

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 766**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01) **G01N 33/53** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 14/82** (2006.01)

**C12N 5/07** (2010.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/06** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2010 E 10767122 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2423310**

54 Título: **Péptido auxiliar antigénico de cáncer**

30 Prioridad:

**23.04.2009 JP 2009105286**

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

**12.02.2015**

73 Titular/es:

**INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER  
IMMUNOLOGY, INC. (100.0%)  
13-9, Enoki-cho  
Suita-shi, Osaka 564-0053, JP**

72 Inventor/es:

**SUGIYAMA, HARUO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 528 766 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 auxiliar antigénico de cáncer

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un péptido auxiliar WT1, un polinucleótido que codifica el péptido, células T auxiliares específicas del WT1 inducidas por el péptido, una composición farmacéutica para tratar/prevenir el cáncer que los comprende y similares.

10

**Técnica antecedente**

El gen WT1 (gen 1 del tumor de Wilms) es un gen que se identificó como el gen causante del tumor de Wilms que es un tumor renal que se produce en la niñez (Documentos No Patente 1 y 2), y es un factor de transcripción que tiene una estructura en dedos de zinc. Al principio, el gen WT1 se consideraba como un gen supresor del cáncer. Sin embargo, una investigación posterior demostró que el gen anterior funcionaba más bien como un gen cancerígeno en tumores de órganos hematopoyéticos y cánceres sólidos (Documentos No Patente 3 a 6).

15

Aunque el gen WT1 se expresa altamente en muchos tumores malignos, un producto del gen WT1 que es una proteína propia que no tiene mutación se ha verificado en cuanto a la existencia o la no existencia de la inmunogenicidad in vivo. Como resultado, se ha demostrado que una proteína derivada del gen WT1 que se expresa altamente en células tumorales se fragmenta por un proceso intracelular y el péptido resultante forma un complejo con una molécula MHC clase I que se presenta en la superficie celular, y que tal complejo lo reconocen las células T citolíticas (de aquí en adelante designadas como CTL) y pueden inducirse por vacunación con el péptido WT1 (Documentos No Patente 7 a 9). También se ha demostrado que los ratones inmunizados con un péptido WT1 o un ADNc WT1 rechazan células tumorales que expresan el gen WT1 implantadas en una tasa alta (Documentos No Patente 7 a 10) pero los tejidos normales que expresan endógenamente el gen WT1 no son dañadas por las CTL que se inducen. Hasta este momento, se ha sugerido fuertemente que es posible inducir CTL específicas de WT1 no solo en ratones sino también en seres humanos, y que tales CTL tiene una actividad citotóxica contra células tumorales que expresan altamente el gen WT1, pero no tienen actividad citotóxica contra células normales que expresan endógenamente el gen WT1 (Documentos No Patente 7 y 10 a 14).

20

25

30

Por otro lado, se ha informado de que la presencia de células T auxiliares específicas de un antígeno canceroso es importante con el fin de inducir eficazmente las CTL (Documento No Patente 15). Las células T auxiliares (células T CD4 positivas) se inducen, proliferan y se activan al reconocer un complejo de una molécula MHC clase II con un péptido antigénico sobre las células presentadoras de antígeno. Las células T auxiliares activadas producen citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, o un interferón (IFN), y promueven la proliferación, diferenciación y maduración de células B y otros subgrupos de células T. Por lo tanto, se considera que un péptido antigénico que se une a una molécula MHC clase II activa eficazmente las CTL y otras por medio de la inducción de células T auxiliares y potencia una función inmunitaria (Documento No Patente 16). Hasta ahora, solamente se ha informado de un péptido antigénico que se une a HLA-DRB1\*0401 y HLA-DRB1\*0405 de una molécula MHC clase II con respecto al WT1 (Documento No Patente 17 y Documento Patente 1), y era necesario encontrar péptidos antígenos para otros subtipos.

35

40

45

**Documentos de la técnica precedente****Documentos Patente**

Documento Patente 1: Publicación Internacional N° WO 2005/045027

50

**Documentos No Patente**

Documento No Patente 1: Daniel A. Haber et al., Cell. 1990 Jun 29; 61(7): 1257-69.  
 Documento No Patente 2: Call KM et al., Cell. 1990 Feb 9; 60(3): 509-20.  
 Documento No Patente 3: Menke AL et al., Int Rev Cytol. 1998; 181: 151-212. Review.  
 Documento No Patente 4: Yamagami T et al., Blood. 1996 Abr 1; 87(7): 2878-84.  
 Documento No Patente 5: Inoue K et al., Blood. 1998 Abr 15; 91(8): 2969-76.  
 Documento No Patente 6: Tsuboi A et al., Leuk Res. 1999 May; 23(5): 499-505.  
 Documento No Patente 7: Oka Y et al., J Immunol. 2000 Feb 15; 164(4): 1873-80.  
 Documento No Patente 8: Melief CJ et al., Immunol Rev. Jun 1995; 145: 167-77.  
 Documento No Patente 9: Ritz J, J Clin Oncol. Feb 1994; 12(2): 237-8.  
 Documento No Patente 10: Tsuboi A et al., J Clin Immunol. May 2000; 20(3): 195-202.  
 Documento No Patente 11: Oka Y et al., Immunogenetics. Feb 2000; 51(2): 99-107.  
 Documento No Patente 12: Ohminami H et al., Blood. Ene 2000 1; 95(1): 286-93.  
 Documento No Patente 13: Gao L et al., Blood. 1 Abr 2000; 95(7): 2198-203.

55

60

65

Documento No Patente 14: Ohminami H et al., Blood. Ene 2000 1; 95(1): 286-93.

Documento No Patente 15: Cancer. Res. 62: 6438, 2002

Documento No Patente 16: J. Immunol. Immunother., 24: 195, 2001

Documento No Patente 17: Cancer. Immunol. Immunother. 51: 271, 2002

5 El documento WO2005/045027 desvela péptidos derivados del tumor WT1 que se unen a MHC clase II con la secuencia KRYFKLSHLQMHSRKH. En la publicación Cancer Immunol Immunother, vol., 51, 2002, 271-281 se desvelan péptidos derivados del tumor WT1 que se unen a MHC clase II con la secuencia PQQMGSDVRDLNALL.

## 10 **Divulgación de la invención**

### **Problemas a resolver por la invención**

15 En consecuencia, un objetivo que se tiene que alcanzar por la presente invención es proporcionar un péptido que induzca células T auxiliares específicas de WT1 que se unan a varias moléculas MHC clase II, un polinucleótido que codifique el péptido, las células T auxiliares WT1 inducidas por el péptido, y una composición farmacéutica para el tratamiento/prevención del cáncer que los comprende.

### **Medios para resolver los problemas**

20 Los presentes inventores han estudiado intensivamente para conseguir el objetivo anterior. Como resultado, han encontrado que un péptido que tiene una parte de una secuencia de aminoácidos contiguos que codifican una proteína WT1 funciona como péptido auxiliar antígeno de cáncer, en otras palabras, el péptido se presenta sobre las células presentadoras de antígeno uniéndose a una molécula MHC clase II e induce células T auxiliares específicas de WT1, y han demostrado que el péptido se puede utilizar en una composición farmacéutica para tratar/prevenir el cáncer.

Por lo tanto, la presente invención proporciona:

30 1. Un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en aminoácidos contiguos derivados de una proteína WT1 que induce células T auxiliares específicas de WT1 uniéndose a una molécula MHC clase II, donde la secuencia de aminoácidos se selecciona de entre:

- 35 (a) la secuencia de aminoácidos que se presenta en la SEC ID N° 3;  
 (b) la secuencia de aminoácidos que se presenta en la SEC ID N° 4;  
 (c) la secuencia de aminoácidos que se presenta en la SEC ID N° 5; y  
 (d) una secuencia de aminoácidos en la que se sustituye, elimina o añade un solo un aminoácido en las secuencias de aminoácidos de (a) a (c).

40 2. El péptido de acuerdo con el punto 1, donde la secuencia de aminoácidos es la secuencia de aminoácidos que se presenta en la SEC ID N° 3.

3. El péptido de acuerdo con el punto 1 o 2, donde

- 45 (i) la molécula MHC clase II se selecciona de entre DRB1\*0101, DRB1\*0405, DRB1\*0802, DRB1\*0803, DRB1\*0901, DRB1\*1201, DRB1\*1403, DRB1\*1501, DRB1\*1502, DPB1\*0201, DPB1\*0202, DPB1\*0402, DPB1\*0501, DPB1\*0901, DQB1\*0301, DQB1\*0302, DQB1\*0401, DQB1\*0501, DQB1\*0601, DQB1\*0602, y DRB5\*0102; o  
 50 (ii) la molécula MHC clase II se selecciona de entre DRB1\*0101, DRB1\*0405, DRB1\*1502, DPB1\*0201, DPB1\*0202, y DQB1\*0601.

4. Un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3.

5. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con el punto 4.

55 6. Un anticuerpo contra el péptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3.

7. Una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer, que comprende el péptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, el polinucleótido de acuerdo con el punto 4, o el vector de acuerdo con el punto 5.

8. Un péptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, un polinucleótido de acuerdo con el punto 4, o un vector de acuerdo con el punto 5, para su uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer.

65 9. Células presentadoras de antígeno que presentan el péptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3 por medio de la molécula MHC clase II de acuerdo con el punto 3.

10. Un método para inducir células presentadoras de antígeno, que comprende el cultivo de células presentadoras de antígeno inmaduras en presencia del péptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, y la inducción de células presentadoras de antígeno, que presentan el péptido por medio de la molécula MHC clase II de acuerdo con el punto 3, a partir de células presentadoras de antígeno inmaduras.

11. Células T auxiliares específicas de WT1 que se inducen por el péptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3.

12. Un método para inducir células T auxiliares específicas de WT1, que comprende el cultivo de células mononucleares de sangre periférica en presencia del péptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, y la inducción de células T auxiliares específicas de WT1 a partir de células mononucleares de sangre periférica.

13. Un kit para inducir células T auxiliares específicas de WT1, que comprende, como principio activo, el péptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3.

14. Un kit para prevenir o tratar el cáncer, que comprende, como principio activo, el péptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, el polinucleótido de acuerdo con el punto 4, o el vector de acuerdo con el punto 5.

15. Un método para determinar la presencia o cantidad de células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto que tiene la molécula MHC clase II de acuerdo con el punto 3, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) hacer reaccionar el péptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3 con una muestra derivada del sujeto; y luego
- (b) determinar la presencia o cantidad de una citoquina contenida en la muestra.

#### Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, es posible obtener péptidos auxiliares WT1 que se unen a muchos tipos de moléculas MHC clase II tales como DRB1\*0101, DRB1\*0405, DRB1\*0802, DRB1\*0803, DRB1\*0901, DRB1\*1201, DRB1\*1403, DRB1\*1501, DRB1\*1502, DPB1\*0201, DPB1\*0202, DPB1\*0402, DPB1\*0501, DPB1\*0901, DQB1\*0301, DQB1\*0302, DQB1\*0401, DQB1\*0501, DQB1\*0601, DQB1\*0602, y DRB5\*0102. Se puede proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento/prevenición del cáncer que los incluye y similares. Puede ser posible inducir células T auxiliares específicas de WT1 in vivo e in vitro en varios sujetos (en particular, la mayoría de los japoneses tienen las moléculas anteriores). Como las células T auxiliares específicas de WT1 se inducen por la presente invención, es posible también activar eficazmente células T y células B en cánceres que expresan altamente el WT1.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados obtenidos por medición de la proliferación celular después de la estimulación de cada línea celular T específica del péptido, que se preparó por pulsación con cada uno de los tres péptidos (mWT1<sub>35</sub>, m WT1<sub>86</sub> y m WT1<sub>294</sub>), con cada péptido. En el dibujo, el símbolo “-” muestra un péptido sin estimulación.

La Fig. 2 muestra los resultados obtenidos por medición de la proliferación celular después de la estimulación de cada línea celular T específica del péptido, que se prepararon pulsando con tres péptidos (mWT1<sub>35</sub>, m WT1<sub>86</sub> y m WT1<sub>294</sub>), con cada péptido correspondiente en presencia de un anticuerpo anti-MHC clase I o clase II. En el dibujo, el símbolo “-” muestra un péptido sin estimulación. El símbolo “cpm” En la ordenada muestra los recuentos por minuto.

La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos por medición de la proliferación celular de cada línea celular T específica del péptido WT1 en respuesta a las células C1498, C1498 pulsadas con tres péptidos (mWT1<sub>35</sub>, m WT1<sub>86</sub> y m WT1<sub>294</sub>) así como células C1498 que tienen expresión forzada de proteína WT1. El símbolo “cpm” En la ordenada muestra los recuentos por minuto.

La Fig. 4 muestra los resultados obtenidos por la medición de la capacidad para producir IFN- $\gamma$  en cada línea celular T específica del péptido preparada por pulsación con los tres péptidos (mWT1<sub>35</sub>, m WT1<sub>86</sub> y m WT1<sub>294</sub>).

La Fig. 5 muestra los resultados obtenidos por la medición de la actividad citotóxica de CTL de tres péptidos (mWT1<sub>35</sub>, m WT1<sub>86</sub> y m WT1<sub>294</sub>). • Muestra los resultados de experimentos llevados a cabo utilizando células RMAS pulsadas con un péptido WT1<sub>126</sub> (péptido restringido a MHC clase I). ○ muestra los resultados de experimentos que se llevan a cabo utilizando células RMAS control.

La Fig. 6 muestra un dibujo esquemático de series de tiempo cuando se lleva a cabo la implantación tumoral y la inmunización en un experimento de implante tumoral. Se llevó a cabo la inmunización con un péptido auxiliar mWT1<sub>35</sub> los días 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, y 21<sup>o</sup> tras la implantación de células de leucemia que expresan WT1 a ratones, y se llevó a cabo la disección el día 29<sup>o</sup>. Las flechas blancas hacia abajo muestran los puntos de tiempo en los que se administró un control intradérmico (PBS) (IFA/30  $\mu$ l). Las flechas negras hacia abajo muestran los puntos de tiempo en los que se administró intradérmicamente el péptido auxiliar mWT1<sub>35</sub> (50  $\mu$ M/IFA/30  $\mu$ l).

La Fig. 7 muestra los tamaños tumorales en ratones inmunizados con un péptido auxiliar nWT1<sub>35</sub> y una proporción de las poblaciones de ratones libres de enfermedad. En los ratones inmunizados con un péptido

auxiliar mWT1<sub>35</sub>, 4 de 10 ratones estaban libres de enfermedad. Por otro lado, en ratones inmunizados con un control no había ratones libres de enfermedad en 9 ratones.

La Fig. 8 muestra la tasa de supervivencia libre de enfermedad en ratones inmunizados con un péptido auxiliar mWT1<sub>35</sub>.

5 La Fig. 9 muestra la actividad citotóxica de CTL en ratones inmunizados con un péptido auxiliar mWT1<sub>35</sub>. • muestra los resultados de experimentos que se llevaron a cabo utilizando células pulsadas con un péptido mWT1<sub>126</sub> (péptido MHC I). ○ muestra los resultados de experimentos que se llevaron a cabo utilizando células RMAS control. Las cifras entre paréntesis representan el tamaño del tumor (mm).

10 La Fig. 10 muestra la actividad citotóxica de CTL específicas de mWT1 en ratones control. ● muestra los resultados de los experimentos que se llevaron a cabo utilizando células RMAS pulsadas con un péptido mWT1<sub>126</sub> (péptido MHC I). ○ muestra los resultados de experimentos que se llevaron a cabo utilizando células RMAS de control. Las cifras entre paréntesis representan el tamaño del tumor (mm).

La Fig. 11 muestra la actividad citotóxica de CTL específicas del péptido mWT1<sub>126</sub> (izquierda) y la proporción de células T positivas al tetrámero mWT1<sub>126</sub> (derecha) cuando se administró un péptido mWT1<sub>126</sub>.

15 La Fig. 12 muestra los resultados obtenidos por medición de la proliferación celular por estimulación con el péptido mWT1<sub>35</sub> en células mononucleares de sangre periférica de cada sujeto sano que tiene moléculas MHC clase II.

20 La Fig. 13 muestra los resultados obtenidos midiendo la proliferación celular cuando un Respondedor [PMBC derivadas de un sujeto sano positivo a DRB1\*0101/0405, DPB1\*0201/0402, y DQB1\*0401/0501 (sujeto sano A)] se trataba con un Estimulador [PMBC derivadas de un sujeto sano positivo a DRB1\*0405/0901, DPB1\*0201/0501, y DQB1\*0303/0401 (sujeto sano B)]. En la ordenada se muestra la cantidad de <sup>3</sup>H-timidina incorporada (cpm). La abscisa muestra los tipos de varios anticuerpos que se añadieron (sin anticuerpo, anticuerpo anti-HLA-DR, anticuerpo anti-HLA-DP, y anticuerpo anti-HLA-DQ).

25 La Fig. 14 muestra los resultados obtenidos midiendo la proliferación cuando un Respondedor [PMBC derivadas de un sujeto sano positivo a DRB1\*0101/0405, DPB1\*0201/0402, y DQB1\*0401/0501 (sujeto sano A)] se trataba con un Estimulador [PMBC derivadas de un sujeto sano positivo a DRB1\*0405/0803, DPB1\*0202/0501, y DQB1\*0401/0601 (sujeto sano G)]. En la ordenada se muestra la cantidad de <sup>3</sup>H-timidina incorporada (cpm). La abscisa muestra los tipos de varios anticuerpos que se añadieron (sin anticuerpo, anticuerpo anti-HLA-DR, anticuerpo anti-HLA-DP, y anticuerpo anti-HLA-DQ).

30 La Fig. 15 muestra los resultados obtenidos midiendo la proliferación cuando un Respondedor [PMBC derivadas de un sujeto sano positivo a DRB1\*0101/0405, DPB1\*0201/0402, y DQB1\*0401/0501 (sujeto sano A)] se trataba con un Estimulador [PMBC derivadas de un sujeto sano positivo a DRB1\*0101/0803, DPB1\*0501/, y DQB1\*0501/0601 (sujeto sano H)]. En la ordenada se muestra la cantidad de <sup>3</sup>H-timidina incorporada (cpm). La abscisa muestra los tipos de varios anticuerpos que se añadieron (sin anticuerpo, anticuerpo anti-HLA-DR, anticuerpo anti-HLA-DP, y anticuerpo anti-HLA-DQ).

35 La Fig. 16 muestra los resultados midiendo la capacidad de producción de IFN- $\gamma$  cuando un Respondedor [PMBC derivadas de un sujeto sano positivo a DRB1\*0405/0803, DPB1\*0202/0501, y DQB1\*0401/0601 (sujeto sano G)] se trata con un Estimulador (células L que tienen introducido un gen DQB1\*0601). En la ordenada se muestra una proporción de la cantidad de IFN- $\gamma$  en células T. La abscisa muestra la presencia o ausencia (+ o -) de un pulso con un péptido mWT1<sub>35</sub>.

40 La Fig. 17 muestra los resultados midiendo la proliferación celular cuando un Respondedor [PMBC derivadas de un sujeto sano positivo a DRB1\*1502/1502, DPB1\*0201/0901, y DQB1\*0601/0601 (sujeto sano D)] se trató con un Estimulador (PMBC derivado del mismo sujeto sano que el Respondedor). En la ordenada se muestra la cantidad de <sup>3</sup>H-timidina incorporada (cpm). La abscisa muestra los tipos de varios anticuerpos que se añadieron (sin anticuerpo, anticuerpo anti-HLA-DR, anticuerpo anti-HLA-DP, y anticuerpo anti-HLA-DQ).

45 La Fig. 18 muestra los resultados midiendo la capacidad de producción de IFN- $\gamma$  cuando un Respondedor [PMBC derivadas de un sujeto sano positivo a DRB1\*0101/1501, DPB1\*0201/0402, y DQB1\*0501/0602 (sujeto sano I)] se trató con un Estimulador (PMBC derivado del mismo sujeto sano que el Respondedor). En la ordenada se muestra la proporción de una cantidad de IFN- $\gamma$  en células T. La abscisa muestra la presencia o ausencia (+ o -) de un pulso con un péptido mWT1<sub>35</sub>.

55 La presente divulgación se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en aminoácidos derivados de una proteína WT1 de ratón o humana. El gen WT1 se expresa altamente, por ejemplo, en tumores de órganos hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple, y linfoma maligno; cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello de útero, y cáncer ovárico. Los péptidos desvelados pueden estar presentes en células cancerosas que expresan el gen WT1 en gran cantidad.

60 Un péptido de la divulgación es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en aminoácidos contiguos derivados de la proteína WT1 representada en la SEC ID N° 2, que mantiene la capacidad de unirse a moléculas MHC clase II como se muestra posteriormente, y tiene la capacidad de inducir las células T auxiliares específicas de WT1. No hay ninguna limitación particular en la secuencia de aminoácidos y la longitud del péptido siempre que el péptido tenga las características anteriores. Sin embargo, los péptidos demasiado largos son susceptibles a la acción de las proteasas, y los péptidos demasiado cortos no pueden unirse bien a una ranura de acomodación del péptido. La longitud del péptido es preferentemente de 10 a 25 aminoácidos, más preferentemente

de 15 a 21 aminoácidos, más preferentemente de 16 a 20 aminoácidos, por ejemplo, de 17 aminoácidos, 18 aminoácidos, o 19 aminoácidos. Ejemplos específicos del péptido de la presente invención son los que tienen la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 3; la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 4; y la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 5.

5 También, el péptido de la presente divulgación incluye variantes de los péptidos anteriores. Las variantes pueden contener, por ejemplo, un péptido seleccionado de entre el grupo que consiste en péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que tienen una sustitución, eliminación o adición de varios aminoácidos, por ejemplo, 1 a 9, preferentemente 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, más preferentemente 1 a 2 aminoácidos, más preferentemente un aminoácido  
10 en una de las secuencias de aminoácidos anteriores. La sustitución de aminoácidos en péptidos se puede llevar a cabo en cualquier posición y con cualquier tipo de aminoácidos. Se prefiere la sustitución conservadora de aminoácidos. Por ejemplo, un resto Glu se puede sustituir por un resto Asp, un resto Phe con un resto Tyr, un resto Leu con un resto Ile, un resto Ala con un resto Ser, y un resto His con un resto Arg. La adición o eliminación de aminoácidos se puede llevar a cabo preferentemente en el extremo N y el extremo C de los péptidos, pero se puede  
15 llevar a cabo en una secuencia interior. Un ejemplo específico preferido del péptido de la divulgación tiene la secuencia SEC ID N° 3. A este respecto, todos los péptidos anteriores tienen que mantener la capacidad para unirse a una molécula MHC clase II y tener capacidad para inducir células T auxiliares específicas de WT1.

20 En esta conexión, la molécula MHC clase II a la que se une el péptido de la divulgación puede pertenecer a cualquier subclase de HLA-DR, HLA-DQ, y HLA-DP. Preferentemente, la molécula MHC clase II es una que se selecciona de entre el grupo que consiste en DRB1\*0101, DRB1\*0405, DRB1\*0802, DRB1\*0803, DRB1\*0901, DRB1\*1201, DRB1\*1403, DRB1\*1501, DRB3\*1502, DPB1\*0201, DPB1\*0202, DPB1\*0402, DPB1\*0501, DPB1\*0901, DQB1\*0301, DQB1\*0302, DQB1\*0401, DQB1\*0501, DQB1\*0601, DQB1\*0602, y DRB5\*0102. Más preferentemente, la molécula MHC clase II es DRB1\*0101, DRB1\*0405, DRB1\*1403, DRB1\*1502, DPB1\*0201,  
25 DPB1\*0202, DPB1\*0901, DQB1\*0301, DQB1\*0601 o DRB5\*0102, y más preferentemente, DRB1\*0101, DRB1\*0405, DRB1\*1502, DPB1\*0201, DPB1\*0202, o DQB1\*0601. En la presente especificación, un péptido que retiene la capacidad de unirse a una molécula MHC clase II y tiene la capacidad de inducir células T auxiliares específicas de WT1 se designa como péptido auxiliar WT1. También, en los Ejemplos descritos posteriormente, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en al SEC ID N° 3 se designa como péptido WT1<sub>35</sub>,  
30 péptido auxiliar WT1<sub>35</sub> o péptido WT1<sub>35</sub>.

También, el péptido de la divulgación puede ser un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en aminoácidos contiguos derivados de la proteína WT1 de ratón representada en la SEC ID N° 1, y la secuencia de aminoácidos anterior puede ser un péptidos (SEC ID N° 6) en el que un resto de aminoácido en la posición 9 de la  
35 secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 4 se sustituye con leucina; o un péptido (SEC ID N° 7) en el que un resto de aminoácido en la posición 11 en la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 5 se sustituye por serina. Además, el péptido de la divulgación puede contener un péptido seleccionado de entre el grupo que consisten en péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, eliminación o adición de varios aminoácidos, por ejemplo, 1 a 9, preferentemente 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, más preferentemente 1 a 2  
40 aminoácidos, más preferentemente un aminoácido en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC ID N° 6 o la SEC ID N° 7. En los Ejemplos descritos posteriormente, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC ID N° 6 también se designa como un péptidos mWT1<sub>86</sub> o un péptido auxiliar mWT1<sub>86</sub>, y un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la SEC ID N° 7 como un péptido mWT1<sub>294</sub> o un péptido auxiliar mWT1<sub>294</sub>.

45 El péptido de la divulgación puede derivarse de una proteína WT1, y puede consistir en la secuencia anterior de aminoácidos contiguos o comprender la secuencia. Por lo tanto, el péptido de la divulgación puede ser, por ejemplo, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos anterior en sí misma, o una proteína WT1 que comprende la secuencia de aminoácido anterior o una porción de la misma. También, el péptido de la divulgación se puede obtener por modificación de la secuencia de aminoácidos anterior. Los restos de aminoácidos de la secuencia anterior se puede modificar por un método conocido. Tal modificación puede ser, por ejemplo, esterificación, alquilación, halogenación, fosforilación, sulfonación, amidación y similares sobre un grupo funcional en una cadena lateral de un resto de aminoácidos que constituye un péptidos. También es posible unir varias sustancias al extremo N y/o el extremo C de un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos anterior. Por ejemplo, se puede unir al  
50 péptido un aminoácido, un péptido, un análogo de los mismos y similares. En el caso de que estas sustancias se unan al péptido de la divulgación se pueden tratar, por ejemplo, por una enzima in vivo y similares o por un proceso tal como un proceso intracelular de forma que se genere finalmente un péptido que consista en la secuencia de aminoácidos anterior, que se presenta en la superficie celular como un complejo con una molécula MHC clase II, siendo capaz de esta manera de obtener un efecto de inducción sobre las células T auxiliares. Estas sustancias pueden ser las que regulan la solubilidad del péptido de la presente invención, las que mejoran la estabilidad del péptido tal como la resistencia a proteasas, las que permiten el suministro específico del péptido de la divulgación, por ejemplo, a un tejido u órgano determinado, o los que tienen una acción de potenciación de la eficacia de captación de células presentadoras de antígeno u otra acción. También estas sustancias pueden ser las que aumentan la capacidad para inducir CTL, por ejemplo, péptidos auxiliares distintos del péptido de la divulgación.

65

La modificación del péptido de la divulgación puede ser la modificación de un grupo amino en un aminoácido del extremo N o de un grupo carboxilo en un aminoácido del extremo C del péptido. Los grupos que modifican un grupo amino en un aminoácido del extremo N incluyen por ejemplo, uno a tres grupos alquilo que tienen 1 a 6 átomos de carbono, grupos fenilo, grupos cicloalquilo, y grupos acilo. Ejemplos específicos del grupo acilo incluyen un grupo alcanoilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono, un grupo alcanoilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono sustituidos con un grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido con un grupo cicloalquilo que tiene 5 a 7 átomos de carbono, un grupo alquil sulfonilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono, un grupo fenil sulfonilo, un grupo alcoxicarbonilo que tiene 2 a 6 átomos de carbono, un grupo alcoxicarbonilo sustituido por un grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido por un grupo cicloalcoxilo que tiene 5 a 7 átomos de carbono, un grupo fenoxicarbonilo y similares. Los péptidos que tienen una modificación de un grupo carboxilo en un aminoácido del extremo C incluyen, por ejemplo, péptidos esterificados y amidados. Ejemplos específicos del éster incluyen el alquil éster que tiene 1 a 6 átomos de carbono, un alquil éster que tiene 0 a 6 átomos de carbono sustituidos con un grupo fenilo, un cicloalquil éster que tiene 5 a 7 átomos de carbono y similares, y ejemplos específicos de la amida incluyen una amida, una amida sustituida con uno o dos grupos alquilo que tienen 1 a 6 átomos de carbono, una amida sustituida con uno o dos grupos alquilo que tienen 0 a 6 átomos de carbono sustituidos con un grupo fenilo, una amida que forma un 2- a 7- azacicloalcano como miembro que incluye un átomo de nitrógeno del grupo amida, y similares.

También la modificación del péptido de la divulgación se puede llevar a cabo uniendo unos restos de aminoácidos a otros por medio de un enlace distinto a enlace peptídico tal como un enlace carbono-carbono. Un enlace carbono-nitrógeno, y un enlace carbono-sulfuro. Además, el péptido de la divulgación puede contener uno o más D-aminoácidos.

Los péptidos mencionados anteriormente, variantes de péptido y péptidos modificados de acuerdo con la divulgación son solamente ilustrativos, y los expertos en la técnica fácilmente asumen, preparan, evalúan y usan otras variaciones de los péptidos anteriores.

El péptido de la divulgación se puede sintetizar utilizando un método que se utiliza rutinariamente en la técnica o un método modificado del mismo. Tal método de síntesis se desvela, por ejemplo, en Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1975; Basis and Experiments of Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1985; Development of Medicines (continuación), Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten Co., 1991 y similares. También, el péptido de la divulgación se puede preparar utilizando una técnica de modificación genética basándose en la información de una secuencia de nucleótidos que codifican el péptido de la divulgación. Tal técnica de modificación genética es bien conocida por los expertos en la técnica. Tal técnica se puede llevar a cabo de acuerdo con un método descrito en la bibliografía [Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983); DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)] como se ha descrito anteriormente o un método descrito posteriormente, y otros métodos.

Es posible determinar si el péptido de la divulgación o un péptido candidato del mismo se une a la molécula MHC clase II anterior e induce células T auxiliares, por un método conocido tal como, por ejemplo, un método descrito en Cancer Immunol. Immunother. 51:271 (2002), o un método descrito en los Ejemplos de la presente especificación, y otros métodos.

Aunque el péptido de la divulgación activa células T auxiliares (células T CD4 positivas), el péptido induce y mantiene la diferenciación de CTL y ejerce una acción de activación de células efectoras tales como los macrófagos. En consecuencia, es posible utilizar el péptido de la divulgación para el tratamiento o prevención eficaz del cáncer.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido que codifica un péptido auxiliar WT1 (a partir de ahora designado también como polinucleótido WT1). El polinucleótido puede ser un ADN o un ARN. La secuencia de base del polinucleótido se puede determinar basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido auxiliar WT1 anterior. El polinucleótido se puede preparar, por ejemplo, por un método de síntesis de ADN o ARN, un método PCR y similares.

El polinucleótido incluye un polinucleótido que se hibrida con una secuencia complementaria de un polinucleótido que codifica el péptido de la divulgación bajo condiciones rigurosas y codifica un péptido que tiene una actividad comparable a la del péptido de la divulgación. En cuanto a la expresión "se hibrida bajo condiciones rigurosas", la hibridación utilizada en el presente documento se puede llevar a cabo de acuerdo con un método convencional descrito, por ejemplo, en Molecular Cloning, 2ª edición, Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory press y similares. También, las "condiciones rigurosas" incluyen, por ejemplo, una condición en la que se forma un híbrido en una solución que contiene 6 x SSC (10 x SSC es una solución que contiene NaCl 1,5 M y 0,15 M de citrato trisódico) y un 50% de formamida a 45 °C y luego se lava con 2 x SSC a 50 °C (Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6) y similares.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un vector de expresión que comprende un polinucleótido (a partir de ahora designado también como vector de expresión WT1). El tipo de vectores de expresión, otras secuencias que están contenidas además de la secuencia de polinucleótidos anterior y similares se pueden seleccionar apropiadamente dependiendo del tipo de huésped en el que se introducen los vectores de expresión, el propósito de

la introducción y similares. Ejemplos del vector de expresión incluyen plásmidos, vectores fagos, vectores víricos y similares. En el caso de que el huésped sean células de *Escherichia coli*, ejemplos del vector incluyen vectores plásmidos tales como pUC118, pUC119, pBR322, y pCR3, así como vectores fagos tales como  $\lambda$ ZAPII, y  $\lambda$ gt11. En el caso de que el huésped sean células de levadura, los ejemplos del vector incluyen pYES2, pYEUra3 y similares.

5 En el caso de que el huésped sean células de insectos, los ejemplos del vector son pAcSGHisNT-A y similares. En el caso de que el huésped sean células animales, los ejemplos del vector incluyen vectores plásmidos tales como pKCR, pCDM8, pGL2, pcDNA3.1, pRc/RSV, y pRc/CMV, vectores víricos tales como un vector retrovírico, un vector adenovírico, y un vector de virus adeno-asociado. El vector puede contener opcionalmente factores tales como un promotor de expresión inducible, un gen que codifica una secuencia de señal, un gen marcador para selección, y un

10 terminador. También, se pueden añadir al vector una secuencia que se expresa como una proteína de fusión con tiorredoxina, una marca His, GST (glutación S-transferasa) y similares para facilitar el aislamiento y la purificación. En este caso, es posible utilizar un vector proteico fusionado con GST (pGEX4T, etc.) que tiene un promotor adecuado (lac, tac, trc, trp, CMV, promotor precoz SV40, etc.) funcional en células huésped, un vector (pcDNA3.1/Myc-His, etc.) que tiene una secuencia marcadora tal como Myc e His, y también un vector (pET32a) que expresan una

15 proteína de fusión con tiorredoxina y una marca His y similares.

Quando se administra el vector de expresión a un sujeto para producir un péptido auxiliar WT1 in vivo, las células T auxiliares específicas de WT1 inducidas por el péptido producen varias citoquinas (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, o un interferón (IFN), etc.), y promueven la proliferación, diferenciación y maduración de células B y otras células T.

20 En consecuencia, las células tumorales que tienen una molécula MHC clase I y expresan WT1 altamente pueden ser dañadas específicamente utilizando el vector de expresión WT1.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo contra el péptido auxiliar WT1 (a partir de ahora designado también como anticuerpo WT1). El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Un

25 método para preparar tal anticuerpo se conoce ya, y el anticuerpo de la presente invención se puede preparar de acuerdo con tal método convencional también (Current protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (ed.), 1987, John Wiley and Sons (pub.), Sección 11.12-11.13, Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D. et al. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (pub.), New York, 1989).

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer, que comprende un péptido auxiliar WT1, un polinucleótido WT1 o un vector de expresión WT1. El gen WT1 se expresa altamente, por ejemplo en tumores de órganos hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple, y linfoma maligno, así como en cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga,

30 cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, y cáncer de ovarios, y por lo tanto, es posible utilizar la composición farmacéutica de la divulgación para tratar o prevenir el cáncer que expresa el gen WT1. Cuando la composición farmacéutica se administra a un sujeto que tiene una molécula MHC clase II, las células T auxiliares específicas de WT1 que se inducen por el péptido auxiliar WT1 que está contenido en la composición farmacéutica producen varias citoquinas (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, o un interferón (IFN), etc.), y promueven la

35 proliferación, diferenciación y maduración de células B y otros subgrupos de células T. En consecuencia, las células tumorales que tienen una molécula MHC clase I y expresan WT1 altamente pueden dañarse específicamente utilizando el péptido.

Una composición farmacéutica puede comprender, por ejemplo, un vehículo, un excipiente y similares, además del péptido auxiliar WT1, polinucleótido WT1, o vector de expresión WT1 como principio activo. El péptido auxiliar WT1 contenido en la composición farmacéutica induce células T auxiliares específicas de WT1, y por lo tanto la composición farmacéutica puede comprender un adyuvante adecuado o se puede administrar junto con un

45 adyuvante adecuado con el fin de mejorar la eficacia de inducción. Ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, un adyuvante completo o incompleto de Freund, hidróxido de aluminio y similares. También, la composición farmacéutica puede comprender también un péptido antigénico de cáncer conocido distinto del péptido auxiliar WT1 tal como, por ejemplo, un péptido WT1<sub>126</sub> que induce CTL específicas de WT1, como principio activo (Oka et al., "Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product", Journal of Immunology, 164:1873-1880, 2000; and Oka et al., "Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1) product", Immunogenetics, 51: 99-107, 2000).

50

Además, se puede administrar una composición farmacéutica en combinación con un péptido antigénico de cáncer conocido. Por ejemplo, se puede administrar un péptido antigénico de cáncer conocido, por ejemplo, un péptido WT1<sub>126</sub> antes o después de la administración de la composición farmacéutica. La composición farmacéutica tiene como característica que activa células B u otras células T induciendo células T auxiliares específicas de WT1, y por

55 lo tanto, es posible aumentar más la actividad de las CTL inducidas por la administración de un péptido antigénico de cáncer conocido, y para aumentar marcadamente los efectos terapéuticos.

Se puede seleccionar apropiadamente un método para administrar la composición farmacéutica dependiendo de las condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado de los sujetos y los sitios seleccionados. Ejemplos del

60 método de administración incluyen, pero no se limitan a estos, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración transnasal, administración oral

y similares. También, el método de administración puede ser una terapia con linfocitos o una terapia con DC (células dendríticas). La cantidad de un péptido contenido en la composición farmacéutica, la forma y la frecuencia de administración de la composición farmacéutica y similares se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado de los sujetos y los sitios seleccionados. En general, la cantidad de un péptido administrado por dosis es de 0,0001 mg a 1000 mg, y preferentemente de 0,001 mg a 10.000 mg.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir el cáncer, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica a un sujeto que tiene la molécula MHC clase II anterior. Los cánceres que se van a tratar o prevenir pueden ser cualquier cáncer siempre que exprese el gen WT1 e incluyen, por ejemplo, tumores de órganos hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple, y linfoma maligno, así como cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, y cáncer de ovarios.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al uso del péptido auxiliar WT1 anterior, polinucleótido WT1, o vector de expresión WT1 para el tratamiento o prevención del cáncer.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere al uso del péptido auxiliar WT1 para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir el cáncer.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere al uso del polinucleótido WT1 o el vector de expresión WT1 para preparar una composición farmacéutica que contiene el polinucleótido WT1 o el vector de expresión WT1 anteriores.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a células que incluyen el péptido auxiliar WT1 anterior, el polinucleótido WT1, o el vector de expresión WT1. Las células se pueden preparar, por ejemplo, transformando células huésped tales como células de *Escherichia coli*, células de levaduras, células de insectos, y células animales utilizando el vector de expresión anterior. La transformación de células huésped con un vector de expresión se puede llevar a cabo utilizando varios métodos seleccionados adecuadamente. El péptido se puede preparar cultivando las células transformadas, y recuperando y purificando un péptido auxiliar WT1 que se produce.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a células presentadoras de antígenos (por ejemplo, células dendríticas, linfocitos B, macrófagos, etc.), que presentan el péptido WT1 anterior por medio de la molécula MHC clase II anterior. Las células presentadoras de antígeno se inducen por el péptido auxiliar WT1 anterior. Las células T auxiliares específicas de WT1 se inducen eficazmente utilizando las células presentadoras de antígenos.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método para inducir células presentadoras de antígeno que presentan un péptido auxiliar WT1 por medio de una molécula MHC clase II, comprendiendo dicho método el cultivo de células presentadoras de antígeno inmaduras en presencia de un péptido auxiliar WT1, e induciendo células presentadoras de antígeno, que presentan el péptido auxiliar WT1 por medio de la molécula MHC clase II anterior, a partir de las células presentadoras de antígeno inmaduro. Células presentadoras de antígeno inmaduras se refiere a células que pueden llegar a ser células presentadoras de antígeno tales como, por ejemplo, células dendríticas, linfocitos B, y macrófagos en su maduración. Los sujetos en los que las células presentadoras de antígeno inmaduras se derivan puede ser cualquier sujeto siempre que tengan la molécula MHC clase II anterior. Aunque las células presentadoras de antígeno inmaduras están contenidas, por ejemplo, en las células mononucleares de sangre periférica y similares, tales células se pueden cultivar en presencia del péptido auxiliar WT1.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir el cáncer, que comprende la administración de células presentadoras de antígeno, que presentan el péptido auxiliar WT1 por medio de la molécula MHC clase II anterior, a un sujeto que tiene la misma molécula que la molécula MHC clase II anterior. El método de administración de las células presentadoras de antígeno se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado de los sujetos, y los sitios seleccionados. Ejemplos del método incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración transnasal, administración oral y similares.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método para prevenir o tratar el cáncer por la inducción de células presentadoras de antígeno que presentan un péptido auxiliar WT1 por medio de la molécula MHC clase II anterior, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) hacer reaccionar una muestra con una secuencia de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 2) de una proteína WT1 o un ácido nucleico que tiene una secuencia parcial de la misma o el péptido auxiliar WT1 anterior;
- (b) obtener células presentadoras de antígeno que presentan un péptido auxiliar WT1 contenido en la muestra por medio de la molécula MHC clase II anterior; y
- (c) administrar las células presentadoras de antígeno a un sujeto que tiene la misma molécula que la molécula MHC clase II anterior.

Las muestras del método anterior pueden ser cualquier muestra siempre que tenga la posibilidad de contener linfocitos o células dendríticas e incluyen, por ejemplo, muestras derivadas del sujeto tales como sangre, soluciones de cultivo celular y similares. La reacción en el método anterior se puede llevar a cabo utilizando una técnica convencional, y preferentemente utilizando la electroporación. La obtención de las células presentadoras de antígeno se pueden llevar a cabo utilizando un método conocido para los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo de las células en una muestra de cada etapa pueden determinarlas apropiadamente los expertos en la técnica. El método de administración de las células presentadoras de antígeno puede ser como la descrita anteriormente.

En más aspectos, la divulgación se refiere a células T auxiliares específicas de WT1 inducidas por el péptido auxiliar WT1. Las células T auxiliares se inducen, proliferan y activan cuando reconocen un complejo de un péptido auxiliar WT1 con una molécula MHC clase II. Las células T auxiliares específicas de WT1 activadas producen citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, o un interferón (IFN), y promueven la diferenciación y maduración de células B y otros subgrupos de células T. En consecuencia, las células tumorales que tienen una molécula MHC clase II y expresan altamente WT1 pueden dañarse específicamente utilizando las células T auxiliares.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para inducir células T auxiliares específicas de WT1, que comprende el cultivo de células mononucleares de sangre periférica en presencia de péptido auxiliar WT1, y la inducción de células T auxiliares específicas de WT1 a partir de las células mononucleares de sangre periférica. Los sujetos de los que derivan las células mononucleares de sangre periférica puede ser cualquier sujeto siempre que tenga la molécula MHC clase II anterior. Cultivando las células mononucleares de sangre periférica en presencia de un péptido auxiliar WT1, se inducen células T auxiliares específicas de WT1 a partir de células precursoras de células T auxiliares en las células mononucleares en sangre periférica. Es posible tratar o prevenir tumores de órganos hematopoyéticos y cánceres sólidos en un sujeto administrando células T auxiliares específicas de WT1 a un sujeto que tiene la molécula MHC clase II anterior. En esta conexión, las células mononucleares en sangre periférica incluyen células presentadoras de antígeno inmaduras que son células precursoras de células presentadoras de antígeno (por ejemplo células precursoras de células dendríticas, linfocitos B, macrófagos, etc.). Aunque las células presentadoras de antígeno inmadura están contenidas, por ejemplo, en las células mononucleares en sangre periférica y similares, tales células se pueden cultivar en presencia del péptido auxiliar WT1.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un kit para inducir células T auxiliares específicas de WT1, que comprende el péptido auxiliar WT1 como principio activo. Preferentemente, el kit se utiliza en el método anterior para inducir células T auxiliares específicas de WT1. El kit puede comprender, por ejemplo, medios de obtención de células mononucleares en sangre periférica, un adyuvante, un matraz de reacción y otros, además del péptido auxiliar WT1. En general, el kit se acompaña con un manual de instrucciones. Es posible inducir células T auxiliares específicas de WT1 eficazmente utilizando el kit.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método para tratar o prevenir el cáncer, que comprende la administración de células T auxiliares específicas de WT1 a un sujeto que tiene la molécula MHC clase II. El método de administración de las células T auxiliares específicas de WT1 se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado de los sujetos y los sitios seleccionados. Ejemplos del método de administración incluyen, pero no se limitan a estos, la administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración transnasal, administración oral y similares.

Además, la divulgación se refiere a un kit para prevenir o tratar el cáncer, que comprende el péptido auxiliar WT1, polinucleótido WT1, o vector de expresión WT1 como principio activo. El kit es un kit que se caracteriza por la inducción de células presentadoras de antígeno que presentan el péptido auxiliar WT1 por medio de la molécula MHC clase II. También, el kit puede comprender, por ejemplo, un medio de obtención de muestras, un matraz de reacción y otros, además del principio activo anterior. En general, el kit se acompaña de un manual de instrucciones. Las células presentadoras de antígeno que presentan un péptido auxiliar WT1 por medio de una molécula MHC clase II se puede obtener eficazmente utilizando el kit, y se puede utilizar para tratar o prevenir el cáncer por medio de su administración.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para determinar la presencia o cantidad de células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto que tiene una molécula MHC clase II, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) hacer reaccionar un complejo de péptido auxiliar WT1 con una molécula MHC clase II con una muestra derivada del sujeto;
- (b) determinar la presencia o cantidad de células T auxiliares que reconocen el complejo contenido en la muestra.

Las muestras derivadas de los sujetos puede ser cualquier muestra siempre que tengan la posibilidad de contener linfocitos e incluyen, por ejemplo, fluidos corporales tales como sangre y fluido linfático, tejidos y similares. El complejo de células T auxiliares WT1 con una molécula MHC clase II puede estar, por ejemplo, en forma de

tetrámero, pentámero y similares, por ejemplo, utilizando un método conocido por los expertos en la técnica tal como un método de biotina-estreptavidina. La presencia o cantidad de células T auxiliares que reconocen tal complejo se puede determinar por un método conocido por los expertos en la técnica. En este aspecto, el complejo anterior se puede marcar. Como marcador, se pueden utilizar marcadores conocidas tales como un marcador fluorescente y un  
 5 marcador radioactivo. Por el marcado, se puede determinar simple y rápidamente la presencia o cantidad de células T auxiliares. Utilizando un método de este aspecto de la divulgación, se posibilita hacer un diagnóstico, un pronóstico y similar del cáncer.

En consecuencia, la divulgación también proporciona una composición que comprende un complejo de un péptido  
 10 auxiliar WT1 con una molécula MHC clase II para determinar la presencia o cantidad de células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto que tiene la molécula MHC clase II anterior.

También, la divulgación proporciona un kit que comprende un complejo de un péptido auxiliar WT1 con una molécula  
 15 MHC clase II para determinar la presencia o cantidad de células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto que tiene una molécula MHC clase II.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método para determinar la presencia o cantidad de células T  
 20 auxiliares específicas de WT1 en un sujeto que tiene una molécula MHC clase II, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) hacer reaccionar un complejo del péptido auxiliar WT1 con una molécula MHC clase II con una muestra derivada del sujeto; y luego
- (b) determinar la presencia o cantidad de células T auxiliares que reconocen el complejo contenido en la muestra.

Las muestras derivadas de los sujetos pueden ser cualquier muestra siempre que tengan la posibilidad de contener  
 25 linfocitos, e incluyen, por ejemplo, células mononucleares en sangre periférica, sangre, fluidos corporales, tejidos y otros, y preferentemente células mononucleares en sangre periférica. La reacción en la etapa (a) se puede llevar a cabo haciendo reaccionar el péptido auxiliar WT1 de la muestra derivada de un sujeto utilizando una técnica convencional. Las condiciones de cultivo de las células de la muestra en cada etapa pueden determinarlas apropiadamente los expertos en la técnica. La presencia o cantidad de un citoquina contenida en una muestra se puede medir por un método conocidos por los expertos en la técnica. La citoquina puede ser capaz de inducirse por las células T auxiliares tales como el interferón- $\gamma$  y la interleucina-10. La citoquina puede estar marcada. Como  
 30 marcadores, se pueden utilizar marcadores conocidos tales como un marcador fluorescente y un marcador radioactivo. Utilizando como indicador la presencia o cantidad de la citoquina anterior, se posibilita determinar la presencia o cantidad de células T auxiliares específicas de WT1 simple y rápidamente.

En un aspecto más, la divulgación se refiere a un método para obtener células T auxiliares específicas de WT1  
 40 utilizando un complejo de péptido auxiliar WT1 con una molécula MHC clase II, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) hacer reaccionar una muestra con el complejo; y
- (b) obtener células T auxiliares que están contenidas en la muestra y reconocer el complejo.

El complejo de un péptido auxiliar WT1 con una molécula MHC clase II es como se ha descrito anteriormente. Las  
 45 muestras pueden ser cualquier muestra siempre que tenga la posibilidad de contener linfocitos e incluye, por ejemplo, muestras derivadas de un sujeto tales como sangre, soluciones de cultivos celulares y similares. La obtención de células T auxiliares que reconocen el complejo se pueden llevar a cabo, por ejemplo, utilizando un método conocido por los expertos en la técnica tales como FACS y MACS. Es posible cultivar las células T auxiliares  
 50 específicas de WT1 resultantes y usarlas para tratar o prevenir varios cánceres.

En consecuencia, la divulgación también se refiere a células T auxiliares específicas de WT1 que se pueden obtener  
 por un método para obtener células T auxiliares específicas utilizando un complejo de un péptido auxiliar WT1 con una molécula MHC clase II.

Además, la divulgación se refiere a un kit para obtener células T auxiliares específicas de WT1, que comprende un  
 55 complejo de un péptido auxiliar WT1 con una molécula MHC clase II.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método para diagnosticar el cáncer, que comprende la utilización  
 60 de célula T auxiliares específicos de WT1, células presentadoras de antígeno que presentan el péptido auxiliar WT1 por medio de una molécula MHC clase II, o una anticuerpo WT1. Preferentemente, se utilizan las células T auxiliares específicas de WT1 para el método de diagnóstico del cáncer. Por ejemplo, las células T auxiliares, las células presentadoras de antígeno o el anticuerpo se pueden incubar con una muestra derivada del sujeto que tiene la molécula MHC clase II, o se administra a un sujeto que tiene la molécula MHC clase II, y luego, por ejemplo, se  
 65 puede determinar la localización, el sitio, la cantidad y similares de las células T auxiliares, las células presentadoras de antígeno o el anticuerpo para diagnosticar el cáncer. Las células T auxiliares, células presentadoras de antígeno

o anticuerpo se pueden marcar. Por el marcado, es posible llevar a cabo el método de diagnóstico del cáncer eficazmente.

5 En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un kit para diagnosticar el cáncer, que comprende células T auxiliares, células presentadoras de antígeno que presenta un péptido auxiliar WT1 por medio de una molécula MHC clase II, o un anticuerpo contra un péptido auxiliar WT1 o un anticuerpo contra el polinucleótido que codifica el péptido, como principio activo.

10 La invención se describirá específicamente y se describirá en detalle a continuación por medio de ejemplos, pero no se deberían tomar como limitantes de la invención.

### Ejemplo 1

#### Selección de péptidos WT1 candidatos que se unen a moléculas MHC clase II

15 Con el fin de buscar secuencias peptídicas que se unen a moléculas MHC clase II, se utilizó un método como el que muestran Rammensee et al. (Rammensee et al, Immunogenetics 41:178-228, 1995). Específicamente, se llevó a cabo la selección utilizando los programas descritos en la columna del extremo derecho de las Tablas junto con la ley de Rammensee et al. Por este método, los péptidos WT1<sub>35</sub> se reducen a las secuencias peptídicas como se muestra en las Tablas 1 y 2, los péptidos WT1<sub>86</sub> a las secuencias peptídicas que se muestran en las Tablas 3 y 5, y los péptidos WT1<sub>294</sub> en las secuencias peptídicas que se muestran en las Tablas 5 y 6. La columna del extremo izquierdo de las Tablas 1 a 6 muestran la "idoneidad" como secuencia peptídica candidata. Cuanto mayor es el número de "o", mayor es la idoneidad en la ley de Rammensee et al. La falta de marca indica poca idoneidad. También, el grupo de aminoácidos entre paréntesis de la columna de "secuencias peptídicas candidatas que se unen a moléculas MHC clase II" de las Tablas 1 a 6 muestran que se puede seleccionar un aminoácido de entre el grupo de aminoácidos enumerados en el paréntesis. Por ejemplo, la descripción [FLM] significa un aminoácido seleccionado de entre el grupo de aminoácidos F, L y M. También, la descripción [VYI(AL)] significa un aminoácido seleccionado de entre el grupo de aminoácidos V, Y, e I, o un aminoácido seleccionado de entre el grupo de aminoácidos A y L. "x" muestra que puede ser cualquier aminoácido. La columna del extremo derecho muestra el "nombre del programa" o programas utilizados para enumerar las secuencias peptídicas candidatas.

20

25

30

[Tabla 1]

Idoneidad	Secuencias peptídicas candidatas que se unen a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT <sub>1.35</sub> )		Nombre del programa
	Secuencias peptídicas candidatas que se unen a varias moléculas MHC clase II		
	Secuencias peptídicas candidatas que se unen a varias moléculas MHC clase II		
	Secuencias peptídicas candidatas que se unen a varias moléculas MHC clase II		
000	DPA1*0102/DPB1*0201	[FLMVMWY]xxx[FLMY]xx[IAMV]	SYFPEITHI
	DPA1*0103/DPB1*0201	[YLVFK]xx[DSQT]x[YFWV]xx[LVI]	Marsh2000, Chicz 1997
0	DPA1*0103/DPB1*0201	[FLM]xxx[FL]xx[IA]	Marsh2000, Rotzschke 1994
0	DPA1*0201/DPB1*0401	[FLYM(IVA)]xxxxx[FLY(MVIA)]xx[VYI(AL)]	Marsh2000
0	DPA1*0201/DPB1*0401	[FLYMIVA]xxxxx[FLYMVIA]xx[VYIAL]	SYFPEITHI
	DPA1*0201/DPB1*0901	[RK]xxx[AGL]xx[LV]	Marsh2000
	DPB1*0301	x[R]xxxxxx	Marsh2000
	DQA1 0101/DQB1*0501	[L]xxx[YFW]	Marsh2000
	DQA1 0102/DQB1*0602	xxxxx[LIV(APST)]xx[AGST(LVLP)]	Marsh2000
0	DQA1 0301/DQB1*0301	xx[AGST]x[AVLI]	Marsh2000
	DQA1 0301/DQB1*0301	[DEW]xx[AGST]x[ACLMI]	SYFPEITHI
	DQA1 0301/DQB1*0302	[RK]xxx[AG]xx[NED]	Marsh2000
	DQA1 0301/DQB1*0302	[TSW]xxxxxx[RE]	SYFPEITHI
000	DQA1 0501/DQB1*0201	[FWYILV]xx[DELVIH]x[PDE(H)]IED]x[FYWVILM]	Marsh2000
000	DQA1 0501/DQB1*0201	[FWYILV]xx[DELVIH]x[PDEHPA]DE]x[FYWVILM]	SYFPEITHI
000	DQA1 0501/DQB1*0301	[FYIMLV]xxx[VLIMY]x[YFMLV]	Marsh2000
0	DQA1 0501/DQB1*0301	[WYAVM]xx[A]x[AI VTS]xxx[Q N]	SYFPEITHI
000	DQB1*0602	[AFCILMNQSTVWYDE]x[AFGLIMNQSTWYCDE][AFGLIMN QSTWY]x[LIV(APST)]xx[ASTGLIVP]	SYFPEITHI
000	DRB1*0101	[YFWLIMVA]xx[LMAIVN]x[AGSTCP]xx[LAIVNFYMW]	Marsh2000
000	DRB1*0101	[YVLFIAMW]xx[LMAIVNQ]x[AGSTCP]xx[LAIVNFY]	SYFPEITHI
	DRB1*0102	[ILVM]xx[ALM]x[AGSTCP]xx[ILAMYW]	Marsh2000
	DRB1*0102	[ILVM]xx[ALM]x[AGSTP]xx[ILAMYW]	SYFPEITHI
	DRB1*0301	[LIFMV]xx[D]x[KR(EQN)]x[L]YLF]	Marsh2000, Malcherek 1993
	DRB1*0301	[LIFMV]xx[D]x[KREQN]xx[YLF]	SYFPEITHI
	DRB1*0301 orDRB3*0201	[FILVY]xx[DNQT]	Marsh2000, Chicz 1992
	DRB1*0401	[FLV]xxxxxx[NGST]	Marsh2000
000	DRB1*0401 orDRB4	[FYWILVM]xx[FWILVADE]x[NSTQHR]xx[K]	Marsh2000, Friede 1996
0	DRB1*0401 orDRB4*0101	[FYW]xxxxxx[ST]	Marsh2000, Verreck 1995
000	DRB1*C 401 orDRB4*0101	[FYWILVM]xx[PWILVADE]x[NSTQHR]x[DEHKNGRSTYACI LMV]x[DEHKNGRSTYACILMV]	SYFPEITHI

(continuación)

Idoneidad	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT <sub>13b</sub> )		Nombre del programa
	Típos de moléculas MHC clase II	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II	
	DRB1*0402orDRB4	[VILM]xx[FYWILMRNH]x[NSTQHK]x[RKHNQP]x[H]	Marsh2000
	DRB1*0402orDRB4	[VILM]xx[FYWILMRN]x[INQSTK][RKHNQ]x[DEHLNQRSTYCIILMVHA]	SYFPEITHI
oo	DRB1*0404orDRB4	[VILM]xx[FYWILVMADE]x[NTSQR]xx[K]	Marsh2000
oo	DRB1*0404orDRB4	[VILM]xx[FYWILVMADE]x[NTSQR]xx[K]	SYFPEITHI
ooo	DRB1*0405orDRB4	[FYWVILM]xx[VILMDE]x[INSTQKD]xxx[DEQ]	Marsh2000
ooo	DRB1*0405orDRB4	[FYWVILM]xx[VILMDE]x[INSTQKD]xxx[DEQ]	SYFPEITHI
	DRB1*0405orDRB4*0101	[Y]xxx[VT]xxx[D]	Marsh2000
ooo	DRB1*0407orDRB4	[FYW]xx[AVTK]x[INTDS]xxx[QN]	Marsh2000
ooo	DRB1*0407orDRB4	[FYW]xx[AVTK]x[INTDS]xxx[QN]	SYFPEITHI

ES 2 528 766 T3

[Tabla 2]

Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT1<sub>35</sub>)

Idoneidad	Tipos de moléculas MHC clase II	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II	Nombre del programa
	DRB1*0701	[FILVY] xxxx [NST]	Marsh2000
o	DRB1*0701	[FYWILV]xx[DEHKNQRSTY]x[NST]x[VILYF]	SYFPEITHI
	DRB1*0801	[FILVY]xxx[HKR]	Marsh2000
o	DRB1*0901 o DRB4*0101	[YFWL]xx[AS]	Marsh2000
ooo	DRB1*0901 o DRB4*0101	[WYFL]xx[AVS]	SYFPEITHI
ooo	DRB1*1101	[YF]xx[LVMIFY]x[RKH]xx[AGSP]	Marsh2000
ooo	DRB1*1101	[WYF]xx[LVMIFY]x[RKH]xx[AGSP]	SYFPEITHI
	DRB1*1101 o DRB3*0202	[YF]xxxx[RK]x[RK]	Marsh2000
ooo	DRB1*1104	[ILV]xx[LVMIFY]x[RKH]xx[AGSP]	Marsh2000
ooo	DRB1*1104	[ILV]xx[LVMIFY]x[RKH]xx[AGSP]	SYFPEITHI
	DRB1*1201 o DRB3	[ILFY(V)]x[LNM(VA)]xx[VY(FIN)]xx[YFM(IV)]	Marsh2000
	DRB1*1201 o DRB3	[I LFYV]x[LMNVA]xx[VYFIN A]xx[YFMIV]	SYFPEITHI
o	DRB1*1301	[IVF]xx[YWLVAM]x[RK]xx[YFAST]	Marsh2000
o	DRB1*1301	[ILV]xx[LVMIFY]x[RK]xx[YFAST]	SYFPEITHI
	DRB1*1301 o DRB3*0101	[I LV]xxxx[RK]xx[Y]	Marsh2000
o	DRB1*1302	[YFVAI]xx[YWLVAM]x[RK]xx[YFAST]	Marsh2000
o	DRB1*1302	[YFVAI]xx[LVMIFY]x[RK]xx[YFAST]	SYFPEITHI
	DRB1*1302 o DRB3*1301	[ILFY]xxxx[RK]xx[Y]	Marsh2000
o	DRB1*1501	[LVI]xx[FYI]xx[ILVMF]	Marsh2000
o	DRB1*1501	[LVI]xx[FYI]xx[ILVMF]	SYFPEITHI
	DRB1*1501 o DRB5*0101	[ ILV]xxxxxxxxx[ H KR]	Marsh2000
o	DRB3*0202	[YFIL]xx[N]x[ASPDE]xx[LVISG]	Marsh2000
o	DRB3*0202	[YFIL]xx[N]x[ASPDE]xx[LVISG]	SYFPEITHI
o	DRB3*0301	[ILV]xx[N]x[ASPDE]xx[ILV]	Marsh2000
o	DRB3*0301	[ILV]xx[N]x[ASPDE]xx[ILV]	SYFPEITHI
oo	DRB5*0101	[FYLM]xx[QVIM]xxxx[RK]	Marsh2000
oo	DRB5*0101	[FYLM]xx[QVIM]xxxx[RK]	SYFPEITHI

[Tabla 3]

Idoneidad	Tipos de moléculas MHC clase II	Serotipo	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT <sup>1136</sup> )	Nombre del programa
	DPA1*0102/DPB1*0201	DPw2	desconocido	Marsh2000
	DPA1*0102/DPB1*0201	DPw2	[FLMVWY]-x-x-x-[FLMY]-x-x-[IAMV]	SYFPEITHI
	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	[FLM]-x-x-x-[FL]-x-x-[IA]	Marsh2000
0	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	[YLVFK]-x-x-[DSQT]-x-[YFWV]-x-x-[LVI]	Marsh2000
	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	desconocido	SYFPEITHI
	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	desconocido	SYFPEITHI
00	DPA1*0201/DPB1*0401	DPw4	[FLYM(IVA)]-x-x-x-x-[FLY(MVIA)]-x-x-[VYI(AL)]	Marsh2000
00	DPA1*0201/DPB1*0401	DPw4	[FLYMIVA]-x-x-x-x-[FLYM-VIA]-x-x-[VYIAL]	SYFPEITHI
000	DPA1*0201/DPB1*0901	DPw3	[RK]-x-x-x-x-[AGL]-x-x-[LV]	Marsh2000
	DPB1*0301	DPw3	x-[R]-x-x-x-x-x-x	Marsh2000
	DPB1*0301	DPw3	desconocido	SYFPEITHI
	DQA1*0101/DQB1*0501	DQ5(1)	[L]-x-x-x-[YFW]	Marsh2000a
	DQA1*0101/DQB1*0501	DQ5(1)	desconocido	SYFPEITHI
000	DQA1*0102/DQB1*0602	DQ6(1)	x-x-x-x-x-[LIV(APST)]-x-x-[AGST(LIVP)]	Marsh2000
	DQA1*0301/DQB1*0301	DQ7(3)	x-x-[AGST]-x-[AVLI]	Marsh2000
000	DQA1*0301/DQB1*0301	DQ7(3)	[DEW]-x-x-[AGST]-x-[ACLMI]	SYFPEITHI
0	DQA1*0301/DQB1*0302	DQ8(3)	[RK]-x-x-x-x-[AG]-x-x-[NED]	Marsh2000
000	DQA1*0301/DQB1*0201	DQ8(3)	[TSW]-x-x-x-x-x-x-[RE]	SYFPEITHI
	DQA1*0501/DQB1*0201	DQ2	[FWYILV]-x-x-[DELVIH]-x-[PDE(H)]-[ED]-x-[FYWVILM]	Marsh2000
000	DQA1*0501/DQB1*0201	DQ2	[FWYILV]-x-x-[DELVIH]-x-[PDEH-PA]-[DE]-x-[FWYILVM]	SYFPEITHI
00	DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7(3)	[FYIMLV]-x-x-x-[LIMY]-x-[YFM-LVI]	Marsh2000
0	DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7(3)	[WYAVM]-x-x-[A]-x-[AVTS]-x-x-x-[QN]	SYFPEITHI

(continuación)					
Idoneidad	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT <sub>1ref</sub> )	Tipos de moléculas MHC clase II	Serotipo	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II	Nombre del programa
000		DQB1*0602	DQ6(1)	GILMNQSTVWYCYDE]-AFGILM-NQSTWVWY]-x-[LIVAPST]-x-x-[ASTGLIVP]	SYFPEITHI
000		DRB1*0101	DR1	[YFWLIMVA]-x-x-[LMAIVN]-x-[AGSTTCP]-x-x-[LAINVNFYMMW]	Marsh2000
000		DRB1*0101	DR1	[YVLFIAMM]-x-x-[LAIM-NQ]-x-[AGSTCP]-x-x-[LAINVNFY]	SYFPEITHI
000		DRB1*0102	DR1	[ILVM]-x-x-[ALM]-x-[AGSTCP]-x-x-[LAMYW]	Marsh2000
000		DRB1*0102	DR1	[ILVM]-x-x-[ALM]-x-[AGSTP]-x-x-[LAMYW]	SYFPEITHI
00		DRB1*0301	DR17(3)	[LIFMV]-x-x-[D]-x-[KR(EQN)]-x-[L]-[YLF]	Marsh2000
00		DRB1*0301	DR17(3)	[LIFMV]-x-x-[D]-x-[KREQN]-x-x-[YLF]	SYFPEITHI
	DRB1*0301 o DRB3*0201		DR17(3)	[FILVY]-x-x-[DNQT]	Marsh2000
	DRB1*0301 o DRB3*0201		DR17(3)	desconocido	SYFPEITHI
	DRB1*0401		DR4	[FLV]-x-x-x-x-x-[NQST]	Marsh2000
	DRB1*0401		DR4	desconocido	SYFPEITHI
00		DRB1*0401 o DRB4	DR4	[FYWILVM]-x-x-[FWIL-VADE]-x-[NSTQHR]-x-x-[K]	Marsh2000
	DRB1*0401 o DRB4*0101		DR4	[FYW]-x-x-x-x-x-[ST]	Marsh2000
000		DRB1*0401 o DRB4*0101	DR4	[FYWILVM]-x-x-[PWIL-VADE]-x-[NSTQHR]-[DEHKN-QRSTYACILMV]-x-[DEHKN-QRSTYACILMV]	SYFPEITHI
00		DRB 1*0402 o DRB4	DR4	[VILM]-x-x-[YFWILM-RN]-x-[NSTQHK]-x-[RKHN-QP]-x-[H]	Marsh2000

(continuación)

Idoneidad	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT <sub>1-186</sub> )	Serotipo	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II	Nombre del programa
000	DRB 1*0402 or DRB4	DR4	[VILM]-x-x-[YFWILM- RM]-x-[NQSTK]-[RKHN- QP]-x-[DEHLNQRSTYCILMVHA]	SYFPEITHI

[Tabla 4]

Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT1<sub>186</sub>)

Idoneidad	Tipos de moléculas MHC clase II	Serotipo	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II	Nombre del programa
o	DRB1*0404 o DRB4	DR4	[VILM]-x-x[FYWILVMADE]-x-[NTSQR]-x-x-[K]	Marsh2000
o	DRB1*0404 o DRB4	DR4	[VILM]-x-x[FYWILVMADE]-x-[NTSQR]-x-x-[K]	SYFPEITHI
o	DRB1*0405 o DRB4	DR4	[FYWVILM]-x-x-[VILMDE]-x-[NSTQKD]-x-x-x-[DEQ]	Marsh2000
o	DRB1*0405 o DRB4	DR4	[FYWVILM]-x-x-[VILMDE]-x-[NSTQKD]-x-x-x-[DEQ]	SYFPEITHI
	DRB1*0405 o DRB4*0101	DR4	[Y]-x-x-x-x-[VT]-x-x-x-[D]	Marsh2000
	DRB1*0405 o DRB4*0101	DR4	desconocido	SYFPEITHI
	DRB1*0407 o DRB4	DR4	[FYW]-x-x-[AVTK]-x-[NTDS]-x-x-x-[QN]	Marsh2000
	DRB1*0407 o DRB4	DR4	[FYW]-x-x-[AVK]-x-[NTDS]-x-x-x-[QN]	SYFPEITHI
	DRB1*0701	DR7	[FI LVY]-x-x-x-x-[NST]	Marsh2000
o	DRB1*0701	DR7	[FYWILV]-x-x-[DEHKNQRSTY]-x-[NST]-x-x-[VILYF]	SYFPEITHI
	DRB1*0801	DR8	[FI LVY]-x-x-x-[HKR]	Marsh2000
	DRB1*0801	DR8	desconocido	SYFPEITHI
	DRB1*0901 o DRB4*0101	DR9	[YFWL]-x-x-[AS]	Marsh2000
o	DRB1*0901 o DRB4*0101	DR9	[WYFL]-x-x-[AVS]	SYFPEITHI
oo	DRB1*1101	DR11 (5)	[YF]-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	Marsh2000
oo	DRB1*1101	DR11 (5)	[WYF]-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	SYFPEITHI
	DRB1*1101 o DRB3*0202	DR11 (5)	[YF]-x-x-x-x-[RK]-x-[RK]	Marsh2000
o	DRB1*1104	DR11 (5)	[ILV]-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	Marsh2000
o	DRB1*1104	DR11 (5)	[ILV]-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	SYFPEITHI
	DRB1*1201 o DRB3	DR12 (5)	[ILFY(V)]-x-[LNM(VA)]-x-x-[VY(FIN)]-x-x-[YFM(IV)]	Marsh2000
oo	DRB1*1201 o DRB3	DR12 (5)	[ILFYV]-x-[LM NVA]-x-x-[VYFI NA]-x-x-[YFMIV]	SYFPEITHI
o	DRB1*1301	DR13 (6)	[IVF]-x-x-[YWLVAAM]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	Marsh2000
o	DRB1*1301	DR13 (6)	[IVF]-x-x-[LVMAWY]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	SYFPEITHI
	DRB1*1301 o DRB3*0101	DR13 (6)	[ILV]-x-x-x-x-[RK]-x-x-[Y]	Marsh2000
	DRB1*1301 o DRB3*0101	DR13 (6)	desconocido	SYFPEITHI
o	DRB1*1302	DR13(6)	[YFVAI]-x-x-[YWLVAAM]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	Marsh2000
o	DRB1*1302	DR13 (6)	[YFVAI]-x-x-[LVMAWY]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	SYFPEITHI
	DRB1*1302 o DRB3*0301	DR13 (6)	[ILFY]-x-x-x-x-[RK]-x-x-[Y]	Marsh2000
	DRB1*1302 o DRB3*0301	DR13(6)	desconocido	SYFPEITHI
o	DRB1*1501	DR15(2)	[LVI]-x-x-[FYI]-x-x-[ILVMF]	Marsh2000
o	DRB1*1501	DR15(2)	[LVI]-x-x-[FYI]-x-x-[ILVMF]	SYFPEITHI

# ES 2 528 766 T3

(continuación)

Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT1<sub>186</sub>)

Idoneidad	Tipos de moléculas MHC clase II	Serotipo	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II	Nombre del programa
o	DRB1*1501 o DRB5*0101	DR15(2)	[I LV]-x-x-x-x-x-x-x-[H KR]	Marsh2000
ooo	DRB3*0202	DR52	[YFIL]-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-[LVISG]	Marsh2000
ooo	DRB3*0202	DR52	[YFIL]-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-[LVISG]	SYFPEITHI
ooo	DRB3*0301	DR52	[ILV]-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-[ILV]	Marsh2000
ooo	DRB3*0301	DR52	[ILV]-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-[ILV]	SYFPEITHI
	DRB5*0101	DR51	[FYLM]-x-x-[QVIM]-x-x-x-x-[RK]	Marsh2000
	DRB5*0101	DR51	[FYLM]-x-x-[QVIM]-x-x-x-x-[RK]	SYFPEITHI

[Tabla 5]

Idoneidad	Tipos de moléculas MHC clase II	Serotipo	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II	Nombre del programa
OO	DPA1*0102/DPB1*0201	DPw2	desconocido	Marsh2000
O	DPA1*0102/DPB1*0201	DPw2	[FLMVWY]-x-x-x-[FLMY]-x-x-[IAMV]	SYFPEITHI
O	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	[FLM]-x-x-x-[FL]-x-x-[IA]	Marsh2000
O	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	[YLVK]-x-x-[DSQT]-x-[YFWV]-x-x-[LVII]	Marsh2000
O	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	desconocido	SYFPEITHI
O	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	desconocido	SYFPEITHI
OOO	DPA1*0201/DPB1*0401	DPw4	[FLYM(VA)]-x-x-x-x-[FLY(MVIA)]-x-x-[VYI(AL)]	Marsh2000
OOO	DPA1*0201/DPB1*0401	DPw4	[FLYMIVA]-x-x-x-x-[FLYM-V/IA]-x-x-[VYIAL]	SYFPEITHI
O	DPA1*0201/DPB1*0901	DPw3	[RK]-x-x-x-x-[AGL]-x-x-[LV]	Marsh2000
O	DPB1*0301	DPw3	x-[R]-x-x-x-x-x-x	Marsh2000
O	DPB1*0301	DPw3	desconocido	SYFPEITHI
O	DQA1*0101/DQB1*0501	DQ5(1)	[L]-x-x-x-[YFW]	Marsh2000
O	DQA1*0101/DQB1*0501	DQ5(1)	desconocido	SYFPEITHI
O	DQA1*0102/DQB1*0602	DQ6(1)	x-x-x-x-x-[LIV(APST)]-x-x-[AGST(LIVP)]	Marsh2000
O	DQA1*0301/DQB1*0301	DQ7 (3)	x-x-[AGST]-x-[AVLI]	Marsh2000
O	DQA1*0301/DQB1*0301	DQ7 (3)	[DEW]-x-x-[AGST]-x-[ACLMI]	SYFPEITHI
O	DQA1*0301/DQB1*0302	DQ8 (3)	[RK]-x-x-x-x-[AG]-x-x-[NED]	Marsh2000
O	DQA1*0301/DQB1*0302	DQ8 (3)	[TSW]-x-x-x-x-x-x-[RE]	SYFPEITHI
OOO	DQA1*0501/DQB1*0201	DQ2	[FWYILV]-x-x-[DELVIH]-x-[PDE(H)]-[ED]-x-[F YWVILM]	Marsh2000
OOO	DQA1*0501/DQB1*0201	DQ2	[FWYILV]-x-x-[DELVIH]-x-[PDEH-PA]-[DE]-x-[FWYILVM]	SYFPEITHI
OOO	DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7 (3)	[FYIMLV]-x-x-x-[VLIMY]-x-[YFM-LVI]	Marsh2000
OOO	DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7 (3)	[WYAVM]-x-x-[A]-x-[AVTS]-x-x-x-[QN]	SYFPEITHI

(continuación)

Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT<sub>1294</sub>)

Idoneidad	Tipos de moléculas MHC clase II	Serotipo	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II	Nombre del programa
000	DQB 1*0602	DQ6(1)	GILMNQSTVWVYCDEI-[AFGILM- NQSTVWVY]-x-[LIVAPST]-x- x-[ASTGLIVP] [YFWLIMVA]-x- x-[LMAIVN]-x-[AGSTCP]-x- x-[LAIVNFYMW] [YVLFIAMW]-x-x-[LAIVM- NQ]-x-[AGSTCP]-x-x-[LAIVNFY] [ILVM]-x-x-[ALM]-x-[AGSTCP]-x- x-[ILAMYW] [ILVM]-x-x-[ALM]-x-[AGSTP]-x- x-[ILAMYW] [LIFMV]-x- x-[D]-x-[KR(EQN)]-x-[L]-YLF] [LIFMV]-x-x-[D]-x-[KREQN]-x- x-[YLF]	SYFPEITHI
000	DRB1*0101	DR1		Marsh2000
000	DRB1*0101	DR1		SYFPEITHI
000	DRB1*0102	DR1		Marsh2000
00	DRB1*0102	DR1		SYFPEITHI
00	DRB1*0301	DQ17(3)		Marsh2000
00	DRB1*0301	DQ17(3)		SYFPEITHI
00	DRB1*0301 o DRB3*0201	DQ17(3)		Marsh2000
00	DRB1*0301 o DRB3*0201	DQ17(3)	[FILVY]-x-x-[DNQT] desconocido	SYFPEITHI
00	DRB1*0401	DR4	[FLV]-x-x-x-x-x-x-[NQST] desconocido	Marsh2000
000	DRB1*0401 o DRB4	DR4	[FYWILVM]-x-x-[FWIL- VADE]-x-[NSTQHR]-x-x-[K] [FYW]-x-x-x-x-x-x-[ST] [FYWILVM]-x-x-[PWIL- VADE]-x-[NSTQHR]-[DEHKN- QRSTYACILMV]-x-[DEHKN- QRSTYACILMV] + [VILM]-x-x-[YFWILM- RNH]-x-[NSTQHK]-x-[RKHN- QP]-x-[H]	SYFPEITH
00	DRB1*0401 o DRB4*0101	DR4		Marsh2000
000	DRB1*0401 o DRB4*0101	DR4		SYFPEITHI
000	DRB 1*0402 o DRB4	DR4		Marsh2000

(continuación)

Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT<sub>1264</sub>)

Idoneidad	Tipos de moléculas MHC clase II	Serotipo	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II	Nombre del programa
000	DRB 1*0402 o DRB4	DR4	[MLM]-x-x-[YFWILM- RN]-x-[NQSTK]-[RKHN-QPI]-x- [DEHLNQRSTYCYILMVHA]	SYFPEITHI

ES 2 528 766 T3

[Tabla 6]

Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT1<sub>294</sub>)

Idoneidad	Tipos de moléculas MHC clase II	Serotipo	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II	Nombre del programa
o	DRB1*0404 o DRB4	DR4	[VILM]-x-x-[FYWILVMADE]-x-[NTSQR]-x-x-[K]	Marsh2000
o	DRB1*0404 o DRB4	DR4	[VILM]-x-x-[FYWILVMADE]-x-[NTSQR]-x-x-[K]	SYFPEITHI
ooo	DRB1*0405 o DRB4	DR4	[FYWVILM]-x-x-[VILMDE]-x-[NSTQKD]-x-x-x-[DEQ]	Marsh2000
ooo	DRB1*0405 o DRB4	DR4	[FYWVILM]-x-x-[VILMDE]-x-[NSTQKD]-x-x-x-[DEQ]	SYFPEITHI
	DRB1*0405 o DRB4*0101	DR4	[Y]-x-x-x-x-[VT]-x-x-x-[D]	Marsh2000
	DRB1*0405 o DRB4*0101	DR4	desconocido	SYFPEITHI
ooo	DRB1*0407 o DRB4	DR4	[FYW]-x-x-[AVTK]-x-[NTDS]-x-x-x-[QN]	Marsh2000
ooo	DRB1*0407 o DRB4	DR4	[FYW]-x-x-[AVK]-x-[NTDS]-x-x-x-[QN]	SYFPEITHI
o	DRB1*0701	DR7	[FI LVY]-x-x-x-x-[NST]	Marsh2000
o	DRB1*0701	DR7	[FYWILV]-x-x-[DEHKNQRSTY]-x-[NST]-x-x-[VILYF]	SYFPEITHI
o	DRB1*0801	DR8	[FI LVY]-x-x-x-[HKR]	Marsh2000
	DRB1*0801	DR8	desconocido	SYFPEITHI
o	DRB1*0901 o DRB4*0101	DR9	[YFWL]-x-x-[AS]	Marsh2000
o	DRB1*0901 o DRB4*0101	DR9	[WYFL]-x-x-[AVS]	SYFPEITHI
oo	DRB1*1101	DR11 (5)	[YF]-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	Marsh2000
oo	DRB1*1101	DR11 (5)	[WYF]-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	SYFPEITHI
ooo	DRB1*1101 o DRB3*0202	DR11 (5)	[YF]-x-x-x-x-[RK]-x-[RK]	Marsh2000
	DRB1*1104	DR11 (5)	[ILV]-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	Marsh2000
	DRB1*1104	DR11(5)	[ILV]-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	SYFPEITHI
oo	DRB1*1201 o DRB3	DR12(5)	[ILFY(V)]-x-[LNM(VA)]-x-x-[VY(FIN)]-x-x-[YFM(IV)]	Marsh2000
oo	DRB1*1201 o DRB3	DR12 (5)	[ILFYV]-x-[LM NVA]-x-x-[VYFI NA]-x-x-[YFMIV]	SYFPEITHI
	DRB1*1301	DR13(6)	[IVF]-x-x-[YWLVAAM]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	Marsh2000
	DRB1*1301	DR13(6)	[ILV]-x-x-[LVMAWY]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	SYFPEITHI
	DRB1*1301 o DRB3*0101	DR13(6)	[ ILV ] -x-x-x-x- [ R K ] -x-x- [ Y ]	Marsh2000
	DRB1*1301 o DRB3*0101	DR13(6)	desconocido	SYFPEITHI
o	DRB1*1302	DR13(6)	[YFVAI]-x-x-[YWLVAAM]-x-[RK]-x-x-[YEAST]	Marsh2000
o	DRB1*1302	DR13(6)	[YFVAI]-x-x-[LVMAWY]-x-[RK]-x-x-[YEAST]	SYFPEITHI
o	DRB1*1302 o DRB3*0301	DR13(6)	[ILFY]-x-x-x-x-[RK]-x-x-[Y]	Marsh2000
	DRB1*1302 o DRB3*0301	DR13(6)	desconocido	SYFPEITHI
oo	DRB1*1501	DR15(2)	[LVI]-x-x-[FYI]-x-x-[ILVMF]	Marsh2000
oo	DRB1*1501	DR15(2)	[LVI]-x-x-[FYI]-x-x-[ILVMF]	SYFPEITHI

(continuación)

Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II (péptidos WT1<sub>294</sub>)

Idoneidad	Tipos de moléculas MHC clase II	Serotipo	Secuencias del péptido candidato que se une a varias moléculas MHC clase II	Nombre del programa
	DRB1*1501 o DRB5*0101	DR15(2)	[I LV]-x-x-x-x-x-x-x-[H KR]	Marsh2000
ooo	DRB3*0202	DR52	[YFIL]-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-[LVISG]	Marsh2000
ooo	DRB3*0202	DR52	[YFIL]-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-[LVISG]	SYFPEITHI
o	DRB3*0301	DR52	[ILV]-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-[ILV]	Marsh2000
o	DRB3*0301	DR52	[ILV]-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-[ILV]	SYFPEITHI
ooo	DRB5*0101	DR51	[FYLM]-x-x-[QVIM]-x-x-x-x-[RK]	Marsh2000
ooo	DRB5*0101	DR51	[FYLM]-x-x-[QVIM]-x-x-x-x-[RK]	SYFPEITHI

Luego, los péptidos WT1 se seleccionaron visualmente a partir de las Tablas 1 a 6, los péptidos que se muestran en la Tabla 7 siguiente se identificaron como péptidos candidatos preferidos para las moléculas MHC clase II, y se analizaron las funciones actuales de estos péptidos como se describe posteriormente.

5

[Tabla 7]

Identificación de los péptidos candidatos para moléculas MHC clase II de ratón

WT1 <sub>35</sub>	WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEC ID N° 3)	18 -mero	MW 1819.01
WT1 <sub>86</sub>	EQCLSAFTLHFSGQFTG (SEC ID N° 6)	17 -mero	MW 1944.01
WT1 <sub>294</sub>	FRGIQDVRRVSGVAPTLVR (SEC ID N° 7)	19 -mero	MW 2126.48

Preparación de líneas celulares específicas del péptido WT1 y medición de la capacidad de proliferación celular

10 Primero, se emulsionaron los péptidos WT1 anteriores con un adyuvante incompleto de Freund (Montanide ISA 51), y se inocularon ratones por vía intradérmica con cada péptido WT1 en una cantidad que corresponde a 100 µg/ratón. La inmunización se llevó a cabo 3 veces a intervalos de una semana, se extrajo el bazo después de una semana tras la última inmunización, y se prepararon las células esplénicas. Las células esplénicas se estimularon 3 veces a intervalos de 10 días utilizando células esplénicas de ratones no inmunizados, que se pulsaron con el mismo péptido

15 WT1 que se utilizó para la inmunización de cada ratón y se irradiaron, como Estimulador. Entonces, se llevó a cabo la 4ª estimulación utilizando células esplénicas de ratones no inmunizados, que se pulsaron con cada péptido (péptido WT1<sub>35</sub>, WT1<sub>86</sub> o WT1<sub>294</sub>) como se muestra en la Tabla 7 y se irradiaron, como Estimulador, y se midió la reacción de proliferación en respuesta a cada estimulador por un experimento de incorporación de <sup>3</sup>H. Se utilizó un péptido OVA (ovoalbúmina) irrelevante para los péptidos WT1 como péptido de control. Como resultado, las células

20 esplénicas de ratón inmunizadas con un péptido WT1<sub>35</sub>, un péptido WT1<sub>86</sub>, o un péptido WT1<sub>294</sub> respondían cada uno al estimulador pulsado con un péptido WT1<sub>35</sub>, un péptido WT1<sub>86</sub>, o un péptido WT1<sub>294</sub>, y proliferaban (Fig. 1A a 1C).

25 Como se ha descrito anteriormente, las células esplénicas se estimularon in vitro 3 veces a intervalos de 10 días utilizando células esplénicas de ratones no inmunizados, que se habían pulsado con cada péptido WT1 y se irradiaron. Cuando se llevó a cabo la 4ª estimulación utilizando células esplénicas de ratones no inmunizadas, que fueron pulsadas con cada péptido descrito anteriormente y se irradiaron, como un estimulador, y se midió la reacción de proliferación, se añadió un anticuerpo MHC clase I (anticuerpo D<sup>b</sup>) o un anticuerpo MHC clase II (anticuerpo A<sup>b</sup>) a la solución de cultivo y se midió la incorporación de <sup>3</sup>H. Como resultado, la reacción de proliferación en respuesta al

30 estimulador pulsado con cada uno de un péptido WT1<sub>35</sub>, un péptido WT1<sub>86</sub>, o un péptido WT1<sub>294</sub>, era suprimido por adición de un anticuerpo MHC clase II (Fig. 2A a 2C).

35 Como se ha descrito anteriormente, la células se estimularon in vitro 3 veces a intervalos de 10 días utilizando células esplénicas de ratones no inmunizados, que se habían pulsado con cada uno de los péptidos WT1 e irradiado. Luego, se midió la reacción de proliferación por incorporación de <sup>3</sup>H utilizando células C1498 irradiadas que no expresaban ninguna proteína WT1, células C1498 pulsadas con los péptidos WT1 anteriores. O células C1498 que expresaban proteína WT1 por introducción de un gen WT1, como estimulador. Como resultado, la reacción de proliferación se produce en respuesta a las células C1498 pulsadas con el mismo péptido WT1 que se había utilizado en la inmunización in vivo y las células C1498 que expresaban la proteína WT1 por introducción de un gen WT1 (Fig. 3). Esto revelaba que un péptido WT1<sub>35</sub>, un péptido WT1<sub>86</sub>, o un péptido WT1<sub>294</sub>, se produce por un proceso intracelular de una proteína WT1 endógena y presentada sobre una molécula MHC clase II. A partir de

40

los hechos anteriores, se demostró que estos tres péptidos WT1 son péptidos WT1 restringidos a MHC clase II.

#### Medición de la capacidad de producción de IFN- $\gamma$

- 5 Como se ha descrito anteriormente, las células esplénicas se estimularon en vitro 3 veces a intervalos de 10 días utilizando células esplénicas de ratones no inmunizados, que se habían pulsado con cada uno de los péptidos WT1 y se irradiaron. Luego se midió la concentración de IFN- $\gamma$  e IL-4 en un sobrenadante de cultivo utilizando un kit ELISA (BIOSOURCE Immunoassay Kit, Invitrogen). Como resultado, las células esplénicas de dos ratones por separado respondieron a las células esplénicas de los ratones no inmunizados pulsadas con cada péptido WT1 e irradiadas, y producían interferón- $\gamma$  pero poca interleucina-4 (Fig. 4). Esto revelaba que estos tres tipos de péptidos WT1 inducen células T auxiliares específicas de WT1 tipo Th1.

#### **Ejemplo 2**

##### 15 Medición de células citotóxicas específicas de WT1

- Se inmunizaron los ratones 3 veces con un péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I) solo, un péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I) + un péptido WT1<sub>35</sub> (MHC clase II), un péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I) + un péptido WT1<sub>86</sub> (MHC clase II), o un péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I) + un péptido WT1<sub>294</sub> (MHC clase II), y se prepararon las células esplénicas de los ratones.
- 20 Luego, las células esplénicas se estimularon una vez in vitro utilizando el péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I), y el 6° día, se midió la actividad citotóxica utilizando células RMA84 pulsadas con un péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I) como célula diana. Las células RMA84 no pulsadas con el péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I) se utilizaron como células diana de control. Como resultado, las células esplénicas de ratón inmunizado con un péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I) + un péptido auxiliar WT1 (MHC clase II) inducían células T citotóxicas específicas de WT1 más fuertemente al compararse con células esplénicas de ratón inmunizado con un péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I) solo (Fig. 5). Esto demostraba que los tres péptidos WT1 (MHC clase II) son péptidos auxiliares específicos de WT1.

#### **Ejemplo 3**

##### 30 Experimento de implantación tumoral

- Se implantaron subcutáneamente células de leucemia C1498 que expresaban WT1 en ratones en una proporción de  $2,5 \times 10^5$  células por ratón, y se administraron por vía intradérmica 50  $\mu$ g/ratón de un péptido auxiliar WT1<sub>35</sub> junto con un adyuvante incompleto de Freund, una vez a la semana, 3 veces en total, comenzando a la semana después de la implantación (Fig. 6). Como control se administró por vía intradérmica solución salina fisiológica en vez del péptido auxiliar WT1<sub>35</sub> junto con un adyuvante incompleto de Freund. Se midió en el tiempo el tamaño de un tumor subcutáneo, y se calculó la tasa de supervivencia libre de enfermedad en el día 29 después de la implantación subcutánea. Como resultado, el tumor se expandió en todos los ratones del grupo de control, mientras que la proliferación del tumor se había suprimido completamente en 4 de los 10 ratones del grupo inmunizado con el péptido auxiliar WT1<sub>35</sub> (MHC clase II) (Fig. 7). También, se encontró una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre el grupo inmunizado con el péptido auxiliar WT1<sub>35</sub> y el grupo de control (Fig. 8). Esto demostraba que el péptido auxiliar WT1<sub>35</sub> (MHC clase II) es un péptido WT1 que tiene la capacidad de inducir inmunización tumoral in vivo.

- Luego, se diseccionaron los ratones el día 29 tras el comienzo del experimento anterior, se extirpó el bazo, y se analizó la respuesta inmunitaria específica de WT1 utilizando las células esplénicas. En resumen, el bazo se extirpó cuando se diseccionaron los ratones del grupo inmunizado con el péptido auxiliar WT1<sub>35</sub> (MHC clase II) y del grupo de control, y se prepararon las células esplénicas. Las células esplénicas se estimularon una vez con un péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I), y el día tras la estimulación, se midió la actividad citotóxica de las células esplénicas utilizando células RMA84 pulsadas con un péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I) como célula diana. Como control, se midió la actividad citotóxica de las células esplénicas utilizando células RMA84 como célula diana. Como resultado, se indujeron células T citotóxicas específicas de WT1 en los 4 ratones del grupo inmunizado con el péptido auxiliar WT1<sub>35</sub> (MHC clase II) (Fig. 9). Por otro lado, se indujeron células T citotóxicas específicas de WT1 muy débilmente en 3 ratones del grupo de control (Fig. 10). No se indujeron células T citotóxicas específicas de WT1 en un ratón. También, estaba claro que la inducción de células T citotóxicas específicas de WT1 era menor al compararse con el grupo inmunizado con el péptido auxiliar WT1<sub>35</sub> (MHC clase II) (Figs. 9 y 10). Esto demuestra que se inducían células T auxiliares específicas de WT1 por la administración de un péptido auxiliar WT1<sub>35</sub> clase II, y por la acción de las células T auxiliares específicas de WT1, las células T citotóxicas inducidas por la respuesta inmunitaria a una proteína WT1 expresada por las células tumorales implantadas se amplificaron fuertemente in vivo. Por lo tanto, los resultados demostraban la utilidad del péptido auxiliar WT1<sub>35</sub>.

- Después, se analizó la citólisis específica en los ratones del grupo inmunizado con el péptido auxiliar WT1<sub>35</sub> (MHC clase II) anterior y el grupo de control. En resumen, se utilizó como citólisis específica el grado de citólisis (%) que se obtiene por sustracción de la tasa de citólisis (%) cuando las células diana eran células RMA84 de la tasa de citólisis (%) cuando las células diana eran células RMA84 pulsadas con un péptido WT1<sub>126</sub> (MHC clase I) de los experimentos anteriores se utilizó como la citólisis específica (Fig. 11, izquierda). También, se incubaron las células esplénicas preparadas anteriormente y un tetrámero WT1 marcado con fluorescencia (tetrámero H-2Db WT1- RFMPNAPYL-

PE) a 4 °C durante 20 minutos, se lavaron, luego se tiñeron con anticuerpos CD3 y CD8 marcados con fluorescencia, se lavaron de nuevo, y se analizaron por FACS. Las células CD3-positivas, CD8-positivas, y tetrámero-positivas sirvieron como células citotóxicas específicas de WT1 (Fig. 11, derecha). Como resultado, se indujeron células T citotóxicas específicas de WT1 significativamente altas ( $p < 0,05$ ) en las células esplénicas de ratones del grupo inmunizado con el péptido auxiliar WT<sub>135</sub> (MHC clase II) al compararse con células esplénicas de los ratones del grupo de control (Fig. 11).

#### Ejemplo 4

##### 10 Medición de la capacidad de proliferación de células citotóxicas específicas de WT1 (CTL) en seres humanos

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos, que tenían moléculas de subclases DRB1, DPB1, DQB1 o DRB5 como se muestra en la Fig. 12. Se añadió un péptido auxiliar WT<sub>135</sub> (MHC clase II) a las células mononucleares en sangre periférica, y las células se cultivaron durante una semana. Luego, las células mononucleares en sangre periférica se estimularon 4 veces en total a intervalos de una semana utilizando células idénticas a las células mononucleares de sangre periférica derivadas del sujeto, que se habían pulsado con un péptido auxiliar WT<sub>135</sub> e irradiadas, como un estimulador, y se midió la incorporación de <sup>3</sup>H el 6° día. En los 6 sujetos sanos, las células, las células mononucleares de sangre periférica respondieron a un péptido auxiliar WT<sub>135</sub> y proliferaron (Fig. 12). Esto demostraba que el péptido auxiliar WT<sub>135</sub> tiene la función de unirse a las moléculas HLA clase II mencionadas y producen la reacción de proliferación. En esta conexión, el péptido WT<sub>186</sub> y el péptido WT<sub>1294</sub> de ratón difieren del péptido WT<sub>186</sub> (SEC ID N° 4) y el péptido WT<sub>1294</sub> (SEC ID N° 5) humanos en un aminoácido en las posiciones enmarcadas, que se muestran en la Tabla 8.

[Tabla 8]

Diferencias entre las secuencias de los péptidos WT<sub>135</sub>, WT<sub>186</sub> y WT<sub>1294</sub> de ratón y humanos

mWT <sub>135</sub>	De ratón	WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEC ID N° 3)	18-mero
hWT <sub>135</sub>	Humano	WAPVLDFAAPPASAYGSL (SEC ID N° 3)	
mWT <sub>186</sub>	De ratón	EQCLSAFTLHFSGQFTG (SEC ID N° 6)	17-mero
hWT <sub>186</sub>	Humano	EQCLSAFTVHFSGQFTG (SEC ID N° 4)	
mWT <sub>1294</sub>	De ratón	FRGIQDVRRVSGVAPTLVR (SEC ID N° 7)	19-mero
hWT <sub>1294</sub>	Humano	FRGIQDVRRVPGVAPTLVR (SEC ID N° 5)	

#### 25 Ejemplo 5

##### Restricción del péptido WT<sub>135</sub> por una molécula HLA clase II

Con el fin de determinar la restricción del péptido WT<sub>135</sub> por una molécula HLA clase II, se llevó a cabo un experimento más por un método bien conocido por los expertos en la técnica que se describe en resumen posteriormente. Primero, se estimularon 5 veces, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de un sujeto sano [un sujeto sano positivo a DRB1\*0101/0405, DPB1\*0201/0402, y DQB1\*0401/0501 (designado de aquí en adelante como sujeto sano A)] con un péptido WT<sub>135</sub> para preparar un Respondedor. Luego, se pulsaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de otro sujeto sano diferente en un tipo de HLA clase II [un sujeto sano positivo a DRB1\* 0405/0901, DPB1\* 0201/0501, y DQB1\* 0303/0401 (designado como sujeto sano B)] con el péptido WT<sub>135</sub> para preparar un Estimulador, y se midió la proliferación celular [la cantidad de <sup>3</sup>H-timidina incorporada (cpm)]. La medición se llevó a cabo bajo condiciones sin adición de un anticuerpo, adición de un anticuerpo anti-HLA-DR (+a-DR), adición de un anticuerpo anti-HLA-DP (+a-DP), o adición de un anticuerpo anti-HLA-DQ (+a-DQ). Un tipo común de HLA clase II, que es positivo en el Respondedor y el Estimulador, muestra restricción del péptido WT<sub>135</sub>. Como resultado de los experimentos, se demostró que el péptido WT<sub>135</sub> se restringe por DRB1\*0405 debido a que se suprimió la proliferación bajo condiciones de adición de un anticuerpo anti-DR, y el DRB1\*0405 era común en los sujetos sanos A y B, como se muestra en la Fig. 13.

Después se llevó a cabo un experimento bajo las mismas condiciones que las del experimento anterior, excepto que se utilizaron las PBMC derivadas de un sujeto sano diferente del sujeto sano A [sujeto sano positivo a DRB1\*0405/0803, DPB1\*0202/0501, y DQB1\*0401/0601 (designado como sujeto sano G)] como un Estimulador. Como resultado, se demostró que el péptido WT<sub>135</sub> se restringe por DRB1\*0405/0803, DPB1\*0202/0501, y DQB1\*0401/0601 debido a que se suprimió la proliferación bajo condiciones de adición de un anticuerpo anti-HLA-DR, o un anticuerpo anti-HLA-DP, y DRB1\*0405, DPB1\*0201 y DPB1\*0202 eran comunes en el sujeto sano A y el sujeto sano G (DRB1\*0405, DPB1\*0201 y DPB1\*0202 tienen una alta analogía y tienen reactividad cruzada, y por lo tanto se consideran como una molécula común), como se muestra en la Fig. 14.

A continuación, se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que las del experimento anterior, excepto en que las PBMC derivadas de un sujeto sano diferente del sujeto sano A [positivo a DRB1\*0101/0803, DPB1\*0501/, DQB1\*0501/0601 (designado como sujeto sano H) se utilizaron como un Estimulador. Como resultado, se ha demostrado que el péptido WT<sub>135</sub> se restringe por DRB1\*0101 debido a que se suprimió la proliferación bajo

condiciones de adición de un anticuerpo anti-HLA-DR, y DRB1\*0101 era común en el sujeto sano A y el sujeto sano H, como se muestra en la Fig. 15.

Además, las PBMC derivadas del sujeto sano G se utilizaron como Respondedor y las células L que tienen introducido un gen DQB1\*0601 se utilizaron como Estimulador, con el fin de determinar la restricción de un péptido WT1<sub>35</sub>. Se midió la diferencia en la cantidad de IFN- $\gamma$  producida en presencia o ausencia de un pulso con un péptido WT1<sub>35</sub> de las células L. Una proporción de la producción intracelular de IFN- $\gamma$  se midió utilizando FACS que es una técnica bien conocida por los expertos en la técnica. Como resultado se demostró que el péptido WT1<sub>35</sub> se restringe por DQB1\*0601 debido a que el Respondedor se activó por el pulso con un péptido WT1<sub>35</sub> en las células L, como se muestra en la Fig. 16.

Después, se llevó a cabo un experimento como se ha descrito anteriormente utilizando PBMC derivadas del mismo sujeto sano como Respondedor y Estimulador. Los tipos de moléculas HLA clase II que poseían los sujetos sanos utilizados en este experimento se resumen en la Tabla 9 siguiente.

[Tabla 9]

Tipos de moléculas HLA clase II que poseen los sujetos sanos utilizados en este experimento

Sujeto sano N°	DRB1	DPB1	DQB1
A	*0101/0405	*0201/0402	*0401/0501
B	*0405/0901	*0201/0501	*0303/0401
C	*0802/1201	*0201/0501	*0301/0302
D	*1502/1502	*0201/0901	*0601/0601
E	*0405/0901	*0202/0501	*0303/0401
F	*1403/1502	*0201/0901	*0301/0601
G	*0405/0803	*0202/0501	*0401/0601
H	*0101/0803	*0501/-	*0501/0601
I	*0101/1501	*0201/0402	*0501/0602

Como resultado, se descubrió que la adición de un anticuerpo anti-DR o un anticuerpo anti-DP, cuando el experimento se llevaba a cabo utilizando PBMC derivadas de sujetos sanos A a E, daba como resultado la reducción de la cantidad de <sup>3</sup>H-timidina que se incorpora (cpm), y por lo tanto, la supresión de la proliferación. También, la adición del anticuerpo anti-DR solo, cuando se utilizaban las PBMC derivadas del sujeto sano F, daba como resultado la supresión de la proliferación. Además, la adición del anticuerpo anti-DP solo, cuando se utilizaban PBMC derivadas del sujeto sano G, daba como resultado la supresión de la proliferación. Por un experimento utilizando el sujeto sano A, se demostró que el péptido WT1<sub>35</sub> se restringía por DRB1\*0101 o 0405, y DPB1\*0201 o 0402. Por un experimento utilizando el sujeto sano B, se demostró que el péptido WT1<sub>35</sub> se restringía por DRB1\*0405 o 0901, y DPB1\*0201 o 0501. Por un experimento utilizando el sujeto sano C, se demostró que el péptido WT1<sub>35</sub> se restringía por DRB1\*0802 o 1201, y DPB1\*0201 o 0501. Por un experimento utilizando el sujeto sano D, se demostró que el péptido WT1<sub>35</sub> se restringía por DRB1\*1502 debido a que el DRB1\*1502 es homocigoto (Fig. 17). Además, se demostró que el péptido WT1<sub>35</sub> se restringía por DPB1\*0201 o 0901. Por un experimento utilizando el sujeto sano E, se demostró que el péptido WT1<sub>35</sub> se restringía por DRB1\*0405 o 0901, y DPB1\*0202 o 0501. Por un experimento utilizando el sujeto sano F, se demostró que el péptido WT1<sub>35</sub> se restringía por DRB1\*1403 o 1502. En un experimento utilizando el sujeto sano G, se demostró que el péptido WT1<sub>35</sub> se restringía por DPB1\*0202 o 0501.

También, se midió la diferencia en la cantidad producida de IFN- $\gamma$  en presencia o ausencia de un pulso con un péptido WT1<sub>35</sub> utilizando las PBMC derivadas del sujeto sano I como Respondedor y Estimulador. Se midió la proporción de producción de IFN- $\gamma$  intracelular utilizando FACS que es una técnica bien conocida por los expertos en la técnica. Como resultado, aumentaba marcadamente la proporción de la cantidad de IFN- $\gamma$  por el pulso con el péptido WT1<sub>35</sub> (Fig. 18). Esto demuestra que el péptido WT1<sub>35</sub> se restringía por cualquiera de DRB1\* 0101, DRB1\*1501, DPB1\* 0201, DPB1\* 0402, DQB1\*0501, y DQB1\*0602.

#### Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona péptidos WT1 que se restringen por varios tipos de moléculas MHC clase II, polinucleótidos que codifican los péptidos, composiciones farmacéuticas que los contienen y similares. Por lo tanto, se pueden utilizar en el campo farmacéutico, por ejemplo, en el campo del desarrollo y producción de fármacos profilácticos o terapéuticos para varios tumores de órganos hematopoyéticos y tumores sólidos que expresan altamente un gen WT1.

[Texto Libre del Listado de Secuencias]

LISTADO DE SECUENCIAS

5           <110> International Institute of Cancer Immunology, Inc.  
            <120> Péptido auxiliar antigénico de cáncer  
            <130> 669667  
10           <150> JP 2009-105286  
            <151> 23-04-2009  
            <160> 8  
15           <170> PatentIn versión 3.2  
            <210> 1  
            <211> 449  
20           <212> PRT  
            <213> *Mus musculus*  
            <400> 1

ES 2 528 766 T3

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

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

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

Tyr 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 Leu 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 Thr Ile  
 130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Ala 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 Met Ala Ala Gly Ser Ser Ser  
 245 250 255

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

Ser Glu Asn His Thr Ala 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 Ser  
 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 His 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 His Val Ala  
 435 440 445

**Leu**

<210> 2  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

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

10

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> 3  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 3

Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly  
 1 5 10 15

10 **Ser Leu**

15 <210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 4

Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr  
 1 5 10 15

**Gly**

20 <210> 5  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 25 <400> 5

Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr  
 1 5 10 15

Leu Val Arg

30

<210> 6  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

5

<400> 6

**Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Leu His Phe Ser Gly Gln Phe Thr**  
**1 5 10 15**

**Gly**

10

<210> 7  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

15

<400> 7

**Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Ser Gly Val Ala Pro Thr**  
**1 5 10 15**

**Leu Val Arg**

20

<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

25

<400> 8

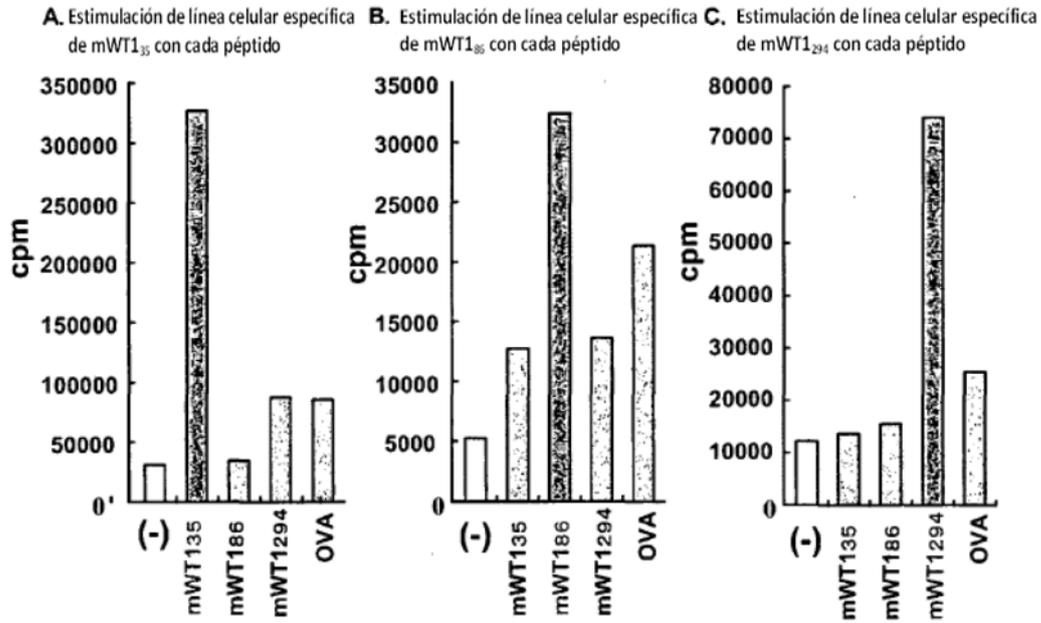
**Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu**  
**1 5**

## REIVINDICACIONES

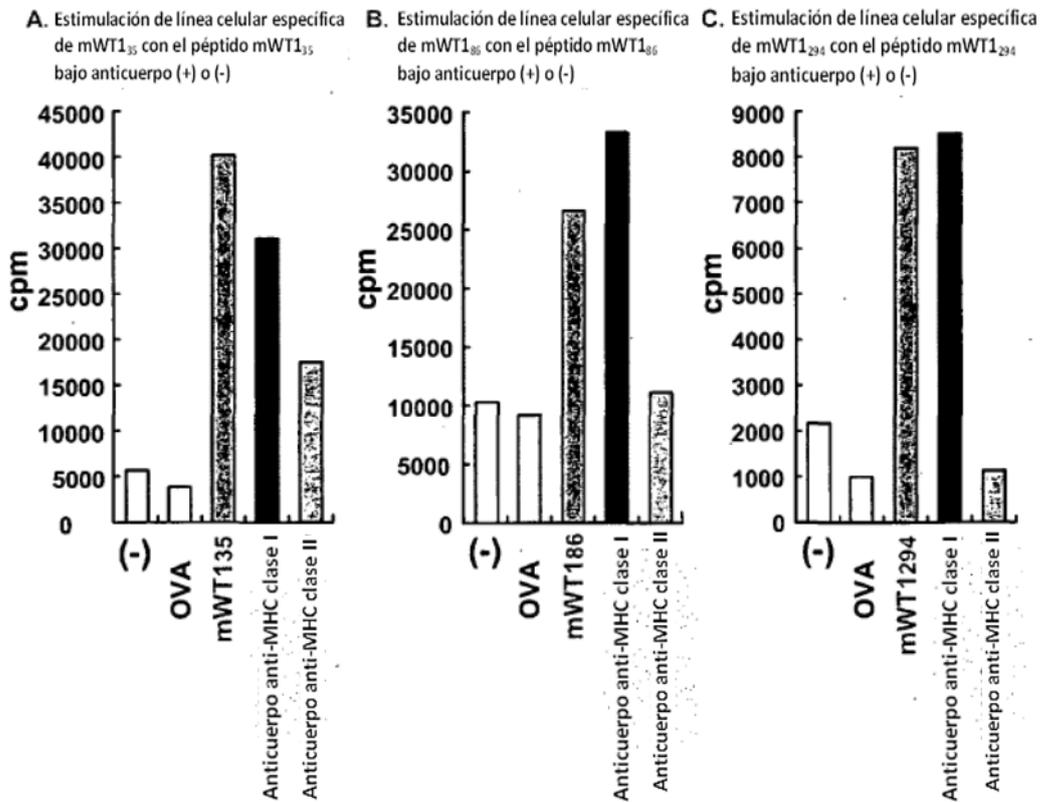
1. Un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en aminoácidos contiguos derivados de una proteína WT1 e induce células T auxiliares específicas de WT1 uniéndose a una molécula MHC clase II, donde la secuencia de aminoácidos se selecciona de entre:
- (a) la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 3;  
 (b) la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 4;  
 (c) la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 5; y  
 (d) una secuencia de aminoácidos en la que se sustituye, elimina o añade solo un aminoácido de las secuencias representadas en (a) a (c).
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos es la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N° 3.
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde
- (i) la molécula MHC clase II se selecciona de entre DRB1\* 0101, DRB1\*0405, DRB1\*0802, DRB1\*0803, DRB1\*0901, DRB1\*1201, DRB1\*1403, DRB1\*1501, DRB1\*1502, DPB1\*0201, DPB1\*0202, DPB1\*0402, DPB1\*0501, DPB1\*0901, DQB1\*0301, DQB1\*0302, DQB1\*0401, DQB1\*0501, DQB1\*0601, DQB1\*0602, y DRB5\*0102; o  
 (ii) la molécula MHC clase II se selecciona de entre DRB1\*0101, DRB1\*0405, DRB1\*1502, DPB1\*0201, DPB1\*0202, y DQB1\*0601.
4. Un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Un anticuerpo contra el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. Una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer, que comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, o el vector de acuerdo con la reivindicación 5.
8. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, o un vector de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer.
9. Células presentadoras de antígeno que presentan el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 por medio de la molécula MHC clase II de acuerdo con la reivindicación 3.
10. Un método para inducir células presentadoras de antígeno, que comprende el cultivo de células presentadoras de antígeno inmaduras en presencia del péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y la inducción de células presentadoras de antígeno, que presentan el péptido por medio de la molécula MHC clase II de acuerdo con la reivindicación 3, a partir de células presentadoras de antígeno inmaduras.
11. Células T auxiliares específicas de WT1 que se inducen por el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
12. Un método para inducir células T auxiliares específicas de WT1, que comprende el cultivo de células mononucleares de sangre periférica en presencia del péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y la inducción de células T auxiliares específicas de WT1 a partir de células mononucleares de sangre periférica.
13. Un kit para inducir células T auxiliares específicas de WT1, que comprende, como principio activo, el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
14. Un kit para tratar y prevenir el cáncer, que comprende, como principio activo, el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, o el vector de acuerdo con la reivindicación 5.
15. Un método para determinar la presencia o cantidad de células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto que tiene la molécula MHC clase II de acuerdo con la reivindicación 3, comprendiendo dicho método las etapas de:
- (a) hacer reaccionar el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con una muestra derivada del sujeto; y luego

(b) determinar la presencia o cantidad de una citoquina que está contenida en la muestra.

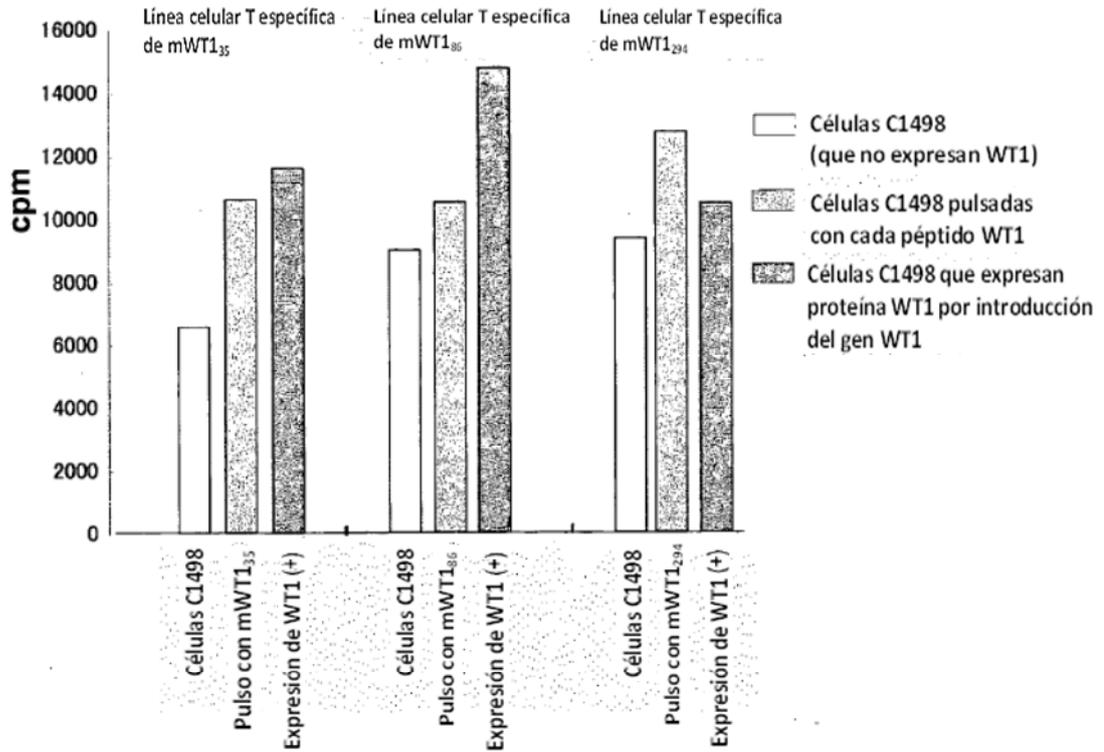
[Fig. 1]



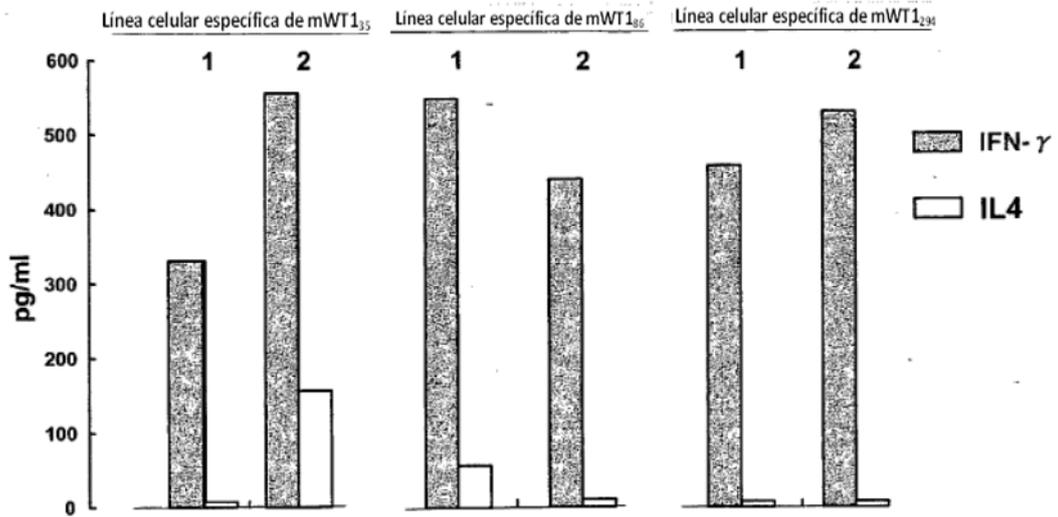
[Fig. 2]



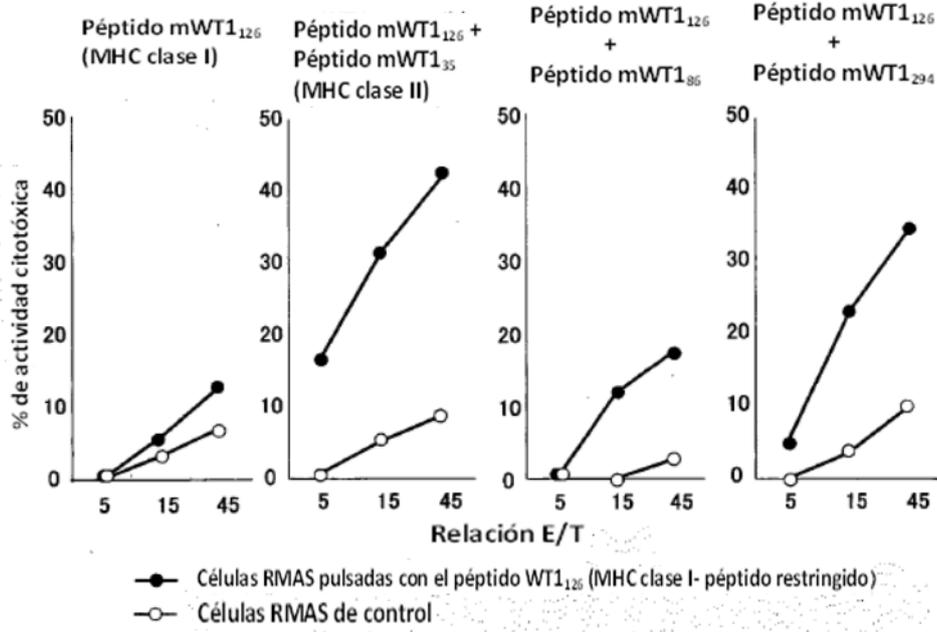
[Fig. 3]



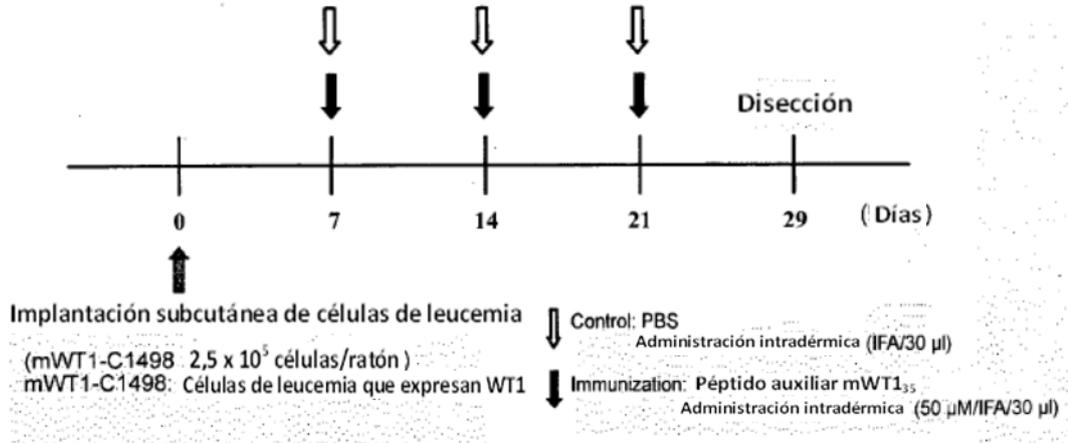
[Fig. 4]



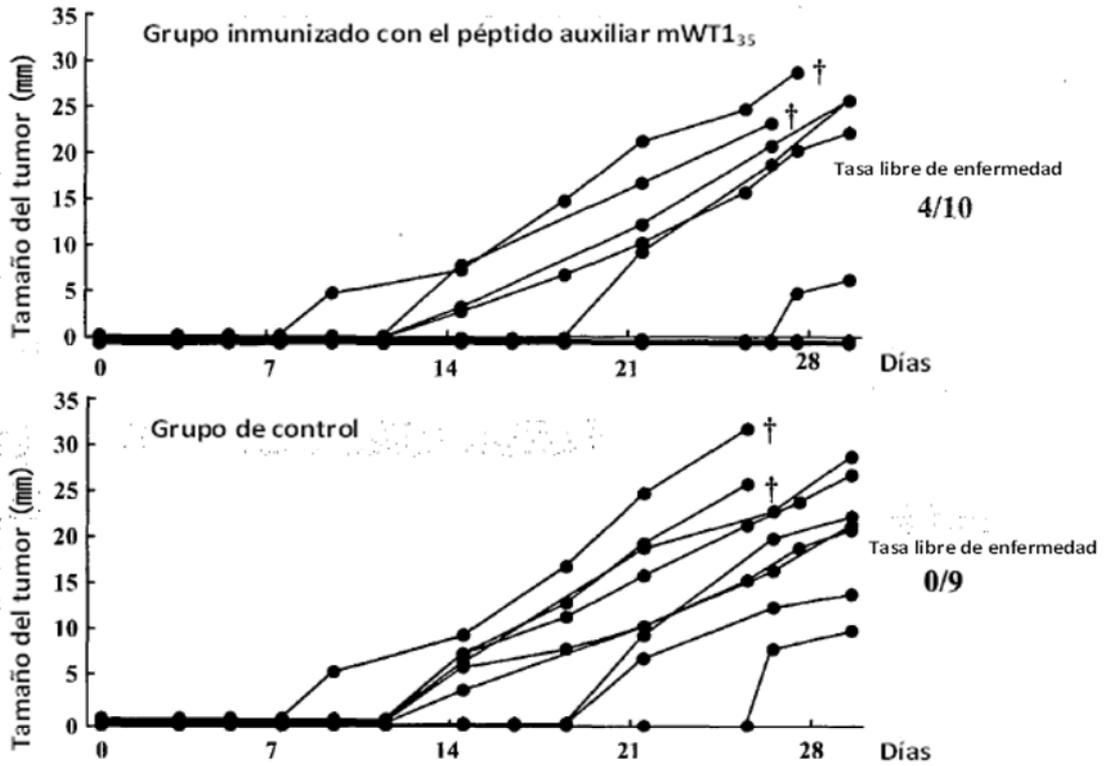
[Fig. 5]



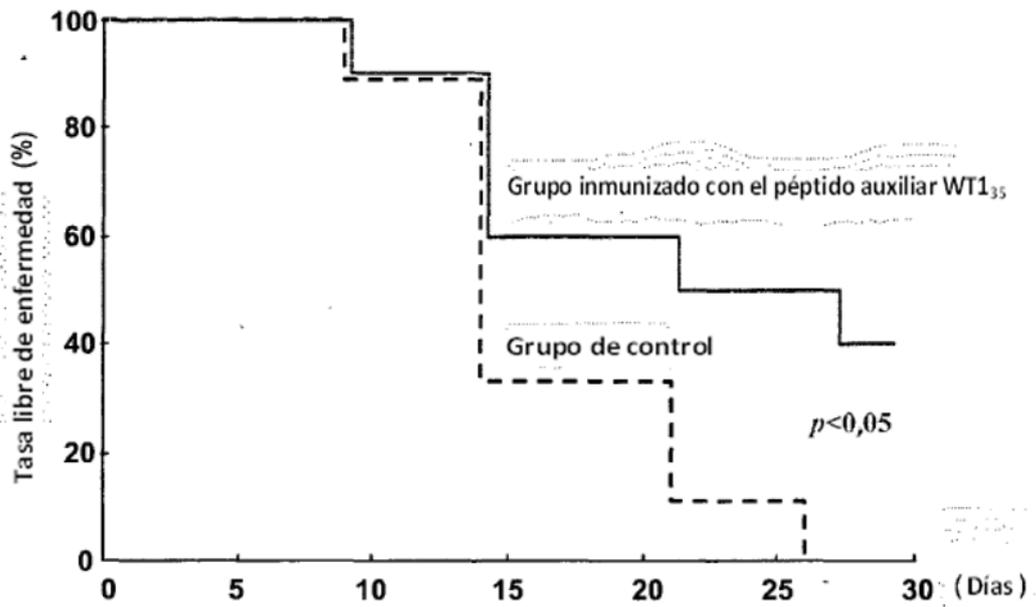
[Fig. 6]



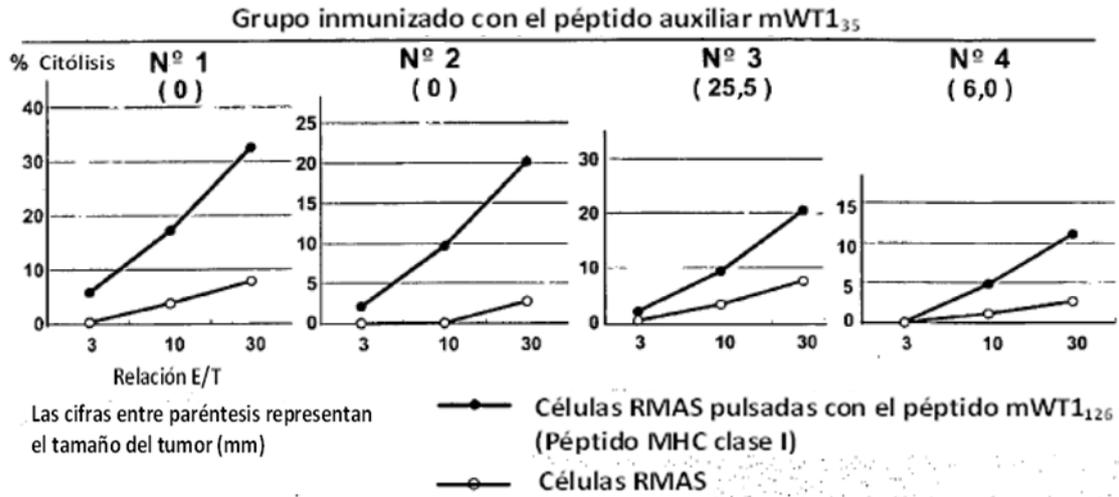
[Fig. 7]



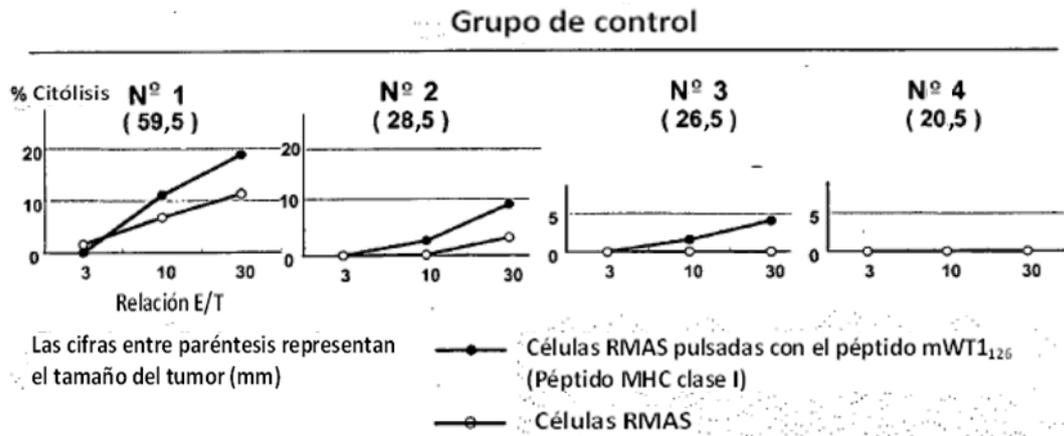
[Fig. 8]



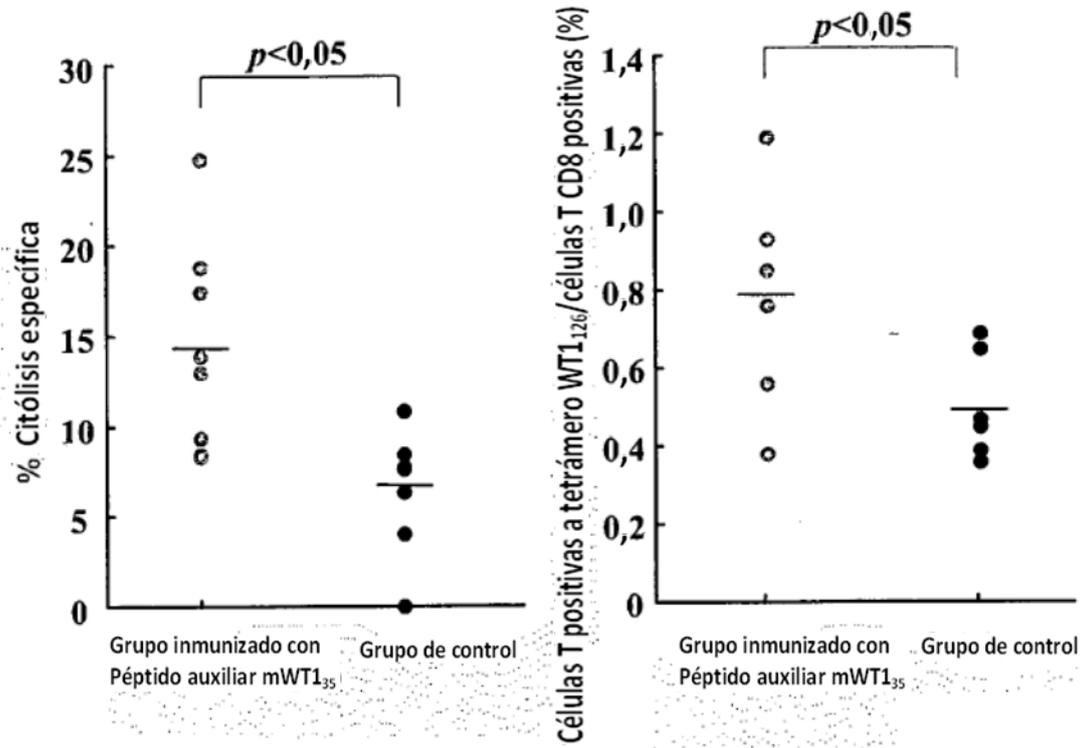
[Fig. 9]



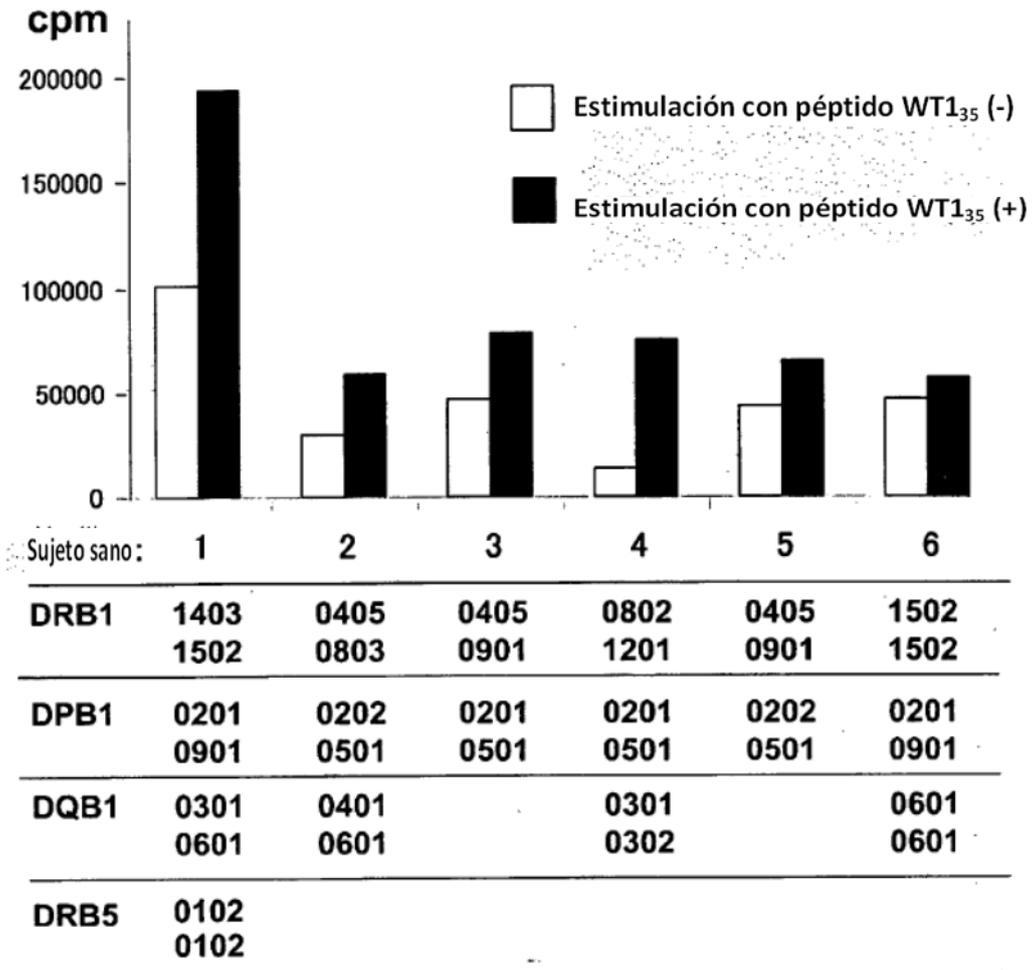
[Fig. 10]



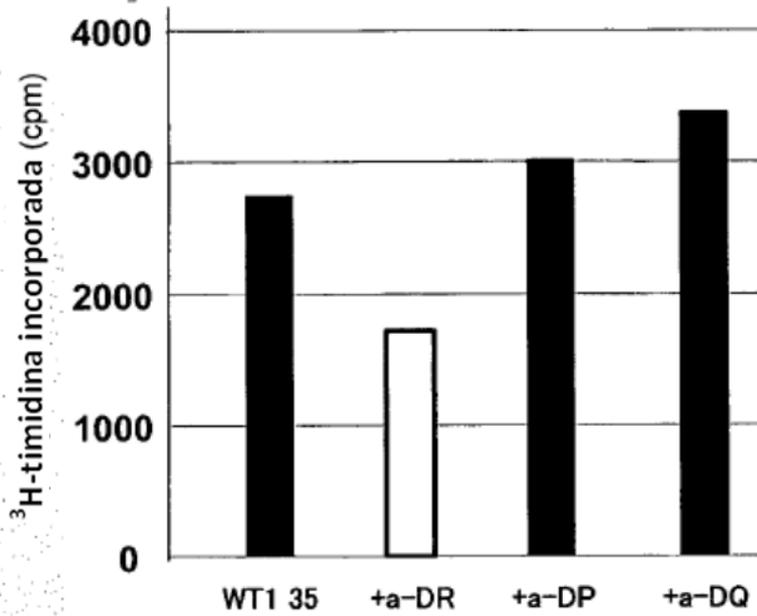
[Fig. 11]



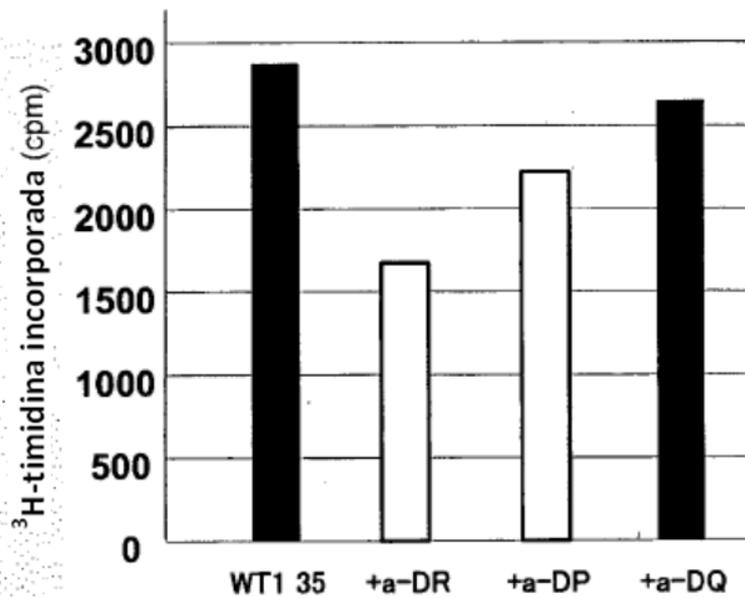
[Fig. 12]



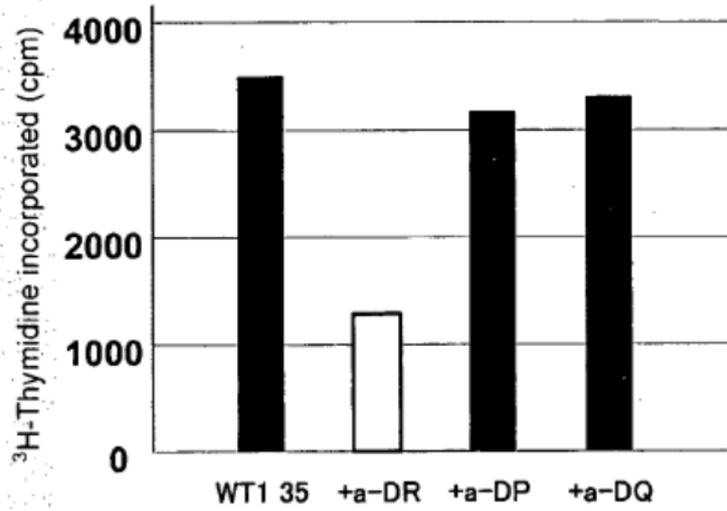
[Fig. 13]



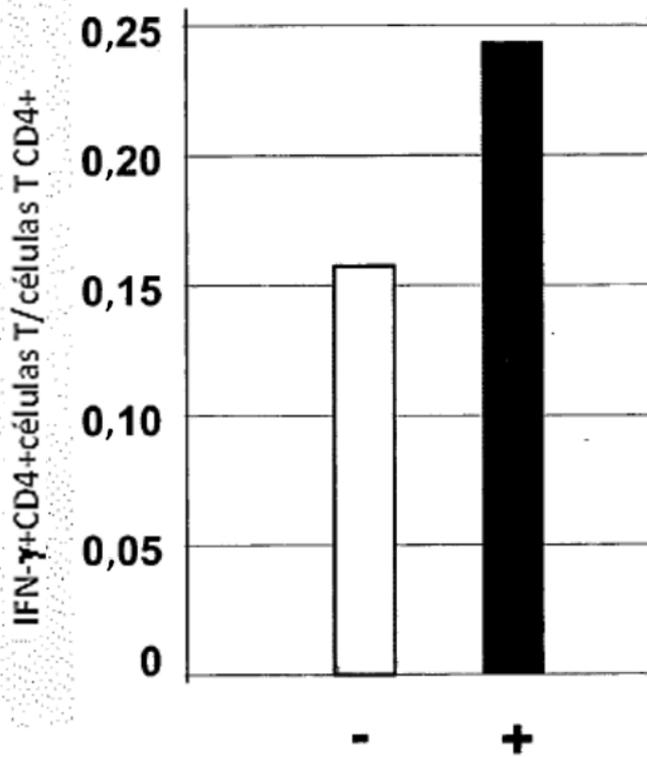
[Fig. 14]



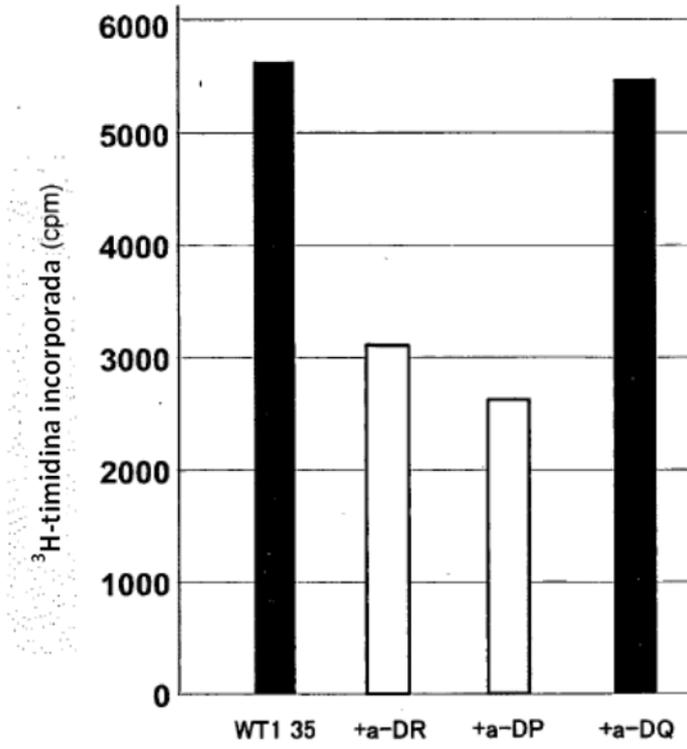
[Fig. 15]



[Fig. 16]



[Fig. 17]



[Fig. 18]

