml. El sedimento se resuspendió a  $5-10 \times 10^6$  células/ml en PBS/BSA al 1% en presencia de beta<sub>2</sub>-microglobulina 3 mg/ml y desoxirribonucleasa 30 mg/ml, y se incubaron partes alícuotas de 200 µl con péptidos específicos de HLA durante 10 min a 20 °C.

La unión del péptido marcado con <sup>125</sup>I con o sin péptido no marcado competitivo se realizó durante 30 min a 20 °C. Se determinó el <sup>125</sup>I unido total después de dos lavados utilizando PBS/BSA al 2% y un lavado con PBS. Se determinaron las afinidades relativas mediante la comparación de concentraciones crecientes del péptido de ensayo frente a un péptido de unión conocido. Se eligieron los péptidos con una afinidad < 500 nM para su uso.

Se realizó un análisis de la especificidad de la unión del péptido a HLA sobre la superficie de células vivas (SKLY-16) para confirmar que la unión se realizó con la molécula de HLA apropiada y para caracterizar su restricción. Esto incluye la competición con un exceso de péptidos sin marcar que se sabe que se unen a la misma o a otra molécula de HLA y el uso de células diana que expresan el mismo u otro tipo de HLA. Este ensayo se realizó con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas frescas vivas o fijadas con paraformaldehído al 0,25%, con líneas celulares de leucemia, y con líneas de células T transformadas con EBV de tipos específicos de HLA. Se ensayó la avidéz relativa de los péptidos que se unían a moléculas de MHC sobre las células específicas mediante ensayos de competición, según se describió anteriormente, contra péptidos marcados con <sup>125</sup>I de alta afinidad conocida por la molécula de HLA pertinente, por ejemplo, tirosinasa o secuencia peptídica de HBV.

#### Ejemplo 5: Inmunización *in vitro* y cultivos de células T humanas

Después de un consentimiento informado, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos HLA-A0201-positivos y de pacientes con leucemia mieloide crónica, mediante centrifugación de gradiente de densidad de Ficoll. Se generaron células dendríticas (DC) de sangre periférica como sigue: se aislaron fracciones de células mononucleares de sangre periférica enriquecidas en monocitos utilizando una técnica de adherencia al plástico, a partir de células mononucleares de sangre periférica totales. Las células adherentes al plástico después se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con plasma autólogo al 1-5%, interleuquina (IL)-4 humana recombinante 1000 U/ml (Shering-Plough, NJ) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) humano recombinante (Immunex, Seattle).

En los días 2 y 4 de la incubación, parte del medio se reemplazó por medio de cultivo fresco suplementado con IL-4 y GM-CSF y se continuó el cultivo. En el día 6, la mitad del medio se intercambió por medio de cultivo suplementado con IL-4, GM-CSF, y factor de necrosis tumoral humano recombinante (TNF)-alfa 10 ng/ml (R&D System) y CD40L soluble trimérico 500 ng/ml (Immunex, Seattle). En el día 9, las células se recolectaron y se emplearon como células dendríticas derivadas de monocitos para la estimulación de antígenos. Las células generaron antígenos asociados a células dendríticas expresados, tales como CD80, CD83, CD86, y HLA de clase I y de clase II, sobre su superficie celular (los datos no se muestran).

Se aislaron linfocitos T de los mismos donantes utilizando una selección negativa mediante eliminación utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD11b, anti-CD56 y CD19 (Miltenyi, CA). Se cultivó un total de  $1 \times 10^6$  linfocitos T puros con  $1 \times 10^5$  células dendríticas autólogas en medio RPMI 1640 suplementado con plasma autólogo humano inactivado con calor al 5% con péptidos sintéticos de bcr-abl a una concentración de 10 µg/ml y beta<sub>2</sub>-microglobulina a 2 µg/ml en placas de 24 pocillos en presencia de IL-7 humana recombinante 5-10 ng/ml (Genzyme) y 0,1 ng/ml de IL-12.

Después de cultivar durante 3 días se añadieron 20 U/ml de IL-2. Después de 10 días, se estimularon de nuevo  $1 \times 10^6$  células añadiendo  $2 \times 10^5$  monocitos CD14+ aislados magnéticamente autólogos, junto con 10 ng/ml de IL-7 y 20 U/ml de IL-2 y péptido a una concentración de 10 µg/ml. En algunos casos, después de cultivar durante 7 días más, las células se estimularon por tercera vez de la misma manera. Después de la segunda o tercera estimulación, las células T CD8 se aislaron magnéticamente y se estudió la citotoxicidad y la secreción de gamma-IFN de estas células.

**Ejemplo 6: ELISPOT de gamma-interferón**

Se revistieron placas HA-Multiscreen (Millipore, Burlington, MA) con 100  $\mu$ l de anticuerpo anti-IFN-gamma humano de ratón (10  $\mu$ g/ml, clon 1-D1K, Mabtech, Suecia) en PBS, se incubaron durante la noche a 4 °C, se lavaron con PBS para eliminar el anticuerpo no unido y se bloquearon con RPMI/plasma autólogo durante 1 h a 37 °C. Las células T CD8+ purificadas, más de 95% puras, se cultivaron a una concentración de  $1 \times 10^5$ /pocillo. Las células T se estimularon con  $1 \times 10^4$  células T2 por pocillo, se cargaron con 10  $\mu$ g/ml de  $\beta$ 2-microglobulina (Sigma, St. Louis) y 50  $\mu$ g/ml de péptido de ensayo, péptido de matriz de la gripe de control positivo, o péptido control irrelevante a un volumen final de 100-200  $\mu$ l/pocillo. Los pocillos control contenían células T2 con o sin células CD8+. Otros controles incluían medio o CD8+ solas más PBS/DMSO al 5% diluido según las concentraciones de péptidos utilizadas para cargar las células T2.

Después de una incubación durante 20 horas a 37 °C, las placas se lavaron a fondo con PBS/Tween al 0,05% y se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo de detección biotinilado contra IFN-gamma humano a 2  $\mu$ g/ml (clon 7-B6-1, Mabtech, Suecia). Las placas se incubaron durante 2 horas más a 37 °C y se realizó el revelado de las manchas. Se determinó de modo automático el número de manchas utilizando un analizador de imágenes de video por ordenador con el programa informático KS ELISPOT 4.0 (Carl Zeiss Vision, Alemania).

**Ejemplo 7: Ensayo de citotoxicidad**

La presencia de CTL específicos se midió utilizando un ensayo de liberación de cromo de 4 h convencional. Se marcaron  $4 \times 10^6$  dianas con 300  $\mu$ Ci de  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (NEN Life Science Products Inc., Boston, MA) durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, las células a  $2 \times 10^6$ /ml se incubaron con o sin péptidos sintéticos a una concentración de 10  $\mu$ g/ml durante 2 horas a 20 °C en presencia de  $\beta$ 2-microglobulina 3  $\mu$ g/ml. Después de un lavado mediante centrifugación, las células diana se resuspendieron en medio completo a  $5 \times 10^4$  células por ml y se cultivaron en una placa con fondo en forma de U de 96 pocillos (Becton Dickinson®, NY) a  $5 \times 10^3$  células por pocillo con células efectoras a una proporción de efectora a diana (E/T) de 100:1 a 10:1. Las placas se incubaron durante 5 horas a 37 °C en  $\text{CO}_2$  al 5%.

Los fluidos sobrenadantes se recolectaron y se midió la radiactividad en un contador gamma. Se determinó el porcentaje de lisis específica a partir de la siguiente fórmula:  $100 \times [(\text{liberación experimental menos liberación espontánea})/(\text{liberación máxima menos liberación espontánea})]$ . La liberación máxima se determinó mediante la lisis de las dianas en Triton X-100 al 2,5%.

**Ejemplo 8: Identificación y generación de péptidos con una alta probabilidad de unirse a HLA 0201**

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión b3a2 y b2a2 humanas se seleccionaron para la detección de péptidos con capacidad de unión potencial a HLA A0201, un subtipo que incluye 95% del alelo HLA-A02. HLA-A0201 se expresa en aproximadamente 40% de la población causásica. No se identificaron péptidos con afinidad alta o intermedia en las proteínas de fusión b3a2 o b2a2 nativas con más de 1 minuto de semivida predicha. Se ha descrito un péptido que no muestra los motivos de unión a HLA 0201 consenso, pero tiene una avidéz débil por MHC.

Basándose en esta información y utilizando el programa informático de Bioinformatics & Molecular Analysis Section (National Institutes of Health, Washington, DC) disponible en <http://bimas.dcrf.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken-parker-comboform>. Este programa informático clasifica los péptidos 9-meros o 10-meros basándose en un coeficiente de disociación de semitiempo predicho de moléculas HLA de clase I (Pinilla, *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 11(2), p. 193-202 (1999)). Se diseñaron péptidos análogos cambiando uno o ambos aminoácidos de anclaje u otros aminoácidos adyacentes a los aminoácidos de anclaje. Se introdujeron una o dos sustituciones de aminoácidos en restos preferidos de HLA A0201 en las posiciones 1, 2, 6 y 9 (tabla 1) para producir secuencias que tienen las puntuaciones de unión comparativamente altas predichas para moléculas HLA A0201.

La semivida predicha para la unión a HLA A0201 es mayor que 240 minutos en cuatro péptidos sintéticos y menor que 240 en siete de ellos. Se predijo que todos los péptidos nativos tendrían menos de una hora de semivida. La mayoría de las sustituciones afectan a los motivos de anclaje primarios o secundarios, es decir, la leucina en la posición 2 o la valina en la posición 9 o en la posición 6, pero en algunos casos una tirosina se sustituyó en la posición 1. Se ha demostrado que esta sustitución estabiliza la unión del resto de anclaje en la posición 2.

**Ejemplo 9 (ejemplo de referencia): Unión de HLA A0201 por los análogos de péptidos sintéticos de los péptidos nativos b2a2 y b3a2**

La inmunogenicidad de los péptidos restringidos a MHC de clase I requiere una capacidad para unirse y estabilizar a moléculas de MHC de clase I sobre la superficie de células vivas. Además, los anteriores modelos de predicción por

ordenador sólo tienen una precisión predictiva del 60-80%. La medición directa de la fuerza de la interacción entre los péptidos y la molécula HLA A0201 se realizó utilizando un ensayo de unión y estabilización convencional que emplea células T2 humanas HLA A0201 deficientes en transportadores de antígenos (TAP2-). Las células T2 carecen de función TAP y por consiguiente no puede cargar adecuadamente las moléculas de clase I con péptidos antigénicos generados en el citosol. La asociación de péptidos añadidos de modo exógeno con moléculas HLA A2 vacías termolábiles las estabiliza y produce un aumento en el nivel de HLA A0201 en la superficie reconocible por mAb específicos, tales como BB7.2.

Siete de los once péptidos diseñados para tener puntuaciones de unión más altas muestran una afinidad de unión relativamente alta por moléculas HLA A0201, según se mide mediante el ensayo de T2 (figura 1A-1B). Se estableció una correlación aproximada entre las puntuaciones de unión y la afinidad de unión, indicando con ello la utilidad parcial de las puntuaciones de unión generadas por ordenador para predecir los péptidos que se unirán a moléculas de MHC de clase I sobre células vivas. Algunos de estos péptidos muestran el mismo orden de afinidad de unión que el de antígenos víricos, tales como la gripe, que están entre los antígenos más potentes conocidos para la inducción de CTL. En cuatro casos no se encontró una buena correlación entre la semivida predicha por ordenador y la estabilización de T2.

Uno de los péptidos derivados de b3a2, p210C, se mutó a partir de un péptido que no tenía una buena puntuación de predicción. Sin embargo, la secuencia nativa es capaz de unirse débilmente a HLA A0201 y al mismo nivel que el péptido CMLA2 previamente descrito. Para diseñar p210C, una alanina neutra en la posición 2 fue sustituida por una leucina, y una serina en la posición nueve fue sustituida por una valina. p210C tiene una alta puntuación BIMAS que se correlaciona con los datos del ensayo de unión de T2 (figura 1A).

p210F es un péptido derivado de la secuencia previamente descrita por Yotonda *et al.*, CMLA2, que ha demostrado ser un ligante débil en el ensayo de T2. En p210F, las dos serinas en la posición 1 y 2 son sustituidas por una tirosina y una leucina. La predicción BIMAS demuestra una mejora en 700 veces, y la unión a células T2 revela una excelente avidéz por moléculas HLA A0201 (figura 1A).

De los péptidos derivados de b2a2, todos fueron generados a partir de un péptido que no predice una buena unión a HLA A0201. Tres péptidos, b2a2 A3-A5 (tabla 1) se unieron bien a moléculas HLA A0201 (figura 1B). Estos tres péptidos tienen una sustitución de secuencia de tirosina-leucina en la posición 1 y 2, y también una sustitución de valina en la posición 6 o 9.

#### **Ejemplo 10 (ejemplo de referencia): Evaluación del tiempo de disociación de los análogos de péptidos sintéticos b2a2 y b3a2 de HLA A0201**

La inmunogenicidad de los antígenos peptídicos depende de una baja tasa de disociación de los complejos de MHC/péptido. La estabilidad de los complejos formados entre HLA A0201 y los péptidos análogos b3a2 se ensayó en células T2 a lo largo del tiempo. Una incubación durante la noche de las células T2 con cantidades saturantes de péptidos de unión a HLA A0201 y  $\beta$ 2-microglobulina humana produjo una mayor expresión en la superficie de moléculas HLA A0201. Después de la retirada del péptido y de la adición de brefeldina A para inhibir la síntesis proteica, las células T2 se incubaron a 37 °C y se determinó la cantidad de moléculas HLA A0201 que permanecen en la superficie celular después de diversos tiempos de incubación.

Entonces se normalizó la estabilidad de cada complejo de péptido/HLA A0201 con relación a la observada para el péptido tirosinasa D o el péptido gag de VIH, que son péptidos con alta afinidad y semivida conocidas. Los complejos de HLA A0201 formados con los péptidos p210A y p210B fueron inestables, alcanzando unos niveles de fondo en menos de 1 h de incubación a 37 °C. Por contraste, los péptidos p210C, p210D, p210E y p210F formaron complejos que fueron relativamente estables a lo largo de 6-8 horas.

#### **Ejemplo 11 (ejemplo de referencia): Inducción de una respuesta inmunológica de CD8 contra los análogos de péptidos sintéticos b2a2 y b3a2**

Aunque la afinidad por moléculas de MHC es necesaria para la inmunogenicidad de péptidos, también es necesaria la presencia de células T precursoras reactivas con receptores de células T apropiados. Utilizando un sistema de expansión de células T optimizado, con DC derivadas de monocitos, células CD14+ como APC, y células T purificadas, se estudia la capacidad de los análogos b3a2 y b2a2 sintéticos para estimular CTL específicos de péptido. Se estudiaron diez donantes HLA A0201 sanos, así como 5 pacientes con CML.

Cinco de los diez individuos respondieron a la inmunización, generando células T que segregan IFN-gamma cuando se exponen a células T2 cargadas con diferentes péptidos como diana. p210D y p210E producen una respuesta inmunológica en algunos de los donantes ensayados, aunque p210C y p210F generaron una respuesta inmunológica mayor y más coherente (figura 2A). Se observaron respuestas después de la segunda o tercera ronda de estimulación con péptidos después del aislamiento de CD8+ o en células T CD3+ no purificadas.

5 El número de manchas fue mayor, de modo coherente, con los péptidos que se unen con mayor afinidad a moléculas HLA A0201, según se determina en el ensayo de T2. De modo más importante, las células T generadas en presencia de los nuevos análogos sintéticos fueron capaces de reconocer las secuencias nativas. p210C y p210F fueron capaces de estimular a las células T para que reconocieran las secuencias nativas. p210C y p210F fueron capaces de estimular a las células T para que reconocieran sus respectivas secuencias nativas (figura 2A). CML A2, la secuencia nativa de p210F es un ligante débil natural, y existen pruebas indirectas de que puede ser expresado de forma natural en la superficie de blastos de la leucemia mielógena crónica. No pudo generarse respuesta inmunológica contra p210A y p210B, a pesar de intentarlo con diferentes donantes. Este resultado es coherente con su reducida afinidad por MHC.

10 Un paciente con leucemia mielógena crónica en fase crónica HLA A0201 respondió a la estimulación con p210C de células T, y mostró una reactividad cruzada de células T con el péptido p210cn nativo. La respuesta se observó después de la segunda ronda de estimulación de células T *in vitro* (figura 2B).

15 Los péptidos derivados de b2a2 también generaron una significativa respuesta inmunológica, según se mide mediante la secreción de gamma-interferón por células T CD3+. Los péptidos b2a2 A3, A4 y A5 generaron una respuesta inmunológica en dos donantes sanos (figura 3A). La respuesta contra b2a2 A3 fue más coherente entre los donantes. Las células T generadas en presencia de b2a2 A3 fueron capaces de identificar la secuencia nativa original. Esto tiene especial importancia debido a que la secuencia nativa es un ligante débil/intermedio a HLA. De nuevo, un paciente con CML en fase crónica HLA A0201 respondió a la estimulación con b2a2 A3 de células T, y mostró una reactividad cruzada de células T con el péptido b2a2 A (figura 3B).

20 El ELISPOT de gamma-interferón no siempre está asociado con la destrucción funcional. Por tanto, las líneas de células T obtenidas después de varias estimulaciones con el péptido análogo se ensayaron en un ensayo de cromosoma 51 clásico utilizando líneas de células diana cargadas con péptidos. Las células T generadas *in vitro* en presencia de p210C (figura 4A) y b2a2 A3 (figura 4B) fueron capaces de destruir la línea de células T2 cargada con péptidos específicos pero no sin el péptido o con el péptido control. Este experimento también se realizó utilizando líneas de células de leucemia mielógena crónica con el correspondiente HLA o blastos de CML que expresan la respectiva translocación de b3a2 o b2a2. Se generó una significativa citotoxicidad, lo cual genera la posibilidad de que los péptidos nativos no hayan sido naturalmente procesados y/o suficientemente expresados en la superficie de las células leucémicas.

### 30 **Ejemplo 12: Unión de HLA A0201 y HLA A0301 por análogos de péptidos sintéticos derivados de la oncoproteína WT1**

Los ensayos de termoestabilización con una línea celular TAP1/2-negativa (T2) y un protocolo modificado que emplea células Raji A0301 demostraron que varios péptidos que se había predicho que serían buenos ligantes a moléculas HLA A0201 o A0301 podían estabilizar moléculas de MHC de clase I A0201 o A0301 (tabla 2). Los análogos sintéticos WT1-A1, -B1, -C1 y -D1 que se había predicho que se unirían mejor a HLA A0201 que los respectivos péptidos WT-1 nativos mostraron una unión similar o mayor, comparado con WT1-A, -B, -C y -D (figura 5A). WT1-D1 mostró un nivel significativamente mayor de unión a HLA A0201 frente a WT1-D, que fue similar al control. Una comparación de la unión a HLA A0301 de A3WT1-A, -B, -C y -D con cada uno de sus respectivos tres análogos mostró una unión relativamente similar (figuras 5B-5E).

### 40 **Ejemplo 13: Inducción de una respuesta inmunológica de CD8 o CD3 contra análogos de péptidos sintéticos derivados de la oncoproteína WT1**

45 Las células primero se estimularon con células dendríticas cargadas con péptido derivadas de monocitos autólogos generadas en presencia de GM-CSF, IL-4, TNF-alfa, PGE2 y CD40L y se reestimularon con monocitos CD14+ cargados con péptido en presencia de IL-2 e IL-7. Después de dos a cuatro estimulaciones, las líneas de CTL CD8+ se evaluaron mediante un ELISPOT de IFN-alfa o mediante un ensayo de liberación de cromo utilizando líneas de células leucémicas con los correspondientes HLA cargadas (figuras 6A-6B). Varios péptidos análogos generaron unas respuestas inmunológicas mayores, es decir, aumentaron la frecuencia de precursores de células T CD8, en comparación con los péptidos nativos (figuras 7A-7D). Las células T CD8+ estimuladas con los nuevos péptidos sintéticos presentan reacción cruzada con la secuencia del péptido WT1 nativo y son capaces de destruir blastos de leucemia mielógena crónica con el correspondiente HLA (figura 8A-8B).

50 En la presente se citan las siguientes referencias:

1. Kessler *et al.*, J. Exp. Med., 185(4): pp. 629-640 (1997).
2. Dyall *et al.*, J. Exp. Med., 188(9): pp. 1553-1561 (1998).

3. Valmori *et al.*, J. Immunol., 165(1): pp. 533-538 (2000).

4. Valmori *et al.*, J. Immunol., 164(2): pp. 1125-1131 (2000).

Todas las patentes o publicaciones mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a la cual pertenece la invención.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Scheinberg, David  
Pinilla-Ibarz, Javier
- <120> Análogos de péptidos de unión a HLA sintéticos y sus usos.
- <130> D6552PCT
- 10 <140> 29-11-2004
- <150> US 60/525,955  
<151> 01-12-2003
- 15 <160> 50
- <170> Macintosh OS 10.2.8
- 20 <210> 1  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial
- 25 <220>  
<223> péptido nativo CMLA2
- <400> 1  
Ser Ser Lys Ala Leu Gln Arg Pro Val  
5
- 30 <210> 2  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial
- 35 <220>  
<223> péptido análogo p210F
- <400> 2  
Tyr Leu Lys Ala Leu Gln Arg Pro Val  
5
- 40 <210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial
- 45 <220>  
<223> péptido nativo CMLA3  
<400> 3  
Lys Gln Ser Ser Lys Ala Leu Gln Arg  
5
- 50 <210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial
- 55 <220>  
<223> péptido análogo p210A
- <400> 4  
Lys Gln Ser Ser Lys Ala Leu Gln Val  
5
- 60 <210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial















<210> 42  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> péptido análogo A3WT-1 B3  
 <400> 42  
 Gln Met Tyr Leu Gly Val Thr Leu Lys  
 10  
 <210> 43  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> péptido nativo A3WT-1 C  
 <400> 43  
 Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys  
 20  
 <210> 44  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> péptido análogo A3WT-1 C1  
 <400> 44  
 Phe Met Tyr Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys  
 30  
 <210> 45  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> péptido análogo A3WT-1 C2  
 <400> 45  
 Phe Met Cys Ala Tyr Pro Phe Cys Asn Lys  
 40  
 <210> 46  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> péptido análogo A3WT-1 C3  
 <400> 46  
 Phe Met Tyr Ala Tyr Pro Phe Cys Asn Lys  
 50  
 <210> 47  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> péptido nativo A3WT-1 D  
 <400> 47  
 Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg  
 5 10





**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos que es un péptido análogo de un péptido nativo que se une de modo específico a una molécula HLA A0201 sobre una célula característica de un estado patofisiológico en un mamífero, en el que la secuencia de aminoácidos del péptido análogo es YMFNPAPYL (SEQ ID NO:18), y la secuencia de aminoácidos del péptido nativo es RMFPNAPYL (SEQ ID NO:17).
- 2.- El péptido sintético de la reivindicación 1, en el que dicho péptido sintético se une a dicha molécula HLA A0201 con mayor afinidad que dicho péptido nativo.
- 3.- El péptido sintético de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho péptido análogo es un producto de la degradación del procesamiento de dicho péptido sintético.
- 10 4.- El péptido sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho péptido sintético es capaz de inducir la formación y la proliferación de células T citotóxicas humanas que presentan reacción cruzada con células humanas que presentan dicho péptido nativo.
- 5.- El péptido sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho estado patofisiológico, trastorno o enfermedad es el cáncer.
- 15 6.- Una composición inmunogénica que comprende:
- (a) el péptido sintético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una molécula de ADN que lo codifica; y
- (b) un adyuvante.
- 7.- La composición inmunogénica de la reivindicación 6, en la que dicho adyuvante es adyuvante de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, QS21 o BCG.
- 20 8.- La composición inmunogénica de la reivindicación 6 o 7, que comprende además un vehículo inmunogénico unido a dicho péptido sintético.
- 9.- La composición inmunogénica de la reivindicación 8, en la que dicho vehículo inmunogénico es una proteína, un péptido, o una célula presentadora de antígenos.
- 25 10.- La composición inmunogénica de la reivindicación 9, en la que dicha proteína o péptido es hemocianina de lapa, albúmina, o un poliaminoácido.
- 11.- La composición inmunogénica de la reivindicación 9, en la que dicha célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica.
- 12.- Un método *in vitro* para inducir la formación y la proliferación de células T citotóxicas humanas que producen una respuesta inmunológica heteroclítica contra células cancerosas, que comprende:
- 30 poner en contacto células inmunológicas humanas *in vitro* con el péptido sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición inmunogénica de las reivindicaciones 6-11, para activar dichas células inmunológicas; e
- 35 inducir la formación y la proliferación de dichas células T citotóxicas humanas reactivas contra las células que presentan dicho péptido sintético, en el que dichas células T en proliferación presentarán reacción cruzada con las células cancerosas que presentan un péptido nativo del cual se deriva dicho segmento de análogo, de modo que dichas células T citotóxicas humanas son capaces de producir una respuesta inmunológica heteroclítica contra las células cancerosas.
- 40 13.- El péptido sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición inmunogénica de las reivindicaciones 6-11, para su uso en el tratamiento del cáncer mediante la inducción de la formación y la proliferación de células T citotóxicas humanas que producen una respuesta inmunológica heteroclítica contra células cancerosas, que comprende:
- poner en contacto células inmunológicas humanas *in vivo* con el péptido sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición inmunogénica de las reivindicaciones 6-11, para activar dichas células inmunológicas; e

- 5 inducir la formación y la proliferación de dichas células T citotóxicas humanas reactivas contra las células que presentan dicho péptido sintético, en el que dichas células T en proliferación presentarán reacción cruzada con las células cancerosas que presentan un péptido nativo del cual se deriva dicho segmento de análogo, de modo que dichas células T citotóxicas humanas son capaces de producir una respuesta inmunológica heteroclítica contra las células cancerosas.
- 14.- El péptido sintético o la composición inmunogénica de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de la reivindicación 13, en el que dichas células inmunológicas se ponen en contacto *in vivo* con un individuo que padece cáncer.
- 10 15.- El péptido sintético o la composición inmunogénica de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de la reivindicación 13, en el que dichas células inmunológicas se ponen en contacto *in vivo* con un donante, comprendiendo además dicho método:
- obtener dichas células T citotóxicas del donante; e
- infundir dichas células T citotóxicas en un individuo que padece cáncer.
- 15 16.- El péptido sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición inmunogénica de las reivindicaciones 6-11, para su uso en el tratamiento del cáncer mediante la inducción de la formación y la proliferación de células T citotóxicas humanas que producen una respuesta inmunológica heteroclítica contra células cancerosas, que comprende:
- 20 poner en contacto células inmunológicas humanas de un paciente o donante sano *ex vivo* con el péptido sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición inmunogénica de las reivindicaciones 6-11, para activar dichas células inmunológicas;
- infundir dichas células inmunológicas activadas en un individuo que padece cáncer; e
- 25 inducir la formación y la proliferación de dichas células T citotóxicas humanas reactivas contra las células que presentan dicho péptido sintético, en el que dichas células T en proliferación presentarán reacción cruzada con las células cancerosas que presentan un péptido nativo del cual se deriva dicho segmento de análogo, de modo que dichas células T citotóxicas humanas son capaces de producir una respuesta inmunológica heteroclítica contra las células cancerosas.
- 17.- El péptido sintético o la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 13-16 para su uso en el tratamiento de las reivindicaciones 13-16, en el que dicho cáncer está activo o en remisión.

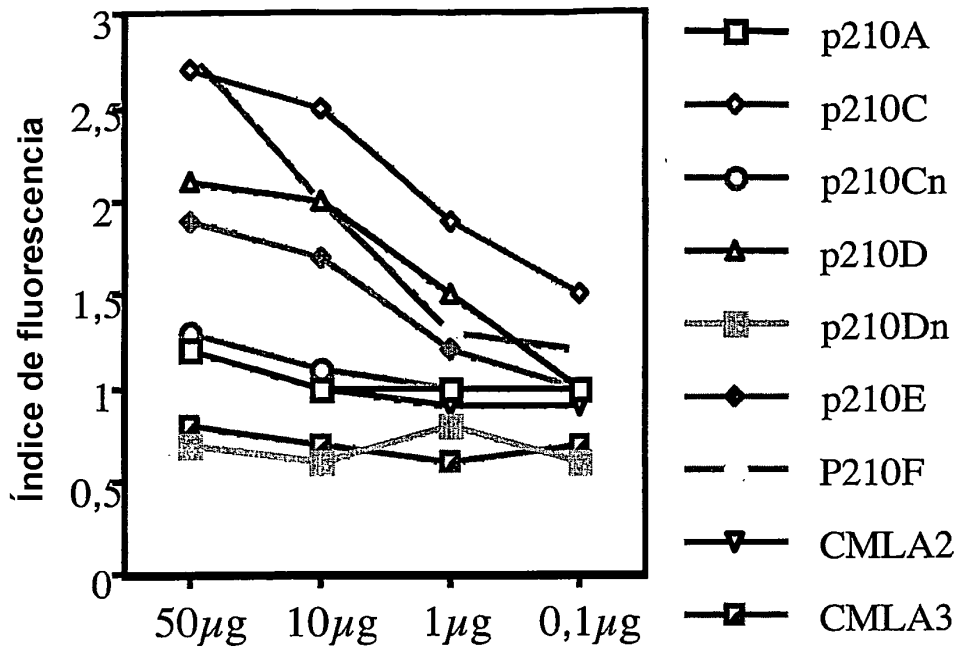


Fig. 1A

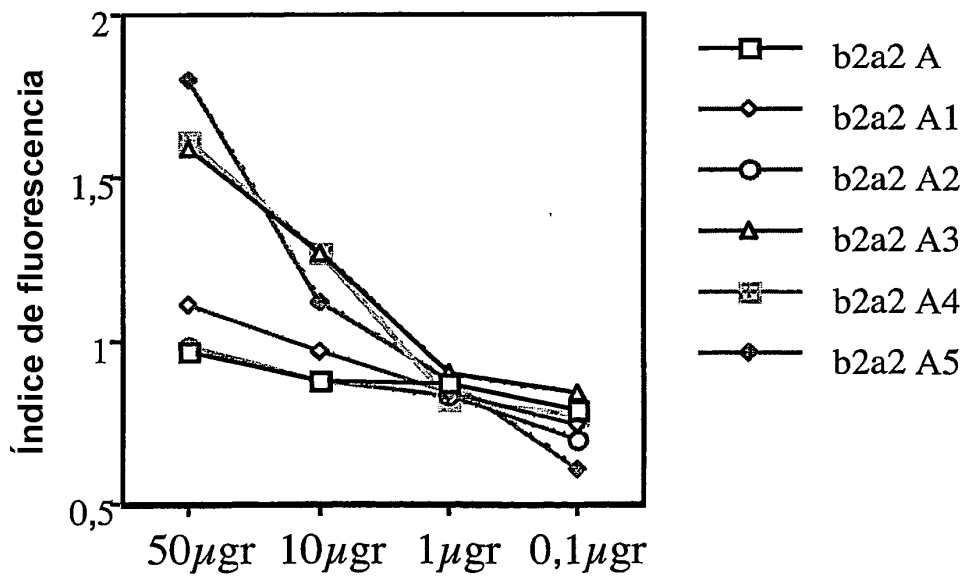


Fig. 1B

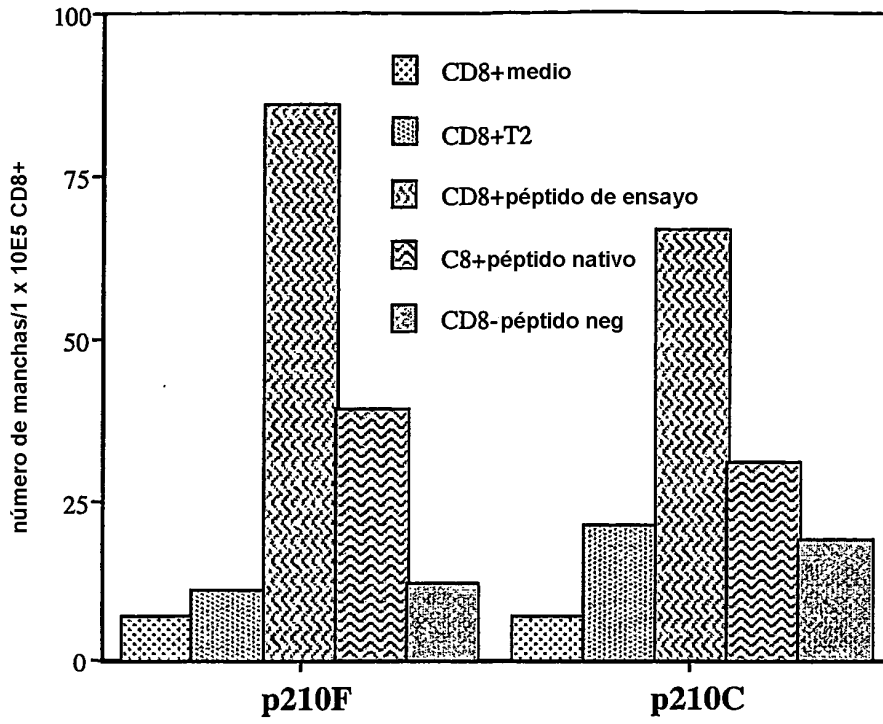


Fig. 2A

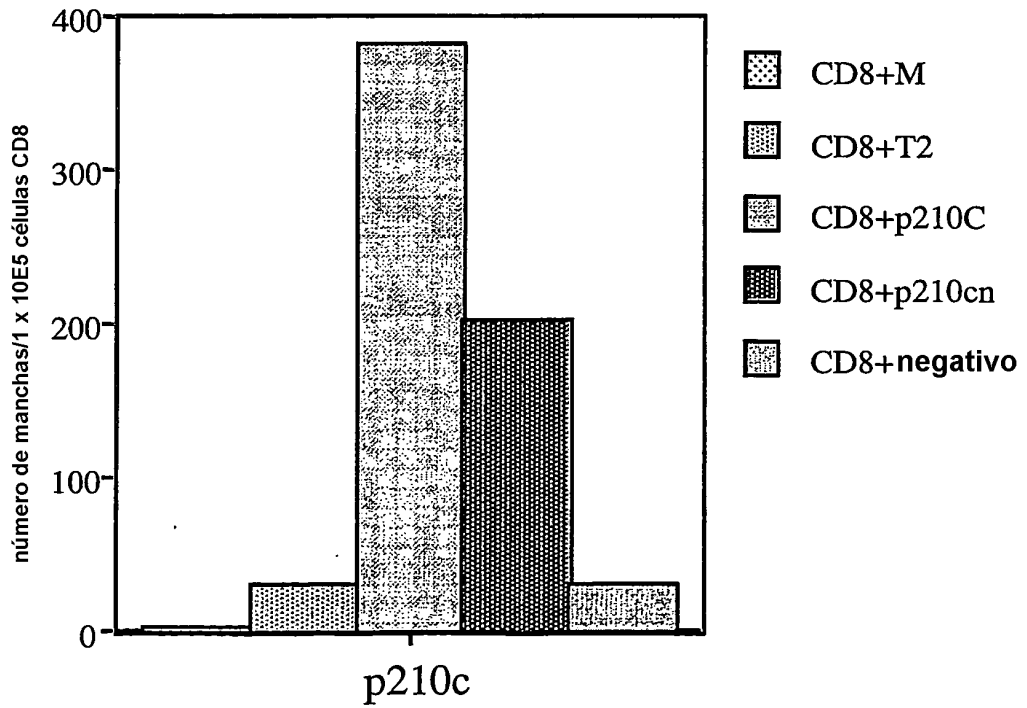


Fig. 2B

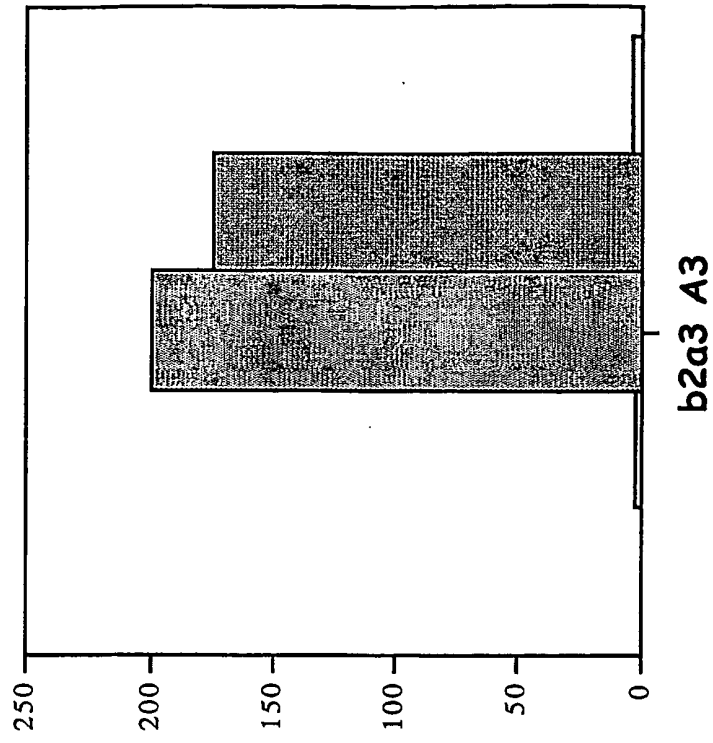


Fig. 3B

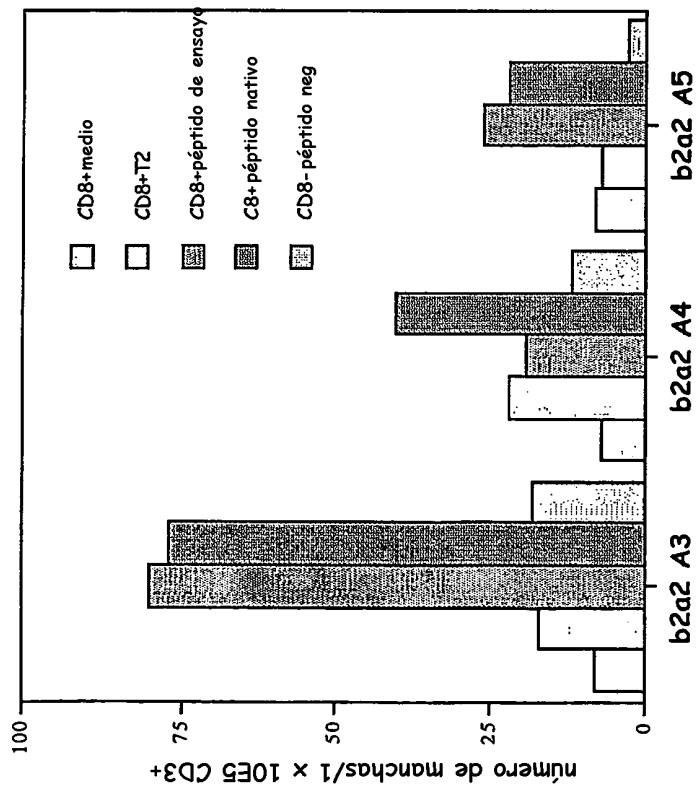


Fig. 3A

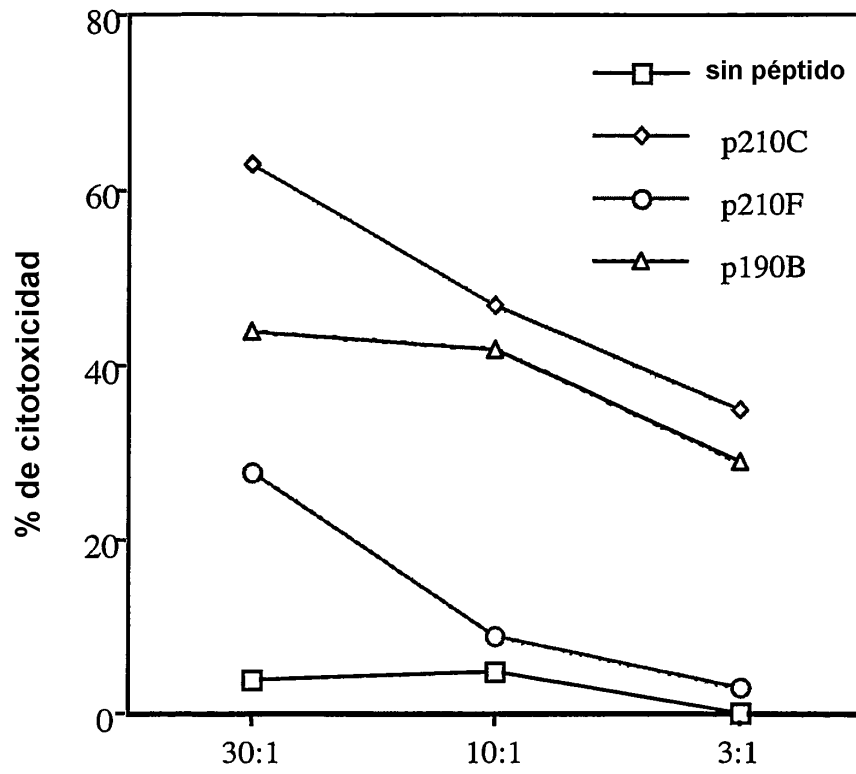


Fig. 4A

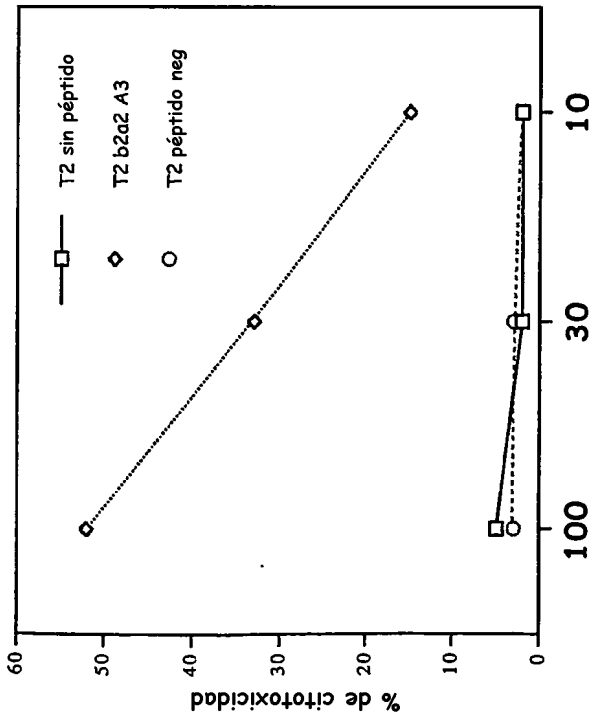
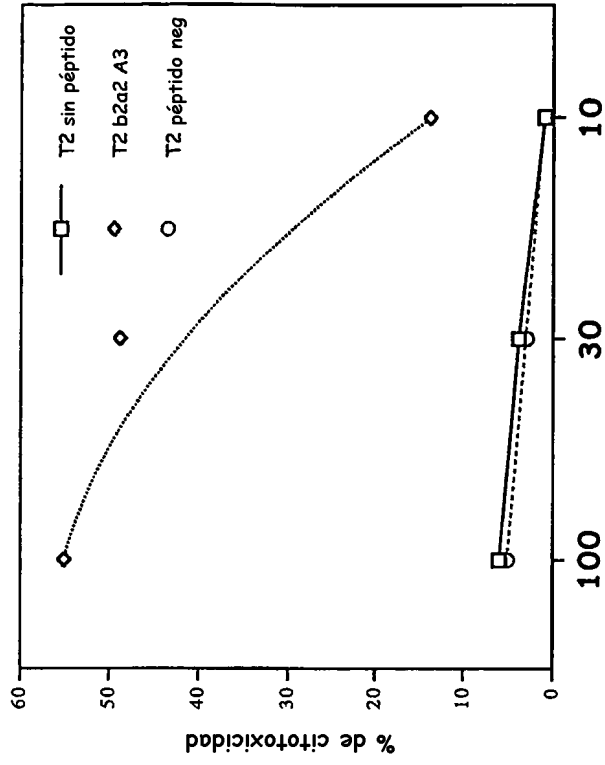


Fig. 4B

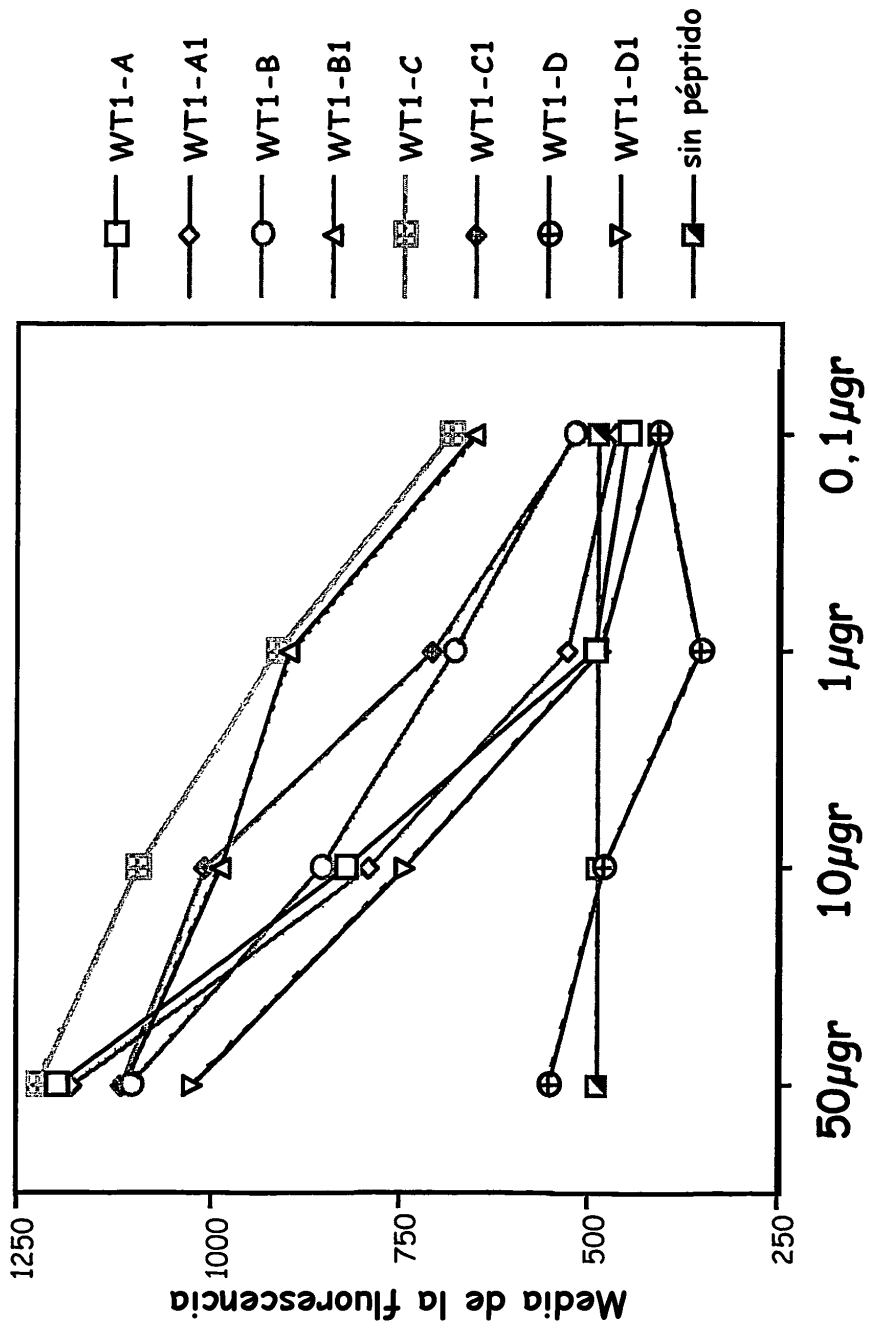


Fig. 5A



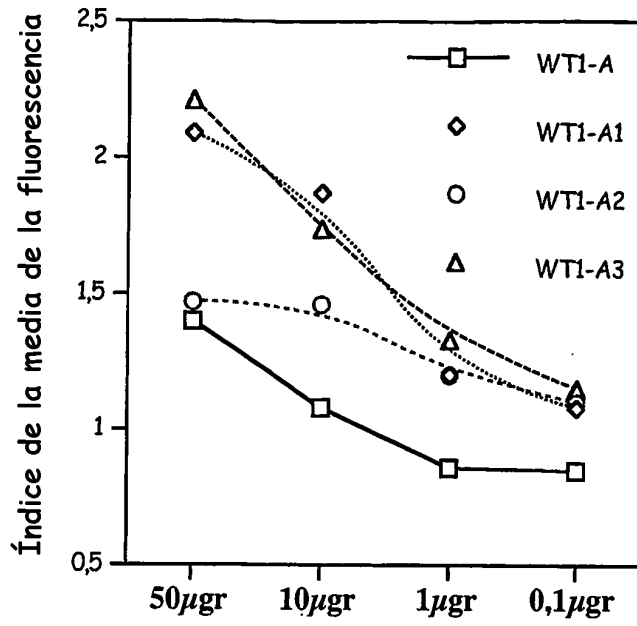


Fig. 5B

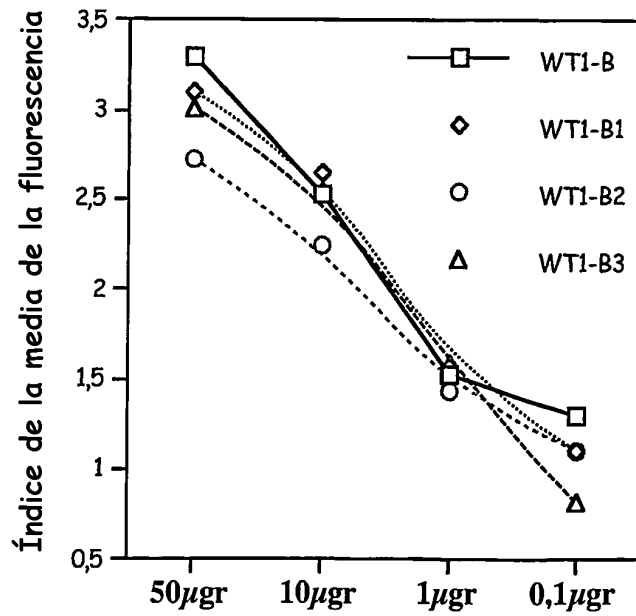


Fig. 5C

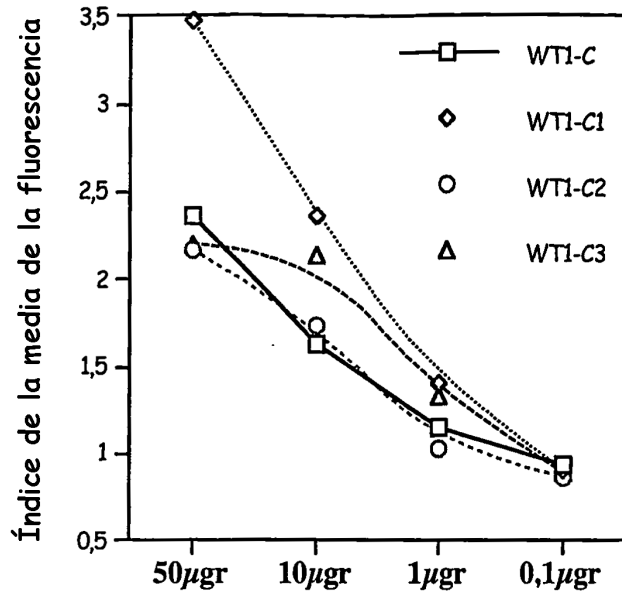


Fig. 5D

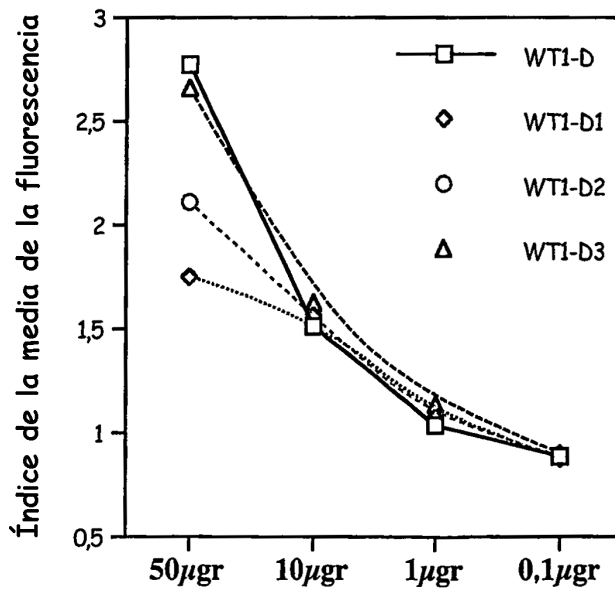


Fig. 5E

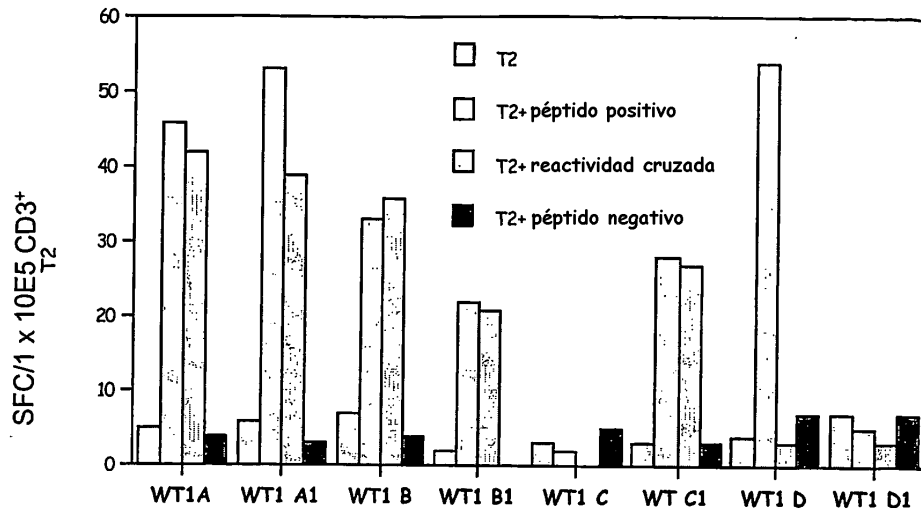


Fig. 6A

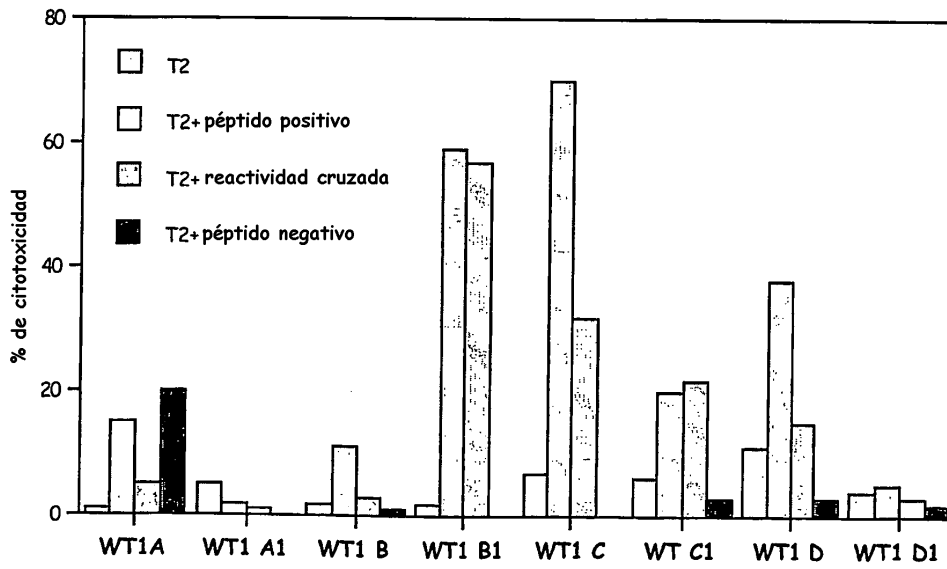


Fig. 6B

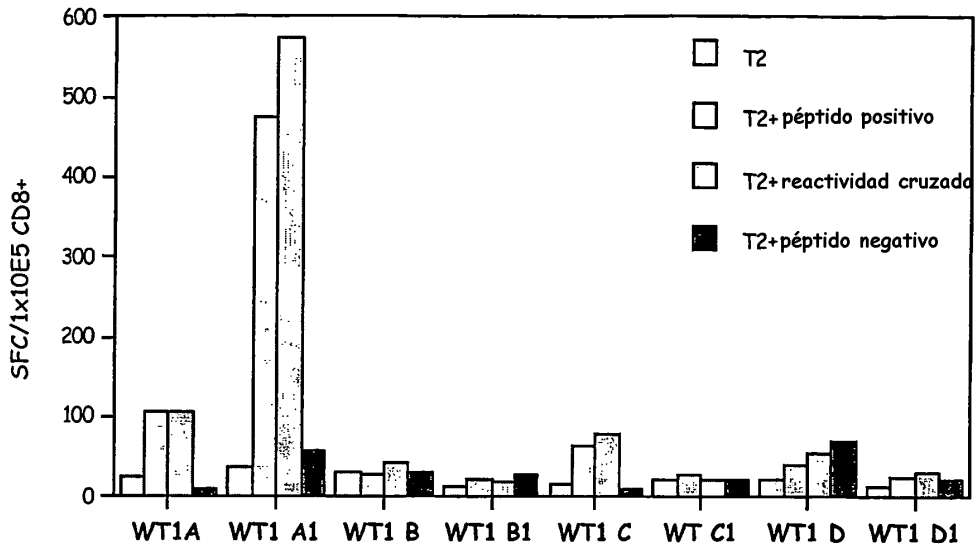


Fig. 7A

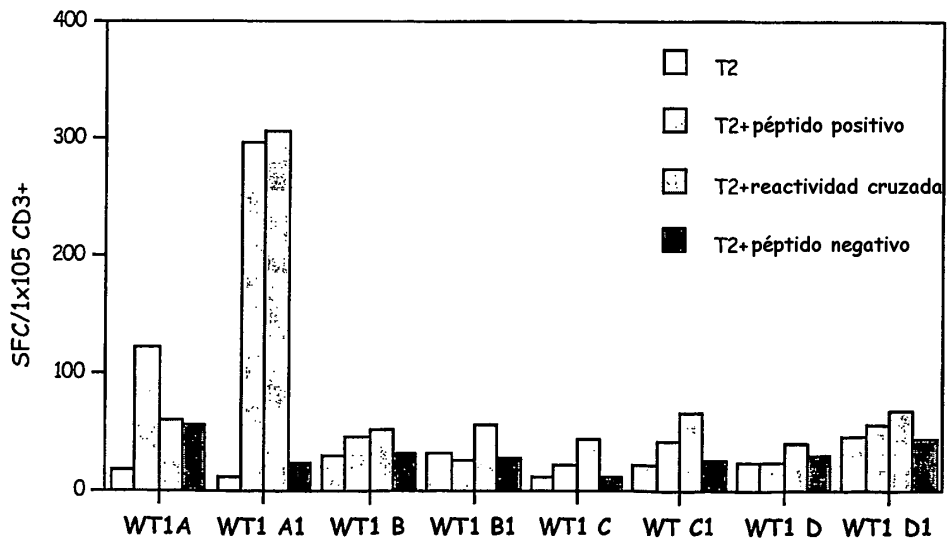


Fig. 7B

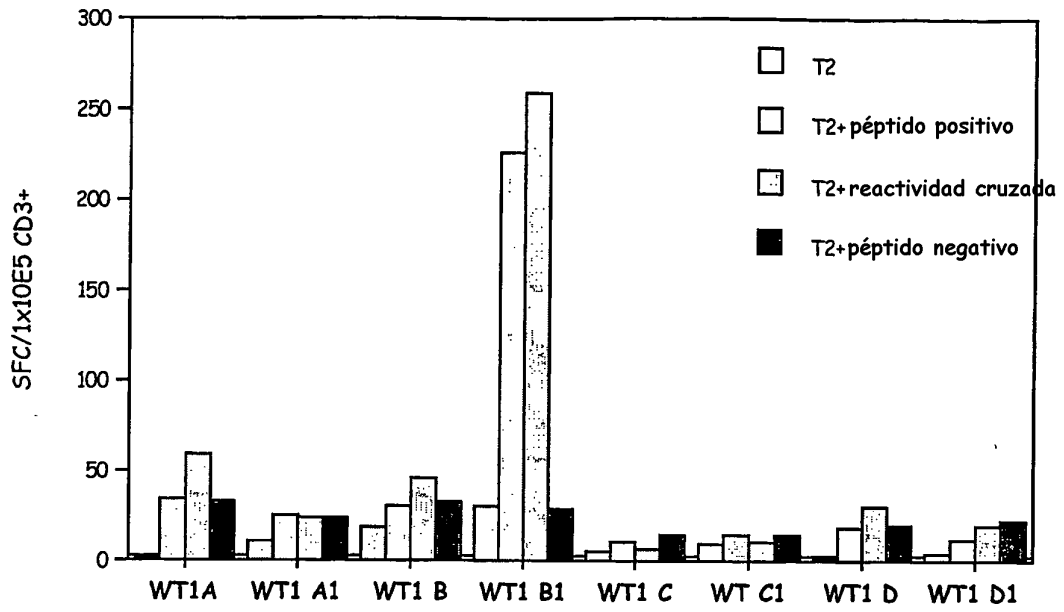


Fig. 7C

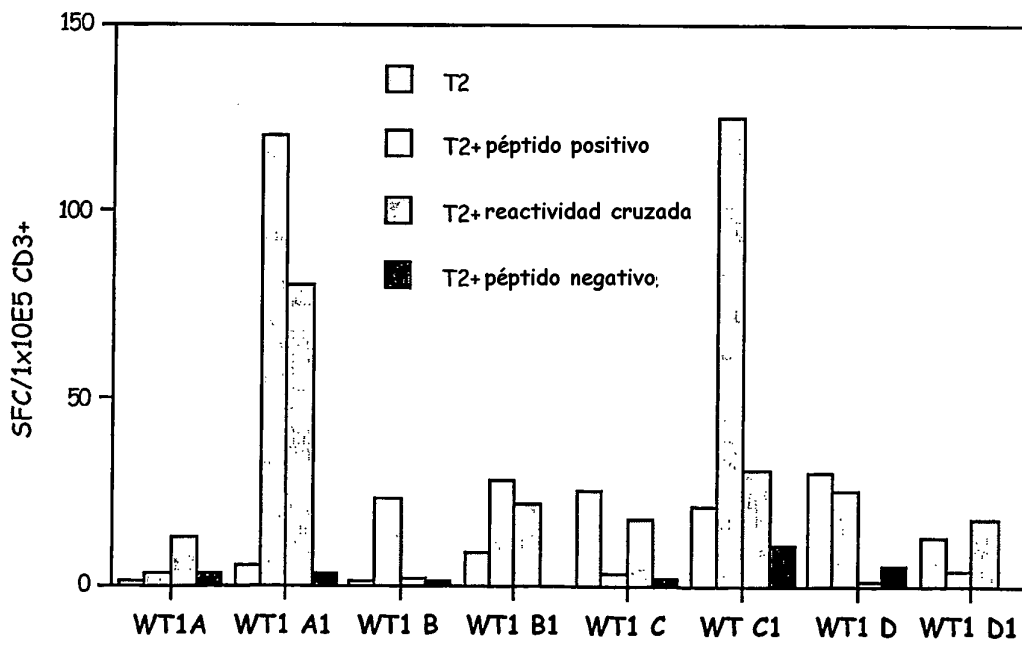


Fig. 7D

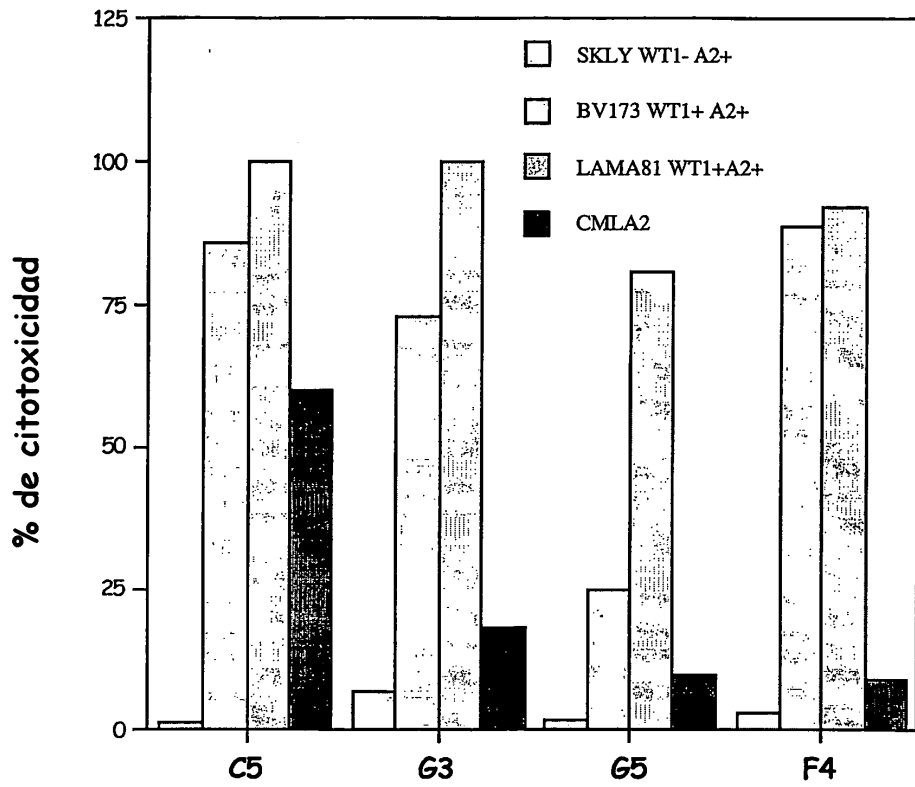


Fig. 8A

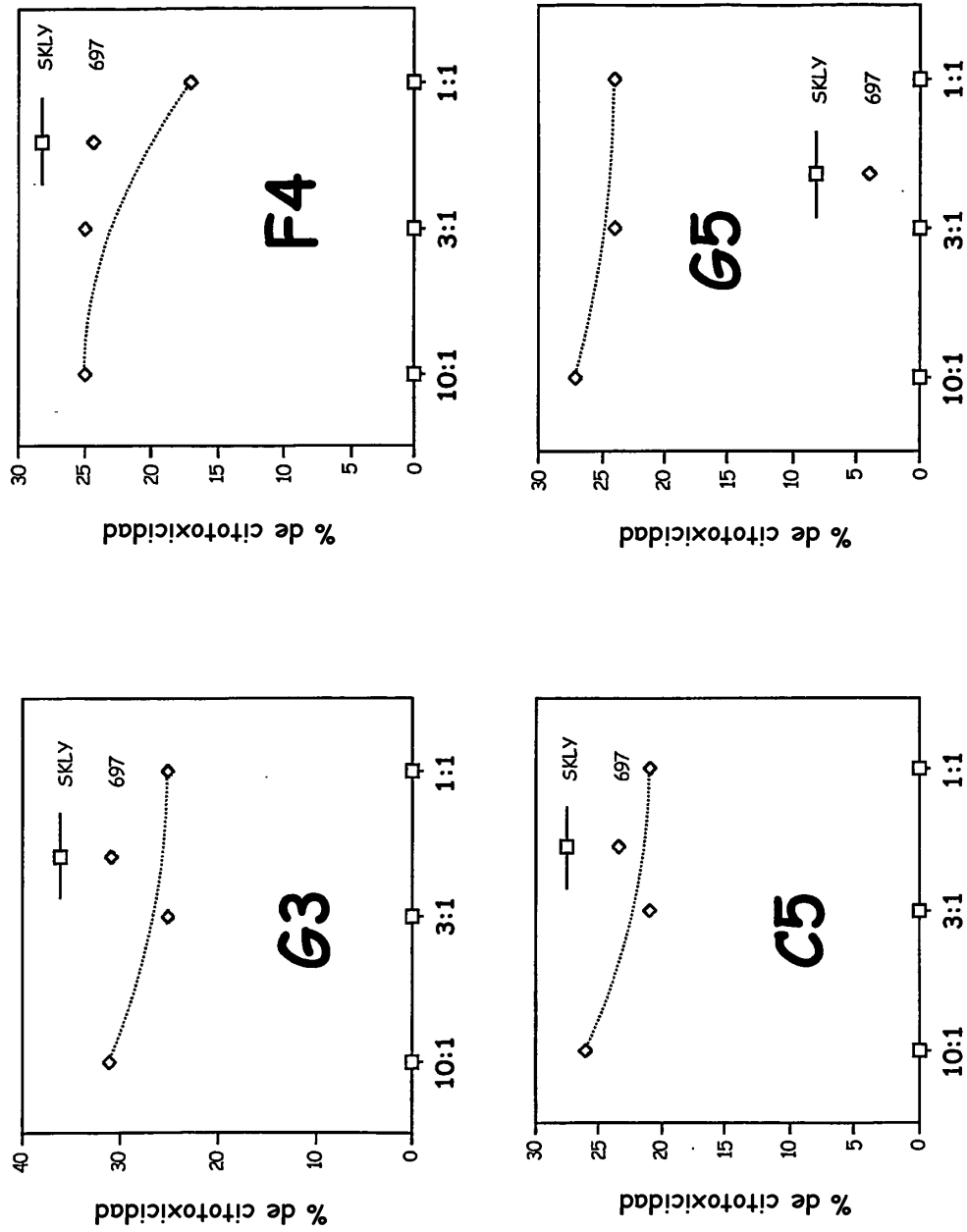


Fig. 8B