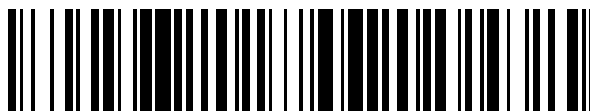


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 812**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2008** **E 08723922 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015** **EP 2125005**

54 Título: **Péptidos derivados de PRAME y composiciones inmunogénicas que comprenden los mismos**

30 Prioridad:

26.03.2007 EP 07104893

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

06.07.2015

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.
LUMC (100.0%)
ALBINUSDREEF 2
2333 ZA LEIDEN, NL**

72 Inventor/es:

**KESSLER, JAN;
GRIFFIOEN, MARIEKE;
MELIEF, CORNELIS JOHANNES MARIA y
DRIJFHOUT, JAN WOUTER**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 539 812 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

Péptidos derivados de PRAME y composiciones inmunogénicas que comprenden los mismos

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la medicina y la inmunología. En particular se refiere a péptidos, vacunas y métodos para preparar composiciones de vacuna que son capaces de suscitar respuestas inmunológicas de células antitumorales in vivo cuando se administran a un sujeto.

10

Antecedentes de la invención

[0002] El antígeno asociado a tumores PRAME (Antígeno PReferentemente expresado en las células de MElanoma) fue originalmente identificado como un antígeno reconocido por linfocitos T citotóxicos capaces de lisar células de melanoma (Ikeda et al., Immunity. 1997,6:199-208.) Aunque el antígeno tumoral PRAME se conoce por ser sobreexpresado en una amplia variedad de cánceres humanos, su función molecular ha permanecido oscura hasta recientemente. PRAME fue recientemente identificado como un represor dominante de señalización RAR (receptor de ácido retinoico). PRAME fue mostrado para enlazar RAR en presencia de RA, previniendo la activación del receptor inducida por ligando y la transcripción del gen meta a través del reclutamiento de proteínas Polycomb. Se mostró que PRAME estaba presente en los promotores objetivo RAR e inhibía la diferenciación inducida por RA, detención del crecimiento, y apoptosis. Por el contrario, la inhibición de la expresión de PRAME por interferencia de ARN en el melanoma humano resistente a RA restauró la señalización RAR y rehabilitó la sensibilidad a los efectos antiproliferativos de RA in vitro e in vivo. (Epping et al., Cell. 2005,122(6): 835-47). La sobreexpresión de PRAME, como se observa frecuentemente en neoplasias humanas, puede proporcionar crecimiento de células tumorales y ventajas de supervivencia antagonizando la señalización RAR.

25

[0003] De hecho, se ha descubierto que PRAME es sobreexpresado en una amplia colección de tumores sólidos y el 30% de la leucemia aguda, mientras que la expresión de tejido normal se confina al testículo, endometrio y a niveles muy bajos en ovarios y suprarrenales. Es un antígeno tumoral establecido y su aplicación potencial como objetivo para inmunoterapias está bien documentada en la técnica, como se discute en US 5,830,753, US 6,297,050, US 6,339,149, EP 0783511 B1, WO 01/52612 y US 2005/0221440 A1. A pesar de que muchas publicaciones que indican el potencial de PRAME como un antígeno tumoral y atractivo objetivo candidato de suscitar respuestas inmunológicas de células antitumorales y preparar vacunas antitumorales, hay pocos datos disponibles que substancializan la conservación natural de los péptidos derivados de PRAME y epítomos, tampoco había datos disponibles que mostraran la inmunogenicidad de estos epítomos, que se necesita para establecer una respuesta de células T antitumorales eficaces. La presente invención se dirige a este problema y proporciona péptidos derivados de PRAME mejorados que comprenden epítomos de clase I y II de MHC recién identificados y composiciones que comprenden estos péptidos.

35

Resumen de la invención

[0004] US 6,297,050, WO01/52612 y US 2005/0221440A1 proporcionan moléculas de ácidos nucleicos derivadas de PRAME, epítomos de codificación y péptidos que comprenden estos epítomos. Los péptidos que contienen el epítomo PRAME y/o derivado de PRAME descritos en el estado de la técnica se pueden aplicar como componentes activos de composiciones para vacunación. Tales péptidos se basaban en los epítomos presentados en HLA de clase I que fueron identificados por unión de algoritmos de predicción y determinación de divisiones proteasómicas, pero no han tenido en cuenta el hecho de que para la inducción óptima de respuestas de CTL CD8+ las secuencias seleccionadas necesitan incluir ambas secuencias presentadas por moléculas de HLA de clase I y moléculas de HLA de clase II. WO01/90197 se refiere a la modulación de respuestas inmunológicas usando información de secuencia de una proteína progenitora de PRAME para producir una secuencia de origen no natural en un péptido sintético. Además, no se proporcionan datos en cuanto a si estos epítomos y péptidos son en realidad capaces de producir una respuesta inmune en seres humanos in vivo.

50

[0005] La presente invención proporciona péptidos y composiciones capaces de suscitar respuestas de linfocitos auxiliares T CD4⁺ (células Th) y linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL). Un objetivo mayor de la presente invención es la provisión de nuevos péptidos que contienen epítomos de PRAME antitumorales y composiciones para fines de vacunación que comprenden los mismos, que son más eficaces debido a la presencia de ambos epítomos confirmados de Th CD4⁺ y CTL CD8⁺. Las composiciones que contienen péptidos de la invención pueden ser hechas sintéticamente y están por lo tanto completamente definidas, lo que es ventajoso para fines de fabricación, control de la calidad y garantía de seguridad. Los péptidos de la invención son óptimamente diseñados para ser usados como una vacuna para inducir una fuerte respuesta inmune terapéutica y/o protectora, contra las neoplasias de expresión de PRAME induciendo simultáneamente respuestas de CD4⁺ Th y CTL CD8⁺ y son aplicables para un porcentaje alto de pacientes debido a que los epítomos de HLA de clase I y de HLA de clase II contenidos en estos péptidos tienen una amplia cobertura de haplotipos de HLA.

60

[0006] La presente invención proporciona péptidos mejorados derivados de la proteína PRAME que comprende epítomos recién identificados. Secuencias peptídicas derivadas de PRAME según esta invención encuentran varios requisitos estrictos: son lo bastante pequeñas para ser eficazmente sintetizadas y lo bastante grandes para ser aceptadas por células presentadoras de antígenos profesionales. Los péptidos según la invención pueden ser fácilmente degradados por el proteasoma 20S, liberando fragmentos o epítomos que pueden presentar HLA de clase I. Los péptidos según la invención preferiblemente comprenden al menos un epítomo de HLA de clase I y al menos un epítomo de HLA de clase II. Los epítomos que pueden presentar HLA de clase II son cortados de los péptidos de la invención por una vía independiente de proteasoma. Es esencial que estos epítomos de clase II estén presentes para una formación óptima de células T efectoras CD8⁺ y de células T de memoria CD8⁺, porque las células Th CD4⁺ proporcionan las señales necesarias a las células dendríticas (DC) para permitir que estas DC induzcan un efector de CD8⁺ robusto óptimo al igual que respuestas de célula T de memoria. Los epítomos presentes en los péptidos de la invención se pueden visualizar en una gama amplia de moléculas de HLA de clase I y de HLA de clase II de una gama amplia de haplotipos MHC, en particular la más predominante de estas moléculas de HLA en seres humanos, que cubre la mayoría de haplotipos de HLA en pacientes. Los péptidos de la invención comprenden HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3; HLA-A24; HLA-A68, HLA-B7, HLA-B8; HLA-B35; HLA-B60; HLA-B61 y HLA-B62 presentaron epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL), cuya capacidad enlazante de HLA de clase I y la generación C-terminal por el proteasoma ha sido establecida experimentalmente. Los péptidos que contienen epítomos de CTL de unión de HLA-A2 son los más preferidos, dado que HLA-A2 es la molécula de HLA de clase I más predominante en seres humanos.

[0007] Los péptidos según esta invención además preferiblemente tienen una reactividad celular Th CD4⁺ probada, como se determina por análisis ex vivo en controles saludables y/o en pacientes con cáncer, así asegurando no solo la generación de células T efectoras CD8⁺ mejoradas sino también memoria de CTL apropiada. Además, epítomos de CTL de unión de HLA de clase I presentes en los péptidos de la invención preferiblemente tienen una actividad estimuladora de células de CTL CD8⁺ probada, confirmada bien por su capacidad para inducir CTL in vitro y/o in vivo en donantes sanos y/o en pacientes con cáncer.

[0008] Se describe un grupo de 20 péptidos derivados de PRAME de 33 a 35 aminoácidos consecutivos (aa.) desde la secuencia de aminoácidos de PRAME, cumpliendo la mayoría o todos los requisitos establecidos más arriba y que se pueden usar separadamente, o en cualquier combinación de 2, 3, 4, 5, 10, hasta los 20 péptidos, para usar en el tratamiento o prevención de neoplasias o cáncer, y para ser provistos en composiciones para vacunación para el tratamiento y/o prevención de neoplasias que sobreexpresan PRAME, en particular tumores. Se describen composiciones inmunogénicas que comprenden al menos 1 y preferiblemente 2 o más péptidos del grupo de 20 péptidos derivados de PRAME. Las composiciones inmunogénicas preferiblemente además comprenden moduladores inmunológicos y adyuvantes, de forma más preferible adyuvantes sintéticos, que han sido seleccionados para mejorar y optimizar enormemente la actividad inmunogénica de los péptidos y epítomos de la invención que presentan actividad antitumoral in vitro y/o in vivo.

Descripción de la invención

[0009] Vacunas antitumorales encuentran su aplicación en muchos campos terapéuticos que varían de tratamientos anticáncer para tratamiento o profilaxis de neoplasias tales como neoplasias inducidas de forma vírica, que comprenden virus del papiloma humano (HPV), herpes virus del sarcoma de Kaposi (KSHV), linfoma inducido por el virus de Epstein Bar (EBV), pero también neoplasias esporádicas que presentan antígenos tumorales tales como MAGE, BAGE, RAGE, GAGE, SSX-2, NY-ESO-1, antígeno de CT, CEO, PSA, p53 o PRAME. La respuesta inmune más preferida para ser obtenida por cualquier vacuna peptídica antitumoral es una respuesta de células T, suscitada por epítomos de células T en los péptidos. Una respuesta de células T antitumorales exitosa debería consistir en tanto una respuesta de CTL restringida de HLA de clase I y simultáneamente una respuesta de Th restringida a HLA de clase II, y puede ser ventajosamente acompañada por una respuesta de células B. Diferentes publicaciones han demostrado que las células T CD4⁺ tras la interacción con células dendríticas (DC) que presentan epítomos de clase II sobrerregulan el ligando CD40 .

[0010] La interacción de la célula Th CD4⁺ por su ligando CD40 con la molécula CD40 en la DC lleva a la activación de la DC. Las DC activadas presentan moléculas coestimuladoras sobrerreguladas y segregan citocinas de promoción de CTL. Esto no solo permite una respuesta de CTL CD8⁺ más sólida inducida por tal DC activada que presenta epítomos restringidos de MHC de clase I, sino también una respuesta de memoria de CTL mucho más sólida (Ridge et al. 1998, Nature 393:474; Schoenberger et al.1998, Nature 393: 480; Sun et al. 2004, Nat. Immunol. 5:927)). La necesidad para expresión de CD40 en la DC para respuestas de CTL CD8⁺ antitumorales sólidas después de la vacunación con péptidos largos (35 aa.) fue publicada en Zwaveling et al. (2002, J. Immunol. 169:350). Recientemente hemos encontrado que sin la inducción de respuestas Th CD4⁺ por epítomos de MHC de clase II contenidos en los péptidos largos, las respuestas inducidas de CTL CD8⁺ son menos vigorosas y efímeras, careciendo completamente de memoria de CTL CD8⁺.

[0011] Epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) presentados en HLA de clase I codificados por PRAME son producidos intracelularmente, por una secuencia de mecanismos intracelulares definidos, sea de moléculas de proteínas de PRAME de

longitud total o de productos ribosómicos defectuosos más cortos codificados por PRAME (DRIPS; Yewdell et al., 2002, Mol. Immunol 39:139).

[0012] Primero, el evento dominante que define un epítipo de CTL es la liberación del epítipo (o precursor de epítipo) desde sus regiones de proteína flanqueantes a través de digestión enzimática por peptidasas citosólicas. El proteasoma multicatalítico es el complejo enzimático primario que se considera que es requerido para la generación del C-término exacto de la gran mayoría de epítipos de CTL (Rock et al., 2004, Nat. Immunol. 5:670)). La generación del término amino de un epítipo de CTL, por otro lado, es mucho más flexible porque diferentes exo-peptidasas aminoterminales (como ERAP1, aminopeptidasa sensible a la puomicina, hidrolasa de bleomicina y otros) residen en el citosol y retículo endoplasmático (ER) y aquellas enzimas de recorte tienen la capacidad de acortar un precursor de epítipo alargado N-terminal hasta su longitud precisa. En cambio, la reducción C-terminal no ha sido proporcionada. Por lo tanto, la determinación experimental de sitios de escisión proteasómica en la proteína PRAME identifica los C-terminales de fragmentos de péptidos de PRAME producidos endógenamente que pueden enlazar moléculas de HLA de clase I. En casos especiales, en su mayoría implicando epítipos de CTL con un residuo C-terminal básico, una actividad enzimática no proteasómica se necesita para la generación del C-término del epítipo (ver Tenzer et al., 2005; Cell. Mol. Life Sci 62:1025 y Seifert et al., 2003, Nat. Immunol. 4:375)). La presente invención también divulga un nuevo epítipo de CTL presentado por HLA-A3 que identificamos para ser producido C-terminalmente por una acción doble no proteasómica de las enzimas Nardilisina (EC 3.4.24.61) y Thimet oligopeptidasa (TOP) (EC 3.4.24.15)..

[0013] En segundo lugar, fragmentos de péptidos generados enzimáticamente - con una longitud de 9 - 11 aa. - deberían tener capacidad de unión para las moléculas de HLA de clase I disponibles en las células donde son producidos. La unión de péptidos a moléculas de HLA de clase I se restringe a los péptidos que poseen los residuos de aa. requeridos en las posiciones denominadas de anclaje. Debido a las moléculas de HLA altamente polimórficas, cada molécula de clase I tiene un motivo de unión preferido diferente, que comprende residuos de anclaje preferidos.

[0014] Ambos fenómenos, digestión enzimática, en su mayoría por el proteasoma, y unión de péptido de HLA de clase I, se pueden evaluar experimentalmente, y la combinación de los resultados de tales pruebas permite la selección fiable y precisa de epítipos de CTL presentados en HLA de clase I (Kessler et al., 2001, J. Exp. Med. 173:73)). Adicionalmente, para confirmar la utilidad de los epítipos de CTL presentados en HLA de clase I putativos identificados por PRAME, los péptidos de epítipos sintéticos se pueden evaluar por su capacidad inmunogénica para inducir respuestas de CTL in vitro. Una vez que una línea de CTL que es reactiva contra el epítipo identificado ha sido generada, esta línea de CTL (o clones derivados de esta línea) se pueden utilizar para confirmar la expresión en la superficie celular del epítipo de CTL en la célula tumoral por ensayos de reconocimiento de CTL funcionales (Kessler et al., 2001, J. Exp. Med. 173:73).

[0015] La presente invención proporciona secuencias peptídicas cuidadosamente seleccionadas derivadas del antígeno de proteína de PRAME humana intacta. Tales péptidos suponen una muy mejorada, aumentada y prolongada respuesta de CTL efectora y de memoria CD8⁺ tras la administración en una gama amplia de pacientes con cáncer PRAME positivo. Epítipos de células Th CD4⁺ y CTL CD8⁺ recién identificados por PRAME, al igual que péptidos sintéticos derivados de PRAME y composiciones inmunogénicas que los comprenden son también parte de la presente invención.

[0016] Debido a que los péptidos de la invención son preferiblemente usados como una vacuna solos o en combinación o como parte de una composición inmunogénica, los péptidos son preferiblemente llamados péptidos de vacuna y composiciones de vacuna de la composición..

[0017] El uso de péptidos relativamente cortos es altamente preferido para uso médico ya que estos se pueden sintetizar in vitro eficazmente, lo que no es posible o es antieconómico para proteínas nativas mayores de aproximadamente 100 aminoácidos. La síntesis química de péptidos es práctica rutinaria y varios métodos adecuados se conocen por el experto en la materia. La síntesis química de péptidos también supera los problemas asociados con la producción recombinante de proteínas intactas, que es difícil de estandarizar y requiere purificación extensa y medidas de control de la calidad. Péptidos con una longitud que excede la longitud de epítipos de HLA de clase I y clase II (por ejemplo con una longitud como se indica aquí abajo) son particularmente ventajosos para uso como componente de vacuna porque son lo bastante grandes para ser aceptados por células presentadoras de antígenos profesionales, en particular DC, como se explica en WO02/070006 y procesados en la DC antes de que tenga lugar la presentación de superficie celular de los epítipos de HLA de clase I y clase II contenidos. Por lo tanto, la inducción desventajosa de tolerancia de células T por la presentación sistémica de epítipos mínimos de HLA de clase I en células no presentadoras de antígenos (como se muestra en Toes et al., 1996, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93:7855 y Toes et al., 1996, J. Immunol. 156:3911), se evita por la aplicación de péptidos de la invención con una longitud como se indica aquí (como se muestra en Zwaveling et al., 2002, J. Immunol. 169:350).

[0018] Péptidos que comprenden epítipos que deben ser presentados a receptores de células T de CTL y/o células Th preferiblemente cumplen varios requisitos. Los péptidos preferiblemente tienen longitud suficiente para contener ambos

epítopos de HLA de clase I y de clase II. Además, los péptidos preferiblemente comprenden residuos de anclaje dentro de sus partes de unión a HLA de clase I y II para permitir la unión a las moléculas de clase I y II, respectivamente. La estabilidad de la interacción entre péptido y molécula presentadora de MHC debería ser suficiente para generar una respuesta inmune significativa y eficaz. En el contexto de la presente invención, la estabilidad de la interacción entre péptido y molécula presentadora de MHC se considera suficiente en este aspecto si el péptido tiene una unión de afinidad intermedia a alta, por la cual una $IC_{50} \leq$ aproximadamente $5 \mu M$ es considerada unión de afinidad alta, aproximadamente $5 \mu M < IC_{50} \leq$ aproximadamente $15 \mu M$ es considerada unión de afinidad intermedia, aproximadamente $15 \mu M < IC_{50} \leq 100 \mu M$ es considerada unión de baja afinidad e $IC_{50} >$ aproximadamente $100 \mu M$ que fue considerada como sin ninguna unión.

[0019] Un sitio de escisión proteasómica específica que genera el C-término del epítipo, preferiblemente está presente exactamente después de la secuencia de aa. del epítipo para ser liberado del péptido mayor y presentado en la molécula de HLA de clase I. Requisitos de longitud son mucho menos estrictos para epítopos presentados por HLA de clase II, por lo tanto una necesidad para generación enzimática precisa del péptido de unión de clase II es menos absoluta. Estos requisitos han sido usados en la presente invención para localizar y diseñar péptidos en la secuencia proteica de PRAME de longitud total que comprenden combinaciones de epítopos de CTL y células Th preferidos y son por tanto péptidos altamente adecuados para fines de vacunación.

[0020] Además, experimentos de células T in vitro y ex vivo son preferiblemente usados para confirmar la capacidad de péptidos según la invención para inducir respuestas sustanciales de Th $CD4^+$ y CTL $CD8^+$. Los péptidos de la presente invención proporcionan así una mejora marcada en la selección de péptidos relativamente cortos que pueden ser químicamente sintetizados, que comprenden los epítopos de células T presentados en HLA de clase I y clase II más ampliamente aplicables derivados del antígeno de tumor PRAME. Los péptidos son particularmente optimizados respecto a su escisión proteasómica y preferiblemente contienen epítopos de HLA de clase I y de clase II. La liberación de los C-terminales de epítopos de CTL contenidos en los péptidos de la invención por los 20 proteasomas proporcionan fragmentos de unión de HLA de clase I con capacidad estimuladora de CTL $CD8^+$.

[0021] En un primer aspecto de la invención se proporciona un péptido según la reivindicación 1. Se describe un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua seleccionada de la secuencia del aminoácido 509 de la proteína de PRAME humana, representado en la SEC ID nº 21, donde el péptido preferiblemente comprende al menos un epítipo de célula Th de HLA de clase II y preferiblemente también al menos un epítipo de célula T citotóxica de HLA de clase I. Preferiblemente el péptido tiene una longitud de no más de 100 aminoácidos y comprende al menos 19 aminoácidos contiguos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de la proteína de PRAME humana (es decir SEC ID nº 21), donde el péptido preferiblemente comprende al menos un epítipo de HLA de clase II y preferiblemente también al menos un epítipo de HLA de clase I, preferiblemente (pero no necesariamente) ambos de la secuencia de aminoácidos de la proteína de PRAME humana. De forma más preferible, en el péptido al menos un epítipo de HLA de clase II y al menos un epítipo de HLA de clase I están presentes dentro de una secuencia de aminoácidos contigua de la secuencia de aminoácidos de la proteína de PRAME humana.

[0022] Por el bien de la claridad, el péptido descrito preferiblemente comprende al menos un epítipo presentado en HLA de clase I y preferiblemente también al menos un epítipo presentado en HLA de clase II. Cada uno de estos epítopos son presentables y se unirán con la molécula de HLA específica correspondiente presente en las células después de haber sido procesados como se describe en este caso. Cada epítipo de HLA puede por lo tanto también ser denominado un epítipo de unión y/o presentable en HLA.

[0023] La longitud de la secuencia de aminoácidos contigua de la proteína de PRAME humana comprendida en el péptido, descrito preferiblemente es al menos 19, 20, 21, 22, 25, 27, 30, 33 o 35 aminoácidos y preferiblemente no más de 100, 80, 60, 50, 45, 40, 35, 33 o 30 aminoácidos, de forma más preferible la longitud de la secuencia de aminoácidos contigua de la proteína de PRAME humana comprendida en el péptido es 19-45, incluso de forma más preferible 30-40 aminoácidos, incluso de forma más preferible 30-35 y de la forma más preferible 33-35 aminoácidos. En otra divulgación, el péptido consiste en cualquiera de la secuencia de aminoácidos contigua de la proteína de PRAME humana tal y como se define aquí. Los péptidos de la invención pueden ser fácilmente sintetizados y son lo bastante grandes para ser aceptados por las células presentadoras de antígenos profesionales, procesados por el proteasoma y con capacidad física suficiente y longitud para contener al menos un epítipo de HLA de clase I y un epítipo de HLA de clase II. Opcionalmente un péptido puede comprender extensiones N- o C-terminales, que pueden ser aminoácidos, aminoácidos modificados u otros grupos funcionales que pueden por ejemplo mejorar la biodisponibilidad, comprensión celular, procesamiento y/o solubilidad.

[0024] Preferiblemente, el epítipo de células Th $CD4^+$ de clase II comprendido en un péptido según la invención es capaz de activar una célula Th $CD4^+$ en el paciente de cáncer en humano y/o un control saludable. La activación es preferiblemente evaluada ex vivo o in vivo, de forma más preferible en el paciente humano de cáncer cuyas células tumorales expresan el antígeno PRAME. De la forma más preferible, el epítipo de HLA de clase II es capaz de activar una respuesta de memoria Th $CD4^+$, es decir activación de una célula Th $CD4^+$ $CD45RO$ -positiva. Esto conducirá, en virtud de la

señal "licencia para matar" a través de la activación de CD40 de DC (Lanzavecchia, 1998, Nature 393:413), a una respuesta de CTL efectora y de memoria CD8⁺ más sólida.

[0025] Un péptido de la invención comprende además un epítipo de HLA de clase I. Dicho epítipo de HLA de clase I es preferiblemente C-terminalmente procesado por escisión proteasómica. Además, dicho epítipo de HLA de clase I es preferiblemente capaz de activar una respuesta de CTL CD8⁺. De la forma más preferible, la capacidad de activación de CTL ha sido demostrada ex vivo y/o in vivo, en los individuos humanos saludables de control o incluso de forma más preferible en los pacientes humanos de cáncer. Preferiblemente, en los pacientes humanos de cáncer el tumor expresa el antígeno PRAME. La presencia de tanto un epítipo de HLA de clase I como de clase II dentro de un péptido ha sido observada como particularmente ventajosa debido a la sinergia en la producción y mantenimiento de una respuesta de células de CTL eficaces (como se muestra en Zwaveling et al., 2002, J. Immunol. 169:350).

[0026] Los epítipos de HLA de clase I en los péptidos de PRAME de la invención son preferiblemente capaces de ser presentados en los alelos de HLA que son predominantes en la población de seres humanos por tratar. Epítipos de HLA de clase I preferidos en péptidos derivados de PRAME de la invención son epítipos capaces de unión a HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A68, HLA-B7, HLA-B8; HLA-A35, HLA-B60, HLA-B61 y HLA-B62. Los epítipos de CTL de HLA de clase I más preferidos son los epítipos de PRAME de unión a HLA-A2, porque HLA-A2 es altamente predominante en todas las poblaciones caucásica, negra, india americana y oriental como se indica en la tabla 1. El epítipo de HLA de clase I tiene preferiblemente una alta capacidad enlazante de péptidos ($IC_{50} < \text{aproximadamente } 5 \mu\text{M péptido}$) o al menos afinidad intermedia ($5 \mu\text{M} < IC_{50} < \text{aproximadamente } 15 \mu\text{M de péptido}$).

[0027] Según una divulgación, los péptidos tienen una longitud de no más de 100 aminoácidos y comprenden una secuencia de aminoácidos contigua de la proteína de PRAME humana seleccionada del grupo consistente en secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1-20 o seleccionada del grupo consistente en secuencias de aminoácidos SEC ID nº 6, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 1, 2, 3, 4, 13, 17, 19 y SEC ID NO:20: aa. 1-33 de la proteína de PRAME humana se representa por SEC ID nº 1, aa. 19-53 (SEC ID nº 2), aa. 47-79 (SEC ID nº 3), aa. 69-101 (SEC ID nº 4), aa. 80-114 (SEC ID nº 5), aa. 94-126 (SEC ID nº 6), aa. 112-144 (SEC ID nº 7), aa. 133-166 (SEC ID nº 8), aa. 173-207 (SEC ID nº 9), aa. 190-223 (SEC ID nº 10), aa. 234-268 (SEC ID nº 11), aa. 247-279 (SEC ID nº 12), aa. 262-294 (SEC ID nº 13), aa. 284-316 (SEC ID nº 14), aa. 295-327 (SEC ID nº 15), aa. 353-387 (SEC ID nº 16), aa. 399-431 (SEC ID nº 17), aa. 417-450 (SEC ID nº 18), aa. 447-480 (SEC ID nº 19), aa. 477-509 (SEC ID nº 20). La secuencia de aminoácidos de longitud total de la proteína de PRAME humana se da en SEC ID nº 21.

[0028] Péptidos incluso más preferidos descritos incluyen SEC ID nº 6, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, y 18, que comprenden HLA-A2 u otros epítipos de HLA de clase I predominantes. Los péptidos más preferidos dentro de este subgrupo incluyen SEC ID nº 6, 5, 8, 14, 15, 16 y 18, todos ellos comprenden un epítipo de unión HLA-A2 que ha sido demostrado para inducir CTL que reconocen el epítipo naturalmente presentado cuando es endógenamente procesado del antígeno tumoral PRAME.

[0029] Los péptidos derivados de PRAME de la invención se pueden modificar por delección o sustitución de uno o varios aminoácidos, por extensión en N- y/o C-término con aminoácidos adicionales o grupos funcionales, que pueden mejorar la biodisponibilidad, dirigiéndose a células T, o comprender o liberar sustancias de modulación inmunológica que proporcionan funciones adyuvantes o (co)estimuladoras. Los aminoácidos adicionales opcionales en el término N y/o C no están presentes preferiblemente en las posiciones correspondientes en la secuencia de aminoácidos de PRAME, de forma más preferible no proceden de la secuencia de aminoácidos de PRAME (SEC ID nº 21). El experto en la materia apreciará que secuencias de aminoácidos de PRAME de variantes alélicas humanas de origen natural de PRAME están expresamente incluidas en la invención.

[0030] Los péptidos derivados de PRAME de la invención son obtenibles por síntesis química y purificación posterior (por ejemplo véase Ejemplo 1). Los péptidos derivados de PRAME de la invención son preferiblemente solubles en soluciones acuosas fisiológicamente aceptables (por ejemplo PBS) que comprenden no más de 35, 20, 10, 5 o 0% de DMSO. En tal solución los péptidos son preferiblemente solubles en una concentración de al menos 0.5, 1, 2, 4, o 8 mg de péptido por ml. De forma más preferible, una mezcla de más de un péptido derivado de PRAME diferente de la invención es soluble a una concentración de al menos 0.5, 1, 2, 4, o 8 mg de péptido por ml en tales soluciones.

[0031] Un uso preferido de los péptidos según la invención es su uso como un medicamento, donde de forma más preferible los péptidos se usan como una vacuna o un componente activo de la misma. Cada péptido puede ser usado bien solo o preferiblemente en combinaciones de al menos uno o dos o tres o cuatro o más de cuatro péptidos de la invención, en el tratamiento y/o prevención de cáncer, para la producción de medicamentos, preferiblemente vacuna para el tratamiento o prevención de cáncer humano o enfermedad neoplásica. Estas enfermedades preferiblemente comprenden neoplasias hematológicas y tumores sólidos, donde las células cancerosas expresan el antígeno tumoral PRAME. Tal medicamento y/o vacuna antitumoral según la invención se puede utilizar para tratar pacientes que sufren de o en riesgo de desarrollar la

siguiente lista no extensa de enfermedades neoplásicas humanas que expresan PRAME: melanoma, linfoma, papilomas, carcinomas de pecho o cervicales, leucemias agudas y crónicas, meduloblastoma, carcinoma de pulmón de célula no pequeña, cáncer de cuello y de cabeza, carcinoma renal, carcinoma pancreático, cáncer de próstata, cáncer pulmonar de célula pequeña, mieloma múltiple, sarcomas y neoplasias hematológicas como leucemia mieloide crónica y leucemia mieloide aguda.

[0032] En otro aspecto, la presente invención además se refiere a composiciones que pueden ser útiles para tratamiento y/o vacunación de sujetos humanos, que comprenden al menos un péptido según la reivindicación 1 y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables, en particular adyuvantes y moduladores inmunológicos. Preferiblemente, la composición es una composición farmacéutica y/o destinada para uso como un medicamento. La composición farmacéutica está preferiblemente destinada para vacunación. La composición farmacéutica es preferiblemente usada para el tratamiento y/o prevención de cáncer, para la producción de medicamentos, preferiblemente vacuna para el tratamiento o prevención de enfermedad neoplásica o cáncer humano. Una lista no exhaustiva de enfermedades neoplásicas (cáncer) ya ha sido dada en la presente. La composición preferiblemente comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 y hasta 20 péptidos diferentes. Preferiblemente, los péptidos presentes en la composición comprenden una longitud de no más de 50 aminoácidos y comprenden una secuencia de aminoácidos contigua de la proteína de PRAME humana seleccionada del grupo consistente en secuencias de aminoácidos de SEC ID nº 1- 20 (como se enumera en la tabla 6). De forma más preferible, los péptidos presentes en esta composición se seleccionan del el subgrupo siguiente: SEC ID nº 6, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, y 18. Todos estos comprenden un HLA-A2 u otro epítipo de HLA de clase I predominante. Los péptidos más preferidos presentes en la composición de la invención se seleccionan del subgrupo siguiente: SEC ID nº 6, 5, 8, 14, 15, 16 y 18. Alternativamente, 2 o más péptidos se pueden seleccionar para encontrar los alelos de HLA del sujeto o la población de sujetos para ser tratados.

[0033] Formulación de medicamentos, vías de administración y el uso de excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen y son habituales en la técnica y por ejemplo descritos en Remington; The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition 2005, University of Sciences in Philadelphia. Composiciones farmacéuticas y medicamentos de la invención son preferiblemente formulados para ser adecuados para administración intravenosa o subcutánea, o administración intramuscular, aunque otras vías de administración pueden ser previstas, tal como administración mucosa o administración intradérmica y/o intracutánea, por ejemplo por inyección.

[0034] Está además incluido por la presente invención que la administración de al menos un péptido y/o al menos una composición de la invención se puede realizar como una única administración. Alternativamente, la administración de al menos un péptido y/o al menos una composición se puede repetir si los péptidos requeridos y/o diferentes y/o composiciones de la invención pueden ser administrados consecutivamente.

[0035] La composición farmacéuticamente aceptable según la invención puede preferiblemente comprender al menos un compuesto o adyuvante estimulador de la respuesta inmune. Ventajosamente la composición farmacéutica según la invención puede adicionalmente comprender uno o varios adyuvantes sintéticos. Estos adyuvantes se pueden mezclar con la composición farmacéutica según la invención o se pueden administrar separadamente al mamífero o humano que debe ser tratado. Particularmente preferidos son aquellos adyuvantes que se conocen por actuar a través de los receptores de tipo Toll. Compuestos de modificación inmunológica que son capaces de activación del sistema inmunológico innato, se pueden activar particularmente bien a través receptores tipo Toll (TLR), incluyendo TLR 1 - 10. Compuestos capaces de activar receptores TLR y modificaciones y derivados de los mismos están bien documentados en la técnica. TLR1 se puede activar por lipoproteínas bacterianas y formas acetiladas de las mismas, TLR2 puede además ser activado por glicolípidos bacterianos Gram positivos, LPS, LPA, LTA, fimbria, proteínas de membrana externa, proteínas de choque térmico de bacterias o del huésped, y lipoarabinomanano micobacteriano. TLR3 se puede activar por dsRNA, en particular de origen vírico, o por el compuesto químico poly(I:C). TLR4 se puede activar por LPS Gram negativo, LTA, proteínas de choque térmico del huésped o de origen bacteriano, revestimiento vírico o proteínas de envoltura, taxol o derivados del mismo, oligosacáridos que contienen hialuronano y fibronectinas. TLR5 se puede activar con flagelos bacterianos o flagelina. TLR6 se puede activar por lipoproteínas micobacterianas y factor soluble lábil al calor de Streptococcus del grupo B (GBS-F) o Staphylococcus modulins. TLR7 se puede activar por imidazoquinolinas. TLR9 se puede activar por DNA CpG no metilado o complejos de cromatina - IgG. En particular TLR3, TLR7 y TLR9 juegan un papel importante en la mediación de una respuesta inmune innata contra las infecciones víricas, y compuestos capaces de activar estos receptores son particularmente preferidos para usar en los métodos de tratamiento y en las composiciones o medicamentos según la invención. Adyuvantes particularmente preferidos comprenden, pero de forma no limitativa, compuestos sintéticamente producidos que comprenden dsRNA, poly(I:C), DNA CpG que activan receptores TLR3 y TLR9, IC31, IMSAVAC, Montanide ISA-51 (un adyuvante producido por Seppic 7, Francia). En otra forma de realización preferida, los compuestos de adyuvantes sintéticos están físicamente enlazados a los péptidos de la invención. La conexión física de adyuvantes y compuestos coestimuladores o grupos funcionales, al epítipo de HLA de clase I y de HLA de clase II que comprende péptidos proporciona una respuesta inmune mejorada por estimulación simultánea de células presentadoras de antígenos, en particular células dendríticas, que interiorizan, metabolizan y muestran antígeno.

[0036] Además, el uso de moléculas (co)estimuladoras de células presentadoras de antígenos, como se establece en WO99/61065 y en WO03/084999, en combinación con los péptidos y composiciones de la invención es preferido. En particular el uso de ligandos 4-1-BB y/o CD40, anticuerpos agonísticos o fragmentos funcionales y derivados de los mismos, al igual que compuestos sintéticos con actividad agonística similar son preferiblemente administrados separadamente o combinados con los péptidos de la invención en sujetos que deben ser tratados para estimular adicionalmente la producción de una respuesta inmune óptima en el sujeto.

[0037] Además una forma de realización preferida comprende entrega de los péptidos, con o sin estimulantes inmunológicos adicionales tales como ligandos TLR y/o anticuerpos anti CD40/anti-4-1 BB en un vehículo de liberación lenta tal como aceite mineral (por ejemplo Montanide ISA 51) o PGLA.

[0038] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los términos que siguen a la palabra están incluidos, pero términos no específicamente mencionados no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "uno" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "uno" por lo tanto normalmente significa "al menos uno".

[0039] La invención está posteriormente ilustrada por los siguientes ejemplos que no deberían ser interpretados para limitar el ámbito de la invención.

Descripción de las figuras

[0040]

Figura 1: Sitios de escisión proteasómica dentro de péptidos sintéticos de la proteína de PRAME humana según se determina por digestiones in vitro con proteasomas purificados. Sitios de escisión abundante superiores e inferiores (representados por más o menos del 5% del material digerido respectivamente) se indican por flechas en negrita y finas respectivamente.

Figura 2: Liberación enzimática N-terminal y C-terminal de PRA190-198 como se determina por análisis de digestión enzimática in vitro con extractos citosólicos y enzimas purificadas.

Figura 3: Reconocimiento específico de péptidos y células tumorales por CTL contra los epítomos de CTL derivados de PRAME como se midió en ensayos de citotoxicidad con liberación de ⁵¹Cr. Panel A, reconocimiento de epítomos presentados en HLA-A2; Panel B, reconocimiento de epítomos presentados por otras moléculas de HLA de clase I.

Figura 4: Ejemplo de integridad de epítomos predichos en fragmentos de un péptido de PRAME largo digerido por proteasoma.

^a Péptidos de unión de HLA de clase I como se determina en el ensayo de enlace de competición (ver tablas 3).

^b Fragmentos obtenidos después de la digestión con inmunoproteasoma se ordenan según sus C-terminos. AA iniciales y finales son enumerados.

^c Intensidad se expresa como % de intensidades pico de masa totales sumadas de 27-meros digeridos en un período de incubación de 1 h.

EJEMPLOS

[0041] En la presente invención, los aspectos diferentes que se requieren para la inducción de una respuesta de células T inducida por vacuna eficaz y exitosa contra las células cancerosas de expresión de PRAME en pacientes se combinan para el diseño y selección de péptidos de vacuna derivados de PRAME óptimos. Un péptido de vacuna de PRAME óptimo debería abarcar al menos uno, pero preferiblemente más, epítomo(s) de linfocitos T citotóxicos (CTL) presentados en HLA de clase I capaces de inducir una respuesta de CTL en pacientes, junto con al menos un péptido derivado de PRAME con capacidad probada para suscitar una respuesta de linfocitos Th CD4⁺. La sección experimental proporciona los parámetros requeridos para el diseño óptimo y elección de péptidos derivados de PRAME para vacunación en cuanto a secuencia y longitud/tamaño. La sección experimental divulga tanto identificación y confirmación de epítomos de CTL presentados en HLA de clase I y péptidos que inducen la reactividad de linfocitos Th CD4⁺, in vivo e in vitro, que están presentes en la proteína de PRAME de longitud total y que se pueden combinar en péptidos con una longitud óptima de 19-45 aminoácidos.

Ejemplo 1: Identificación de péptidos presentados en HLA de clase I de la producción sintética de PRAME de péptidos

[0042] Todos los péptidos usados en estos estudios fueron sintetizados por estrategias de fase sólida en un sintetizador de péptido múltiple automatizado (Abimed AMS 422) usando la química Fmoc estándar. Péptidos cortos para inducciones de CTL fueron disueltos en 20 µl de DMSO, diluidos en 0.9% de NaCl a una concentración peptídica de 1 mg/ml y almacenados

a -20 °C antes del uso. Los péptidos de referencia marcados con fluoresceína, usados en los ensayos de unión de péptido de HLA de clase I, fueron sintetizados como derivado de Cys. El marcado fue realizado con 5-(yodoacetamido)fluoresceína (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza) a pH 7.5 (Na-fosfato en agua/acetonitrilo 1:1 v/v). Los péptidos marcados fueron desalados sobre Sephadex G-10 y además purificados por C18 RP-HPLC. Los péptidos marcados fueron analizados por espectrometría de masas. Los polipéptidos de 27-meros y 22-meros usados para análisis de digestión de proteasoma in vitro y análisis de reactividad de linfocitos Th CD4⁺ fueron sintetizados como se ha descrito anteriormente, purificados por HPLC de fase inversa en un gradiente de acetonitrilo-agua y liofilizados de acetonitrilo-agua durante toda la noche. La pureza fue confirmada por espectrometría de masas.

Preselección de péptidos de PRAME para mediciones de unión de HLA de clase I

[0043] Una selección de péptidos de PRAME con una longitud de 8, 9, 10 u 11 aminoácidos con capacidad de unión potencial para las moléculas de HLA de clase I que son además predominantes fue realizada utilizando los algoritmos BIMAS de predicción de unión peptídica (http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) (Parker, et al., 1994, J. Immunol. 152:163) y SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>). Estos algoritmos informáticos buscan péptidos contenidos en la proteína de PRAME de longitud total que cumplan los motivos de unión de la molécula de HLA de clase I de interés. Las moléculas de HLA de clase I fueron elegidas con prevalencias altas o al menos moderadas en la población humana, siendo HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A68, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B35, HLA-B60, HLA-B61 y HLA-B62. Las prevalencias entre las poblaciones humanas de estas moléculas de HLA de clase I están en la tabla 1 mostrada más abajo.

[0044] Usando el algoritmo, la proteína de PRAME de longitud total fue seleccionada para péptidos con una capacidad enlazante (eficaz) predicha para las moléculas de HLA de clase I elegidas. Los péptidos PRAME (longitud 9,10 u 11 aa.) con una alta capacidad enlazante predicha fueron sintéticamente producidos para permitir la determinación experimental real de su capacidad enlazante en los ensayos de unión de HLA de clase I basados en competición. Dado que una puntuación de predicción alta para unión a una determinada molécula de clase I de HLA no está correlacionada necesariamente con la unión de alta afinidad real (como ha sido mostrado por Kessler et al., 2003, Hum Immunol. 64:245) tales mediciones de unión se requieren para la evaluación de la capacidad enlazante.

TABLA 1: Distribución de frecuencias de antígenos de HLA I expresados como porcentajes entre poblaciones mayores

HLA de clase I	Población negra	Caucásica	Oriental	Amerindia
A1	9	26	7	11
A2	29	44	47	43
A3	13	22	6	8
A11	3	13	30	4
A24	6	20	42	52
A68	18	8	3	12
B7	15	17	7	5
B8	9	14	3	2
B14	7	6	1	3
B35	11	20	10	32
B60	1	6	17	5
B61	0	6	9	23
B62	2	8	16	21

^a Frecuencias de fenotipo para los antígenos de HLA han sido deducidas utilizando las frecuencias genéticas como se da por: Marsh et al., The HLA FactsBook., 1999.

Determinación de capacidad enlazante de péptido de HLA de clase I

[0045] Para la medición experimental de capacidad enlazante de HLA de clase I, ensayos de unión celular basados en su competición de HLA de clase I fueron usados que fueron desarrollados para HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A68, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B35, HLA-B60, HLA-B61 y HLA-B62 (Kessler et al., 2003, Hum Immunol. 64:245). Células B humanas transformadas con EBV (B-LCL) fueron usadas que fueron "separadas" de sus péptidos de HLA de clase I naturalmente presentados por tratamiento de ácido moderado. B-LCL fueron cosechadas y lavadas en suero salino tamponado con fosfato (PBS) y el granulado ($2 - 15 \times 10^6$ células) fue puesto en hielo durante 5 min. La elución fue realizada incubando las células durante exactamente 90 s en tampón de ácido cítrico enfriado en hielo (1:1 mezcla de 0.263 M de ácido cítrico y 0.123 M de Na₂HPO₄, ajustados a los pH enumerados en la tabla 2). Inmediatamente después, las células fueron tamponadas con IMDM enfriado en hielo que contiene 2% de FCS lavado una vez más en el mismo medio y resuspendido a una concentración de 4×10^5 células/ml en el medio IMDM que contiene 2% FCS y 2 µg/ml de β₂-microglubulina humana (β₂M) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

[0046] Se realizaron ocho diluciones dobles en serie de cada péptido de prueba competidor en PBS/BSA 0,5% (concentración máxima 600 µM, concentración de ensayo de 6 veces). En el ensayo, péptidos de prueba fueron evaluados de 100 µM a 0,8 µM. Péptidos de referencia marcados con fluoresceína (FI) que se usan en los ensayos de competición de HLA de clase I diferentes y su fuente se enumeran en la tabla 2. Estos péptidos, que tienen alta afinidad de enlace establecida en la molécula de HLA de clase I bajo estudio, fueron disueltos en PBS/BSA 0.5% a concentración de ensayo final de 6 veces. En un pocillo de una placa de fondo en V de 96 pocillos de 25 µl de péptido de (prueba) competidor fue mezclado con 25 µl de péptido de referencia marcado con FL. Posteriormente, las B-LCL separadas fueron adicionadas a 4x10⁴/pocillo en 100 µl/pocillo. Tras la incubación durante 24 h a 4°C, las células fueron lavadas tres veces en PBS conteniendo 1% de BSA, fijadas con 0.5% de paraformaldehído, y analizadas con citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson) para medir la fluorescencia media (MF). El porcentaje de inhibición de unión de péptido de referencia marcado con FL fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$(1 - (MF_{\text{referencia + péptido competidor}} - MF_{\text{origen}}) / (MF_{\text{péptido de referencia}} - MF_{\text{origen}})) \times 100\%$$

La afinidad de enlace de péptido competidor se expresa como la concentración que inhibe el 50% de unión del péptido de referencia marcado con FL (IC₅₀). IC₅₀ fue calculada aplicando el análisis de regresión no lineal. Una IC₅₀ ≤ 5 µM fue considerada unión de afinidad alta, 5 µM < IC₅₀ ≤ aproximadamente 15 µM fue considerada unión de afinidad intermedia, aproximadamente 15 µM < IC₅₀ ≤ 100 µM fue juzgada unión de baja afinidad e IC₅₀ > 100 µM fue considerada como ninguna unión.

Tabla 2. Características de los ensayos de unión de HLA de clase I diferentes.

HLA de clase I Alelo	Péptidos de referencia usados en los ensayos			Línea celular de B-LCL usada en el ensayo	
	SEC marcada con FL.	[pep.]	Sec. Original	Nombre	Tipo de HLA de clase I
A1 (A*0101)	YLEPAC(FI)AKY	150 nM	YLEPAIAKY	CAA	A*0101; B*0801; Cw*0701
A2 (A*0201)	FLPSDC(FI)FPSV	150 nM	FLPSDFFPSV	JY	A*0201; B*0702; Cw*0702
A3 (A*0301)	KVFPC(FI)ALINK	150 nM	KVFPYALINK	EKR	A*0301; B*0702; Cw*0702
A11 (A*1101)	KVFPC(FI)ALINK	150 nM	KVFPYALINK	BVR	A*1101; B*3501; Cw*0401
A24 (A*2402)	RYLKC(FI)QQLL	150 nM	RYLKDQQLL	Vijf	A*2402; B*0702; Cw*0702
A68 (A*6801)	KTGGPIC(FI)KR	150 nM	KTGGPIYKR	A68HI	A*6801; B*4402; Cw*0704
B7 (B*0702)	APAPAPC(FI) WPL	150 nM	APAPAPSWPL	JY	A*0201; B*0702; Cw*0702
B8 (B*0801)	FLRGRAC(FI)GL	50 nM	FLRGRAYGL	Vavy	A*0101; B*0801; Cw*0701
B35 (B*3501)	NPDIVC(FI)YQY	150 nM	NPDIVYQY	BVR	A*1101; B*3501; Cw*0401
B60 (B*4001)	KESTC(FI)HLVL	125 nM	KESTLHLVL	DKB	A*2402; B*4001; Cw*0304
B61 (B*4002)	GEFGGC(FI)GSV	50 nM	GEFGGFGSV	Swei007	A*2902; B*4002; Cw*0202
B62 (B*1501)	YLGEFSC(FI)TY	150 nM	YLGEFSITY	BSM	A*0201; B*1501; Cw*0304

Resultados de los ensayos de unión de HLA de clase I

[0047] Las mediciones de unión reales revelaron que 49 péptidos PRAME (9 o 10 aa. largos) presentaron una afinidad alta o intermedia para HLA-A2 (Tabla 3a) y, como se muestra en la Tabla 3b, 93 péptidos (8-, 9-, 10-, 11- meros) tuvieron una capacidad enlazante alta o intermedia para las otras moléculas de HLA de clase I (HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A68, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B35, HLA-B60, HLA-B61 y HLA-B62). Estos péptidos con una capacidad enlazante de HLA de clase I probada fueron además analizados para su liberación enzimática de su secuencia de proteína flanqueante por escisión proteasómica utilizando los resultados del análisis de digestión de proteasoma (Figura 1). Como se enumera en la Tabla 4, este análisis permitió una selección de los péptidos que tienen (1) una capacidad enlazante de HLA de clase I de alta afinidad (2) son C-terminales generados por una escisión proteasómica y (3) son encontrados intactos en el análisis de digestión de proteasoma.

Tabla 3A. Péptidos de unión alta e intermedia HLA-A2 (*0201) de PRAME.

Inicio ^a	Secuencia ^b	Longitud ^c	Unión (IC ₅₀ ^d)
25	RLVELAGQSL	10	11.1
33	SLLKDEALAI	10	14.0
34	LLKDEALAI	9	10.2
39	ALAIAALEL	9	5.1
39	ALAIAALELL	10	9.0
47	LLPRELFPPL	10	2.1
71	AMVQAWPFTC	10	10.4
91	HLHLETFA	9	11.1
99	AVLDGLDVL	9	13.4

99	AVLDGLDVLL	10	9.4
100	VLDGLDVLL	9	5.2
100	VLDGLDVLLA	10	11.9
103	GLDVLLAQEV	10	15.2
142	SLYSFPEPEA	10	1.9
182	FLKEGACDEL	10	3.0
186	GACDELFSYL	10	10.6
190	ELFSYLIEKV	10	4.5
214	KIFAMPMQDI	10	7.2
242	CTWKLPTLA	9	9.3
248	TLAKFSPYL	9	4.6
258	QMINLRRLLL	10	4.0
284	YIAQFTSQFL	10	10.4
292	FLSLQCLQAL	10	2.5
294	SLQCLQALYV	10	3.2
300	ALiVDSLFF	9	2.7
300	ALiVDSLFFL	10	1.7
301	LiVDSLFFL	9	6.3
308	FLRGRLDQLL	10	9.6
320	VMNPLETSLI	10	8.6
326	TLSITNCRL	9	13.2
333	RLSEGDVMHL	10	6.1
350	QLSVLSLSGV	10	13.3
355	SLSGVMLTDV	10	9.9
360	MLTDVSPEPL	10	5.6
371	ALLERASATL	10	12.9
390	ITDDQLLAL	9	9.2
394	QLLALLPSL	9	2.9
410	TLSFYGNSI	9	11.0
419	SISALQSLL	9	5.7
422	ALQSLLQHL	9	14.2
422	ALQSLLQHLL	10	3.2
425	SLLQHLLGL	9	3.7
432	GLSNLTVL	9	6.8
435	NLTVLYPV	9	2.5
454	TLHLERLAYL	10	12.2
462	YLHARLRELL	10	13.3
462	YLHARLREL	9	6.2
466	RLRELLCEL	9	14.0
470	LLCELGRPSM	10	10.5

^a Posición en PRAME del aminoácido (aa.) N-terminal del péptido. Péptidos se clasifican por su aa inicial.
^b Secuencia de aa. del péptido
^c Longitud del péptido
^d IC₅₀ es la concentración de péptido necesitada para inhibir la unión de péptido de referencia marcado con FL para el 50% (IC₅₀ en μ M). Los péptidos con IC₅₀ \leq aproximadamente 15 μ M se consideran ser epítomos de CTL potenciales respecto a su afinidad de enlace.

Tabla 3B. Péptidos (no HLA-A2) de unión de afinidad alta e intermedia de HLA de clase I de PRAME.

Inicio ^a	Secuencia ^b	Longitud ^c	HLA de clase I ^d	Unión (IC ₅₀ ^e)
136	WSGNRASLY	9	HLA-A1	4.3
165	STEAQPFIL	9	HLA-A1	1.4
247	PTLAKFSPY	9	HLA-A1	8.5
267	LSHIHASSY	9	HLA-A1	1.0
275	YISPEKEEQY	10	HLA-A1	3.0
292	FLSLQCLQALY	11	HLA-A1	1.0
293	LSLQCLQALY	10	HLA-A1	2.9
294	SLQCLQALY	9	HLA-A1	2.0
302	YVDSLFFLR	9	HLA-A1	1.4
334	LSEGDVMHL	9	HLA-A1	6.3
361	LTDVSPEPLQ	10	HLA-A1	3.8

ES 2 539 812 T3

361	LTDVSPEPLQA	11	HLA-A1	3.5
390	ITDDQLLAL	9	HLA-A1	1.0
390	ITDDQLLALL	10	HLA-A1	1.5
405	CSQLTTLSFY	10	HLA-A1	<1
433	LSNITVLY	9	HLA-A1	<1
439	VLYPVPLESY	10	HLA-A1	10.9
453	GTLHLERLAY	10	HLA-A1	2.0
454	TLHLERLAY	9	HLA-A1	10.1
5	RLWGSIQSRY	10	HLA-A3	1.59
5	RLWGSIQSR	9	HLA-A3	1.13
16	SMSVWTSPR	9	HLA-A3	<1
28	ELAGQSLLK	9	HLA-A3	3.14
41	AIAALELLPR	10	HLA-A3	10.75
80	CLPLGVLMK	9	HLA-A3	<1
107	LLAQEVPRR	10	HLA-A3	14.0
118	KLQVLDLRK	9	HLA-A3	2.15
190	ELFSYLIEK	9	HLA-A3	1.42
194	YLIEKVVRK	9	HLA-A3	3.49
194	YLIEKVVRKK	10	HLA-A3	14.00
198	KVKRKKNVLR	10	HLA-A3	7.50
204	NVLRLCCKK	9	HLA-A3	13.50
205	VLRLCCKKLLK	10	HLA-A3	1.30
242	CTWKLPTLAK	10	HLA-A3	<1
255	YLGQMINLRR	10	HLA-A3	4.50
261	NLRRLLLLSH	9	HLA-A3	3.50
300	ALYVDSLFF	9	HLA-A3	8
333	RLSEGDMVH	9	HLA-A3	16.00
429	HLIGLSNLT	10	HLA-A3	4.00
432	GLSNLTVLY	10	HLA-A3	4.07
439	VLYPVPLESY	10	HLA-A3	2.67
459	RLAYLHARLR	10	HLA-A3	1.00
13	RYISMSVWTS	10	HLA-A24	5.8
52	LFPPLFMAAF	10	HLA-A24	<1
60	AFDGRHSQTL	10	HLA-A24	5.5
77	PFTCLPLGVL	10	HLA-A24	2.1
85	VLMTGQHLHL	10	HLA-A24	15
96	TFKAVLDGL	9	HLA-A24	8.6
173	IPVEVLVDLF	10	HLA-A24	<1
215	IFAMPMQDI	9	HLA-A24	1.8
251	KFSPYLGQMI	10	HLA-A24	2.5
254	PYLGQMINL	9	HLA-A24	<1
283	QYIAQFTSQF	10	HLA-A24	8.2
287	QFTSQFLSL	9	HLA-A24	1.0
301	LYVDSLFFL	9	HLA-A24	<1
307	FFLRGRLDQL	10	HLA-A24	1.8
412	SFYGNSISI	9	HLA-A24	<1
447	SYEDIHGTL	9	HLA-A24	<1
459	RLAYLHARL	9	HLA-A24	<1
461	AYLHARLREL	10	HLA-A24	<1
466	RLRELLCEL	9	HLA-A24	<1
494	TFYDPEPIL	9	HLA-A24	<1
150	EAAQPMTKK	9	HLA-A*6801	Pred.
150	EAAQPMTKKR	10	HLA-A*6801	Pred.
302	YVDSLFFLR	9	HLA-A*6801	<1
113	RPRRWKLQVL	10	HLA-B7	<1
113	RPRRWKLQVL	10	HLA-B8	<1
258	QMINLRRLLL	10	HLA-B8	1.67
259	MINLRRLL	8	HLA-B8	<1
260	INLRRLLL	8	HLA-B8	<1
462	YLHARLREL	9	HLA-B8	<1
48	LPRELFPPL	9	HLA-B*3501	<1

48	LPRELFPPPLF	10	HLA-B*3501	1.58
53	FPPLFMAAF	9	HLA-B*3501	<1
170	QPFIPVEVL	9	HLA-B*3501	2.83
173	IPVEVLVDL	9	HLA-B*3501	2.24
173	IPVEVLVDLF	10	HLA-B*3501	<1
186	GACDELFSY	9	HLA-B*3501	2.60
246	LPTLAKFSPY	10	HLA-B*3501	<1
253	SPYLGQMINL	10	HLA-B*3501	1.98
487	CPHCGDRTFY	10	HLA-B*3501	1.5
499	EPILCPCFM	9	HLA-B*3501	<1
36	KDEALIAAL	10	HLA-B60	2.91
37	DEALIAAL	9	HLA-B60	1.55
50	RELFPPPLFM	9	HLA-B60	1.48
448	YEDIHGTLHL	10	HLA-B60	<1
37	DEALIAAL	9	HLA-B61	<1
50	RELFPPPLFM	9	HLA-B61	<1
50	RELFPPPLFMA	10	HLA-B61	<1
94	LETFKAVL	8	HLA-B61	<1
89	GQHLHLETF	9	HLA-B62	2.39
300	ALYVDSLFF	9	HLA-B62	<1
316	LLRHVMNPL	9	HLA-B62	2.56
427	LQHLIGLSNL	10	HLA-B62	2.41
439	VLYPVPLESY	10	HLA-B62	1.66

^a Posición en PRAME del término N; péptidos se clasifican por molécula de HLA y posición de inicio.

^b Secuencia de aminoácidos (aa.) del péptido

^c Longitud del péptido

^d Molécula de HLA de clase I donde el péptido se enlaza

^e IC₅₀: concentración de péptido que inhibe la unión del péptido de referencia marcado con FL para el 50% (IC₅₀ en µM). Péptidos con IC₅₀ < aproximadamente 15 µM son epítomos de CTL potenciales, respecto a su afinidad de enlace. Pred., indica alta afinidad enlazante predicha, pero no evaluada.

Ejemplo 2: Determinación de sitios de escisión proteasómica en PRAME de longitud completa Materiales y Métodos de análisis de escisión mediada por proteasoma in vitro

- 5 [0048] Proteasomas 20S fueron purificados de una línea celular de B-LCL como se describe por Groettrup et al. (J.Biol.Chem. 270:23808-23815.;1995). Este tipo de células se conoce por contener inmunoproteasomas. Alto contenido de LMP2 y 7 fue confirmado por 2-D inmunoblot. Para valorar la cinética, digestiones fueron realizadas con periodos de incubación diferentes. Péptidos (27 meros, 20 µg) fueron incubados con 1 µg de proteasoma purificado a 37°C durante 1 h, 4 h y 24 h en tampón de digestión de proteasoma de 300 µl como se describe (Eggers, et al. 1995. J. Exp. Med. 182:1865)).
- 10 Ácido trifluoroacético se añadió para detener la digestión y las muestras fueron almacenadas a -20°C antes del análisis espectrométrico de masas.

- 15 [0049] Espectrometría de masas por ionización de electrospray fue realizada en un espectrómetro de masa cuadrupolar híbrido de tiempo de vuelo, un Q-TOF (Micromasa), equipado con una interfaz de nanoelectrospray en línea con una velocidad de flujo aproximada de 250 nL/min. Se realizaron inyecciones con un automuestreador HPLC micro/nano dedicado, los FAMOS (LC Packings). Soluciones de digestión fueron diluidas cinco veces en agua-metanol-ácido acético (95:5:1; v/v/v), y retenidas en la precolumna (MCA-300-05-C8; LC Packings) en agua-metanol-ácido acético (95:5:1, v/v/v). El lavado de la precolumna fue realizado durante 3 min para eliminar los tampones presentes en los digeridos. Posteriormente, los analitos retenidos fueron eluidos con un gradiente pronunciado yendo del 70% B al 90% B en 10 min, con un flujo de 250 nL/min (A: agua-metanol-ácido acético (95:5:1, v/v/v); B: agua-metanol-ácido acético (10:90:1, v/v/v)). Este bajo índice de elución permite unos pocos experimentos MS/MS adicionales si es necesario durante la misma elución. Espectros de masas fueron registrados de masa 50-2000 Da cada segundo. La resolución permite la determinación directa de la masa monoisotópica, también de múltiples iones cargados. Los picos en el espectro de masa fueron buscados en el péptido precursor digerido usando el software Biolynx/proteins (Micromass). La intensidad de los picos en los espectros de masas fue usada para establecer las cantidades relativas de péptidos generados por digestión de proteasoma.
- 25

Resultados de análisis de escisión mediada por proteasoma in vitro

- 30 [0050] Veintinueve péptidos de PRAME superpuestos (en su mayoría 27-meros) que cubren casi toda la secuencia de aa. de PRAME, fueron digeridos in vitro con proteasomas 20S purificados. Intervalos de digestión fueron 1 h, 4 h y 24 h. El análisis espectrométrico de masas de los fragmentos de digestión revelaron sitios de escisión proteasómica abundantes y

poco abundantes en los péptidos de PRAME digeridos.

[0051] La Figura 1 muestra sitios de escisión mayores (representados por más del 5% del material digerido) y poco abundantes (representado por menos del 5% del material digerido) que fueron descubiertos tras la incubación de los péptidos sintéticos indicados con proteasoma purificado durante 1 hora. Este punto temporal refleja la actividad enzimática fisiológica de una forma más fiable.

[0052] La identificación de los fragmentos de péptido generados por escisión proteasómica in vitro fue usada para valorar la generación C-terminal de los péptidos de unión de HLA de clase I (Tabla 3a, 3b) de afinidad alta e intermedia por un lado y la presencia del epítipo como un fragmento intacto después de la escisión proteasómica por otro lado. La Figura 4 muestra un ejemplo de un péptido de unión que se encuentra intacto después de la escisión proteasómica, que representa un epítipo que es muy propenso a que ocurra in vivo y ejemplo de un péptido de unión que no es retenido intacto después de la escisión proteasómica y por lo tanto menos propenso a ser encontrado in vivo. Los péptidos de PRAME que presentan capacidad enlazante de HLA de clase I de afinidad alta o intermedia y que fueron encontrados como fragmento intacto con el C-terminal correcto después de la escisión proteasómica in vitro se enumeran en la tabla 4. Esta selección de péptidos es producida muy posiblemente intracelularmente y naturalmente presentados en las moléculas de HLA de clase I en la superficie celular de células tumorales, y por tanto se prefieren para inducir respuestas de CTL en pacientes.

Tabla 4. Péptidos de unión de HLA de clase I de PRAME que están presentes como fragmento intacto con el término C correcto después de escisión proteasómica.

Inicio ^a	Final	Secuencia de aa. ^b	HLA de clase I ^c	Generación C-term. ^d	Intacto en fragmento ^e
16	24	SMSVWTSPR	HLA-A3	Ver Ej. 3 (Nota ^f)	NT
33	42	SLLKDEALAI	HLA-A2	++	+
34	42	LLKDEALAI	HLA-A2	++	+
36	45	KDEALAI AAL	HLA-B60	++	ND
37	45	DEALAI AAL	HLA-B60	++	ND
37	45	DEALAI AAL	HLA-B61	++	ND
48	57	LPREIFPPLF	HLA-B*3501	+	ND
50	58	RELFPPLFM	HLA-B60	++	+
50	58	RELFPPLFM	HLA-B61	++	+
50	59	RELFPPLFMA	HLA-B61	++	+
52	61	LFPPLFMAAF	HLA-A24	++	ND
53	61	FPPLFMAAF	HLA-B*3501	++	ND
60	69	AFDGRHSQTL	HLA-A24	+	+
77	86	PFTCLPLGVL	HLA-A24	++	+
89	97	GQHLHLETF	HLA-B62	++	+
94	101	LETFKAVL	HLA-B61	++	+
99	108	AVLDGLDVLL	HLA-A2	++	+
100	108	VLDGLDVLL	HLA-A2	++	+
113	122	RPRRWKLQVL	HLA-B7	+	+
113	122	RPRRWKLQVL	HLA-B8	+	+
142	151	SLYSFPEPEA	HLA-A2	++	+
150	158	EAAQPMTKK	HLA-A*6801	Ver Ej. 3 (Nota ^f)	NT
150	159	EAAQPMTKKR	HLA-A*6801	Ver Ej. 3 (Nota ^f)	NT
170	178	QPFIPVEVL	HLA-B*3501	++	ND
190	198	ELFSYLIEK	HLA-A3	Ver Ej. 3 (Nota ^f)	+
248	256	TLAKFSPYL	HLA-A2	+	+
254	262	PYLGQMINL	HLA-A24	+ / ver Ej. 3 (Nota ^f)	+
253	262	SPYLGQMINL	HLA-B*3501	+ / ver Ej. 3 (Nota ^f)	+
259	266	MINLRRL	HLA-B8	+	+
258	267	QMINLRRL	HLA-A2	+	+
258	267	QMINLRRL	HLA-B8	+	+
260	267	INLRRL	HLA-B8	+	+
283	292	QYIAQFTSQF	HLA-A24	++	+
284	293	YIAQFTSQFL	HLA-A2	++	+
287	295	QFTSQFLSL	HLA-A24	++	ND
300	308	ALYVDSLFF	HLA-A2	+	+
300	308	ALYVDSLFF	HLA-A3	+	+
300	308	ALYVDSLFF	HLA-B62	+	+
300	309	ALYVDSLFFL	HLA-A2	++	+
301	309	LYVDSLFFL	HLA-A2	++	+

301	309	LYVDSLFFL	HLA-A24	++	+
326	334	TLSITNCRL	HLA-A2	++	+
334	342	LSEGDVMHL	HLA-A1	+	+
333	342	RLSEGDVMHL	HLA-A2	+	+
361	370	LTDVSPEPLQ	HLA-A1	+	+
361	371	LTDVSPEPLQA	HLA-A1	+	+
371	380	ALLERASATL	HLA-A2	++	+
390	399	ITDDQLLALL	HLA-A1	+	+
410	418	TLSFYGNSI	HLA-A2	++	+
412	420	SFYGNSISI	HLA-A24	++	+
425	433	SLLQHLIGL	HLA-A2	++	+
427	436	LQHLIGLSNL	HLA-B62	+	+
429	438	HLIGLSNLT	HLA-A3	+	+
439	448	VLYPVPLESY	HLA-A1	+	+
439	448	VLYPVPLESY	HLA-A3	+	+
439	448	VLYPVPLESY	HLA-B62	+	+
459	467	RLAYLHARL	HLA-A24	++	+
462	470	YLHARLREL	HLA-A2	+	+
461	470	AYLHARLREL	HLA-A24	+	+
462	470	YLHARLREL	HLA-B8	+	+
462	471	YLHARLRELL	HLA-A2	+	+

^a Posición en PRAME del N-término del epítipo presentado. Los péptidos se clasifican por aa. inicial

^b Secuencia de aa. del péptido.

^c Molécula de HLA de clase I donde se enlaza el péptido.

^d Generación de término C del epítipo después de 1 h de digestión: clasificación: abundante (++) presente para > 5%, poco abundante (+) presente para < 5%.

^e Epítipo intacto encontrado en los fragmentos de digestión después de 1 h de digestión: (+), presente; (-), no presente; (ND), no pudieron ser determinados debido a extremidades artificiales de los péptidos de entrada sintéticos; (NT), no evaluado, pero predichos por ser abundantemente hechos por Nardilisina.

^f El término C de PRA(190-198) se genera por una vía de escisión no proteasómica, implicando primero Nardilisina y posteriormente oligopeptidasa Thimet (TOP) como se explica en el Ejemplo 3 y Fig. 2. Los términos C de PRA(16-24), PRA(150-158), PRA(150-159), PRA(253-262) y PRA(254-262) son predichos por ser hechos directamente por un sitio de escisión abundante de Nardilisina. Los dos últimos péptidos (PRA(253-262), y PRA(254-262)) fueron, además, experimentalmente mostrados por ser generados por una escisión proteasómica en su término C.

Ejemplo 3: Escisiones no proteasómicas se requieren para generar el término C del epítipo de PRAME 190-198 de CTL presentado en HLA-A3- independiente del proteasoma

5 [0053] Algunos epítipos de CTL ocasionales, en su mayoría con un residuo básico en su término C, requieren escisiones no proteasómicas, por enzimas adicionales, para liberar su término C (Tenzer et al., 2005; Cell. Mol. Life Sci 62:1025 y Seifert et al., 2003, Nat. Immunol. 4:375)). La presente invención incluye un tal epítipo de CTL, posición 190-198 en PRAME con la secuencia de aa. ELFSYLIEK, cuyo término C se genera independientemente del proteasoma por dos escisiones consecutivas de Nardilisina (EC 3.4.24.61) y oligopeptidasa Thimet (TOP; EC 3.4.24.15)..

10 [0054] Además de su implicación en la producción del epítipo ELFSYLIEK, Nardilisina fue predicha para producir eficazmente por una escisión directa los términos C del péptido de unión de HLA-A3 PRA¹⁶⁻²⁴ (SMSVWTSPP), los péptidos de unión de HLA-A68 PRA¹⁵⁰⁻¹⁵⁸ y PRA¹⁵⁰⁻¹⁵⁹ (EAAQPMTKK y EAAQPMTKKR), el péptido de unión de HLA-A24 PRA²⁵⁴⁻²⁶² y el péptido de unión de HLA-B*3501 PRA²⁵³⁻²⁶². Los últimos dos péptidos (PRA²⁵⁴⁻²⁶² y PRA²⁵³⁻²⁶²) fueron C-terminalmente realizados también por una escisión proteasómica (como se indica en la Tabla 4).

Material y métodos y resultados de la determinación de la generación enzimática del término N y término C de PRAME¹⁹⁰⁻¹⁹⁸

20 [0055] Preparaciones purificadas de proteasoma, Nardilisina y oligopeptidasa Thimet (TOP) en una concentración de 20 nM, fueron usadas para digerir en un sistema libre de células péptidos sintéticos (a una concentración de 20 uM) de 27-mero (PRA¹⁸²⁻²⁰⁸), 19-mero (PRA¹⁹⁰⁻²⁰⁸), 13-mero (PRA¹⁹⁰⁻²⁰²), 12-mero (PRA¹⁹⁰⁻²⁰¹) y 11-mero (PRA¹⁹⁰⁻²⁰⁰) circundando el epítipo de CTL presentado en HLA-A3 ELFSYLIEK (PRA¹⁹⁰⁻¹⁹⁸) con sus regiones flanqueantes naturales. Como se resume en la Fig. 2, este análisis de digestión comprensivo reveló que el término N de PRA¹⁹⁰⁻¹⁹⁸ es eficazmente liberado por un sitio de escisión proteasómica. No obstante, a diferencia de la gran mayoría de epítipos de CTL, la liberación del término C requirió una primera escisión por Nardilisina, generando los péptidos precursores de epítipos de 11-mero, 12-mero y 13-mero PRA^{190-200,190-201,190-202}, seguido de otra degradación mediada por TOP de los péptidos precursores de 11-, 12- y 13-mero al epítipo ELFSYLIEK de 9-mero mínimo.

[0056] Además, experimentos de reconocimiento funcional que utilizan el clon de CTL que reconoce el epítipo ELFSYLIEK (ver Fig. 3) de células diana (PRAME y HLA-A3 positivo) con niveles suprimidos de bien Nardilisina o TOP (por metodología de interferencia de ARN) confirmó que estas dos enzimas fueron crucialmente requeridas para la generación del epítipo de CTL 9-mero ELFSYLIEK PRA¹⁹⁰⁻¹⁹⁸ en células vivas (datos no mostrados).

[0057] Debido a la proximidad del motivo de unión de HLA-A3 a aquel de HLA-A11, este epítipo nuevo es también reivindicado como un epítipo nuevo presentado por HLA-A11. Células diana que expresaban HLA-A11 y PRAME fueron específicamente reconocidas por los CTL anti-ELFSYLIEK (datos no mostrados).

Ejemplo 4: Determinación de inmunogenicidad y producción endógena de los linfocitos de epítopos de CTL identificados

[0058] El análisis de la inmunogenicidad fue realizado para un subconjunto de los epítopos putativos identificados de CTL presentados de HLA de clase I. La inmunogenicidad fue determinada por inducciones in vitro de CTL contra los epítopos de CTL sintéticamente producidos. Además, los CTL (clones) que fueron generados han sido evaluados por su capacidad para reconocer células tumorales que coexpresan PRAME y la molécula de HLA de clase I correcta.

[0059] Cultivos en masa de CTL fueron inducidos contra los siguientes epítopos de CTL derivados de PRAME de unión de HLA de clase I seleccionados. Los péptidos PRA¹⁰⁰⁻¹⁰⁸ (VLDGLDVLL), PRA¹⁴²⁻¹⁵¹ (SLYSFPEPEA), PRA³⁰⁰⁻³⁰⁹ (ALYVDSLFFL), PRA³⁷¹⁻³⁸⁰ (ALLERASATL), y PRA⁴²⁵⁻⁴³³ (SLLQHLIGL) fueron elegidos porque estos péptidos son epítopos de CTL predichos presentados en HLA-A2. Además, CTL fueron inducidos contra PRA¹⁹⁰⁻¹⁹⁸ (ELFSYLIEK), que es un epítipo de CTL presentado en HLA-A3, PRA¹¹³⁻¹²² (RPRRWKLQVL), que es un epítipo presentado en HLA-B7, y PRA258-267 (QMINLRRLLL), previsto como un epítipo de CTL expresado en HLA-B8.

Procedimiento de generación in vitro de clones de CTL y ensayos de CTL funcionales

[0060] Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para inducciones de CTL fueron obtenidas por el método Ficoll-Paque de sangre de donantes sanos. Para usar óptimamente todas las APC presentes en PBMC desarrollamos un sistema de cultivo que produce una mezcla de células B activadas y DC madura para usarse como APC durante el paso de inducción primaria. PBMC fueron separadas en una fracción de células T y una fracción que contiene células B y monocitos por rosetas de SRBC. La fracción de células T fue crioconservada. La mezcla de monocitos y células B fue cultivada en placas de 24 pocillos a una concentración de 1×10^6 células/pocillo en el medio de cultivo completo que contiene 800 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4 (PeproTech Inc.) y 500 ng/ml CD40 mAb (clon B-B20; Serotec) durante 6 días. Este sistema de cultivo consiguió un efecto triple: i) diferenciación inducida por GM-CSF e IL-4 de monocitos en células dendríticas inmaduras, ii) IL-4 y CD40 mAb provocaron activación y proliferación de células B (Schultze, et al. 1997, J Clin. Invest. 100: 2757) e iii) maduración mediada por CD40 mAb de células dendríticas inmaduras (Cella, et al. 1996. J Exp Med 184:747). En el día 3, citocinas y CD40 mAb fueron repuestos. Para promover más la capacidad de inducir CTL, la mezcla de APC fue cultivada durante 2 días adicionales con 0,4 ng/ml de LPS (Difco Labs), 500 U/ml IFN (Boehringer Mannheim) y 500 ng/ml CD40 mAb. En el día 8 la mezcla de APC fue impulsada con 50 µg/ml de péptido (cada péptido separadamente) durante 4 h a RT, irradiada (30 Gy) y lavada para eliminar péptido libre. La fracción de células T autóloga crioconservada + fue descongelada y reducida de células T CD4 usando perlas magnéticas (Dynal). La inducción primaria fue realizada en placas de 96 pocillos de fondo en U. APC a una concentración de 10.000/pocillo fueron cocultivadas con 50.000 + células T CD8/pocillo en el medio de cultivo, que contiene 10% de suero humano agrupado (HPS), 5 ng/ml IL-7 (PeproTech) y 0,1 ng/ml IL-12 (Sigma). En el día 7 después de la iniciación de la inducción los microcultivos de CTL fueron cosechados (agrupados), lavados y reestimulados a una concentración de 40.000 células respondedoras/pocillo de platos de 96 pocillos de fondo en U en el medio de cultivo que contiene 10% de HPS, 5 ng/ml IL-7 y 0,1 ng/ml IL-12. Células B autólogas activadas, generadas a través del protocolo descrito por Schultze et al. (1997, J Clin. Invest. 100:2757), irradiadas (75 Gy) e impulsadas con péptidos (50 µg/ml) durante 4 h a RT en el medio de cultivo que contiene 2% de FCS y 3 µg/ml de β_2 -microglubulina (Sigma) después de elución de ácido moderada para eliminar péptidos naturalmente presentados de las moléculas de MHC I (ver material y métodos de ensayo de enlace MHC), fueron usados a una concentración de 10.000 células/pocillo como reestimulador APC. Reestimulaciones fueron repetidas en el día 14 y 21 de una manera similar, con la excepción de IL-7 siendo sustituido por 20 IU/ml 1L-2 (Chiron Corp.). En el día 29, el cultivo en masa de CTL fue clonado por procedimientos de dilución limitante estándar. Clones de CTL fueron mantenidos por una estimulación específica cada 7 a 12 días usando una mezcla alimentadora consistente en PBMC alogénica y B-LCL en el medio de cultivo que contiene 10% de FCS, 1.5% de leucoaglutinina (Sigma) y 240 IU/ml de IL-2.

[0061] Para análisis funcional de la capacidad de CTL para matar células diana cargadas de péptidos o células diana tumorales unos ensayos de liberación de cromo estándares fueron usados. Después del marcado con ⁵¹Cr (1 h), células diana (2000/pocillo) fueron adicionadas a varios números de células efectoras en un volumen final de 100 µl de medio de cultivo completo en placas de 96 pocillos de fondo en U. Después de 4 h de incubación a 37°C los sobrenadantes fueron cosechados. El % medio de lisis específica de pocillos triplicados fue calculado según: (liberación Experimental - liberación

espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea) x 100%.

Resultados del análisis de inmunogenicidad y reconocimiento funcional de células tumorales por CTL.

5 [0062] Los 8 péptidos que fueron elegidos para inducciones de CTL in vitro, que son PRA¹⁰⁰⁻¹⁰⁸ (HLA-A2), PRA¹⁴²⁻¹⁵¹ (HLA-A2), PRA³⁰⁰⁻³⁰⁹ (HLA-A2), PRA³⁷¹⁻³⁸⁰ (HLA-A2), PRA⁴²⁵⁻⁴³³ (HLA-A2), PRA¹⁹⁰⁻¹⁹⁸ (HLA-A3), PRA¹¹³⁻¹²² (HLA-B7) y PRA²⁵⁸⁻²⁶⁷ (HLA-B8), fueron todos capaces de inducir cultivos de CTL en masa que reconocieron muy específicamente el péptido inductor cuando se cargaron en la molécula de HLA de clase I correcta expresada en células diana de B-LCL (datos no mostrados). Posteriormente, estos cultivos en masa de CTL fueron clonados por dilución limitante, y clones de CTL fueron generados.

10 [0063] Los clones de CTL reconocieron eficazmente los epítomos de CTL contra los cuales fueron elevados, bien como péptido sintético exógenamente cargado (Fig 3A y 3B, paneles superiores) o como epítomo de CTL endógenamente producido y naturalmente expresado presentado en células tumorales (Fig 3A y 3B, paneles inferiores). Por lo tanto, los péptidos presentados en HLA-A2 (Fig 3A) y los péptidos presentados en HLA-A3, HLA-B7 y HLA-B8 (Fig 3B) son epítomos de CTL genuinos. Estos datos confirman la inmunogenicidad de estos 8 epítomos de CTL, comprueban su expresión en la superficie celular, y muestran la exactitud de nuestras predicciones de epítomo de CTL. Esto indica que todos los epítomos de CTL predichos identificados (como se enumeran en la Tabla 4) son muy posiblemente objetivos expresados en células tumorales y se adecuan para la inducción de respuestas de CTL en pacientes con cánceres positivos en PRAME que expresan las moléculas correctas de HLA de clase I.

Ejemplo 5: determinación de reactividad de células auxiliares T CD4⁺ contra los péptidos de unión de HLA de clase II en PRAME

25 [0064] Para la inducción y mantenimiento óptimos de una respuesta de CTL de CD8⁺ antitumoral inducida por vacuna, capaz de erradicación de células tumorales que expresan PRAME, la inducción de una respuesta de Th CD4⁺ concurrente es requerida (por ejemplo Bourgeois, et al, 2002. Eur.J.Immunol. 32:2199; Kumaraguru, et al, 2004. J.Immunol. 172:3719; Janssen, et al, 2003. Nature 421:852; Hamilton, et al, 2004. Nat.Immunol. 5:873)). El mecanismo primario que contribuye a este fenómeno es la ayuda proporcionada por la población de células T auxiliar CD4⁺ en la maduración de células presentadoras de antígenos profesionales - células principalmente dendríticas (DC) - a través de la interacción CD40 con el ligando CD40, que se denomina "modelo de comercialización" (Schoenberger, et al., 1998. Nature 393:480; Lanzavecchia. 1998. Nature 393:413)). Diferentes líneas de evidencia han mostrado que sin tal respuesta de Th CD4⁺ la respuesta de CD8⁺ no es inducida o es inducida solo de forma subóptima y el mantenimiento y retirada de la respuesta de células T CD8⁺ de memoria es comprometida (Belz, et al., 2002. J.Virol. 76:12388)). Es crucial, por lo tanto, identificar los péptidos de unión de HLA de clase II en la proteína PRAME que son capaces de inducir células Th CD4⁺. Estos péptidos PRAME fueron identificados utilizando dos ensayos de selección diferentes. Tanto la proliferación de células Th CD4⁺ e IFN γ producidos por células Th fueron usadas para valorar la reactividad contra un panel de 51 péptidos de PRAME superpuestos con una longitud necesitada para unión de HLA de clase II (péptidos de 22-mero o 27-mero). Primero, las moléculas de HLA de clase II que han predicho la capacidad enlazante para estos péptidos de PRAME superpuestos fueron identificadas.

Determinación en silico de perfil de unión de HLA de clase II de polipéptidos superpuestos (27-mero o 22-mero) derivados de PRAME

45 [0065] Unión de péptidos de HLA de clase II es menos rigurosa que la unión de HLA de clase I. La unión de péptidos en HLA de clase II es al menos de 13 aa. de largo y puede ser mucho más larga debido a que la extremidad abierta de la ranura de unión de HLA de clase II permite que los péptidos unidos a las moléculas de clase II se extiendan más allá de la ranura a ambas extremidades. Por lo tanto, los requisitos de longitud de péptidos de unión de HLA de clase II son mucho más flexibles que los requisitos de unión de péptidos en las moléculas de HLA de clase I. Además, y de acuerdo con esto, la unión de péptidos en HLA de clase II es más promiscua que la unión en HLA de clase I. Frecuentemente un polipéptido de una longitud de 13 a 25 aa. tiene la capacidad para enlazar en múltiples moléculas de HLA de clase II. La ventaja de estas características de unión de péptidos flexibles de moléculas de HLA de clase II es que los ensayos de unión experimentales reales son mucho menos necesitados para verificar la unión de péptidos predichos.

50 [0066] Para la predicción de unión de HLA de clase II se usó un algoritmo que está libremente disponible en Internet. Este algoritmo es "ProPred" (en: <http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>) (ver Singh et al, 2001, Bioinformatics 17:1236). Usando este algoritmo, los 51 péptidos superpuestos fueron seleccionados para la existencia de motivos de unión para las moléculas de HLA de clase II diferentes y los resultados fueron analizados. Como se muestra en la tabla 5A, todos los péptidos superpuestos que fueron evaluados para la reactividad de células T CD4⁺ tuvieron una capacidad enlazante eficaz predicha para múltiples moléculas de HLA de clase II (corte usado: los cinco mejores péptidos de unión predichos de PRAME de longitud total para cada alelo de clase II).

Tabla 5A. Capacidad enlazante de HLA de clase II de 51 péptidos de PRAME superpuestos

Pep.No.	Péptidos de PRAME superpuestos (posición y longitud)			Moléculas de HLA de clase II para las cuales el péptido ha predicho capacidad enlazante (marcado con el símbolo X)													
	Inicio	Final	Longitud	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR7	DR8	DR9	DR51	DR52	DR53	DQ2	DQ3	DQ4
1	1	27	27	X	X	X	X		X	X	X	X					X
2	15	36	22	X		X		X	X	X		X	X				
3	19	45	27	X		X	X	X	X	X		X	X		X	X	
4	31	52	22	X		X	X		X	X		X			X	X	
5	37	63	27	X		X	X		X	X		X		X	X	X	
6	48	69	22			X	X								X	X	
7	53	79	27		X		X					X				X	
8	66	87	22	X	X		X			X		X					
9	70	96	27	X			X			X		X				X	
10	84	110	27	X	X		X			X			X		X	X	
11	95	121	27	X	X	X	X			X		X	X	X	X	X	
12	98	124	27	X		X	X		X	X		X	X	X	X	X	
13	110	131	22	X		X	X	X	X	X				X	X	X	
14	116	142	27					X	X		X				X	X	
15	124	145	22	X	X		X				X	X			X	X	
16	133	159	27	X	X	X	X					X			X		
17	146	172	27				X				X	X		X			
18	158	184	27				X	X	X		X	X	X				
19	173	199	27					X		X					X	X	
20	181	207	27	X	X		X			X		X	X			X	
21	194	220	27	X	X	X	X			X		X	X			X	
22	205	231	27	X		X	X		X	X		X	X	X		X	
23	217	238	22			X	X		X	X		X		X		X	
24	222	248	27		X	X	X		X	X				X		X	
25	234	255	22		X	X	X		X	X						X	
26	239	265	27		X	X	X		X		X	X	X			X	
27	247	273	27	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X			
28	256	277	22	X	X	X	X		X	X		X	X	X			X
29	262	288	27	X	X	X	X			X				X		X	X
30	276	302	27	X		X	X	X	X			X			X	X	X
31	290	316	27	X	X	X	X	X	X	X			X		X	X	X
32	300	326	27			X	X		X	X				X			X
33	311	337	27	X			X		X		X	X		X			
34	323	349	27			X	X		X	X						X	X
35	333	354	22	X		X	X	X	X							X	X
36	338	364	27	X		X	X	X	X	X	X					X	X
37	353	379	27	X		X	X	X		X	X			X	X	X	
38	359	385	27	X		X	X	X		X				X	X	X	
39	372	398	27	X		X	X			X	X					X	
40	384	410	27		X	X	X							X		X	

Procedimiento para ensayo de proliferación de células T CD4⁺ y ensayo ELISPOT de IFN γ de células T CD4⁺

[0067] Para el ensayo de proliferación de células T CD4⁺, PBMC total (1,5x10⁵ células/pocillo), bien obtenidos de donantes sanos o pacientes con un cáncer positivo de PRAME, fueron sembrados en 8 pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo en U en el medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero autólogo y 10 μ g/ml de 51 péptidos de PRAME 27-mero o 22-mero superpuestos. En el día 6, 50 μ l de 3H-timidina (1 mCi/50 ml) fue añadido y en el día 7 la incorporación de 3H-timidina fue medida.

[0068] Para el ensayo ELISPOT de IFN γ , células CD45RO⁺ fueron aisladas de PBMC usando perlas magnéticas CD45RO de Miltenyi Biotec. Posteriormente, células CD45RO⁺ (y CD45RO-negativas) fueron sembradas en 10 pocillos de una placa de 24 pocillos (2-3x10⁶ células/pocillo) junto con PBMC irradiadas autólogas en una proporción de 4:1 en el IMDM con 10% de suero humano agrupado suplementado con 10 mezclas de péptido de 5 péptidos diferentes cada uno del panel de 51 péptidos superpuestos de PRAME de 27-mero o 22-mero. La concentración peptídica de cada péptido fue 5 μ g/ml, y IL-2 (150 IU/ml) fue añadido en el día 2. En el día 10, los cultivos estimulados por péptidos CD45RO fueron contados y sembrados en placas ELISPOT de IFN γ junto con PBMC irradiadas autólogas en una proporción de 1:1 por triplicado en ausencia de péptido o en presencia de 5 μ g/ml de los péptidos separados n° 1 a n° 51.

Resultados de reactividad de células T CD4⁺ contra el panel de 51 péptidos de PRAME 27-mero/22-mero

[0069] El análisis de reactividad de células Th CD4⁺ contra 51 péptidos de PRAME superpuestos en la sangre periférica de 8 donantes sanos y 7 pacientes con cáncer positivos en PRAME, revelaron que 28 de los 51 péptidos indujeron la producción de IFN γ por células Th CD4⁺ y 36 péptidos indujeron la proliferación de células Th CD4⁺ (Tabla 5B).

Tabla 5B: Reactividad de 51 péptidos de PRAME superpuestos de unión de HLA de clase II.

Pept. No.	posición y longitud de Pept.			IFN producido por células Th CD4 ⁺			Proliferación de células Th CD4 ⁺
	Inicio	Final	Longitud	Fracción de memoria en donantes sanos	Fracción de memoria en pacientes	Fracción ingenua (en donantes sanos)	
1	1	27	27	+	+		+
2	15	36	22	+	+		+
3	19	45	27	+			+
4	31	52	22				+
5	37	63	27				+
6	48	69	22	+			+
7	53	79	27	+			+
8	66	87	22	+		+	+
9	70	96	27	+		+	+
10	84	110	27	+	+		+
11	95	121	27				+
12	98	124	27	+			+
13	110	131	22	+	+	+	+
14	116	142	27	+			+
15	124	145	22	+			
16	133	159	27	+			+
17	146	172	27				
18	158	184	27				
19	173	199	27				+
20	181	207	27	+	+		+
21	194	220	27	+	+		
22	205	231	27	+	+	+	
23	217	238	22				+
24	222	248	27	+			+
25	234	255	22	+			+
26	239	265	27				+
27	247	273	27	+			+
28	256	277	22	+	+		+
29	262	288	27	+	+		
30	276	302	27				+

31	290	316	27				+
32	300	326	27				+
33	311	337	27				+
34	323	349	27				+
35	333	354	22				+
36	338	364	27				
37	353	379	27		+		+
38	359	385	27				
39	372	398	27				
40	384	410	27				
41	395	416	22				+
42	399	425	27	+			+
43	412	433	22				+
44	415	441	27				
45	424	450	27	+			+
46	434	455	22	+			
47	442	463	22				
48	447	473	27	+			+
49	460	486	27	+			+
50	473	499	27				
51	483	509	27		+		

Ejemplo 6: selección de péptidos de vacuna que cumplen la mayoría de requisitos de vacuna

5 [0070] Una composición inductora de células T óptima y definida, que comprende uno o varios péptidos derivados de PRAME, induciendo una respuesta inmune contra los tumores positivos en PRAME deben inducir tanto una respuesta de CTL CD8⁺ restringida a HLA de clase I y, simultáneamente, una respuesta auxiliar de T CD4⁺ restringida de HLA de clase II. La respuesta de células Th se requiere para mejorar la inducción y para mantener la respuesta de CTL.

10 [0071] Además, debido al polimorfismo extenso de las moléculas de HLA, una vacuna óptima necesita ser diseñada para tener una cobertura de haplotipo de HLA ancho que permite un uso de esta vacuna para una población potencial grande de sujetos. Además, la vacuna debería ser adecuada para un porcentaje alto de pacientes individuales con cánceres positivos en PRAME. Por lo tanto, una composición de vacuna según esta invención contiene múltiples epítomos de CTL de PRAME que se presentan en diferentes moléculas de HLA de clase I con una prevalencia alta en la población. Debido al grado alto de unión promiscua en las moléculas de HLA de clase II, este requisito es menos estrictamente requerido para péptidos inductores de células T CD4⁺ auxiliares. La identificación de epítomos de CTL, como se resume en la Tabla 4, y epítomos auxiliares T CD4⁺, como se enumera arriba en la Tabla 5A y 5B, permitió el diseño de péptidos de vacuna para ser contenidos en una vacuna definida para cánceres positivos en PRAME.

20 [0072] La composición de vacuna comprende péptidos derivados de PRAME de 30 - 35 aa. de longitud, porque diferentes ventajas se asocian con péptidos de este tamaño. Tal como se ha mencionado anteriormente, tales péptidos son en principio fáciles de sintetizar. Además, tienen longitud suficiente para contener tanto epítomos de CTL presentados en HLA de clase I y epítomos auxiliares T presentados en HLA de clase II. Finalmente, es de gran importancia que los péptidos de esta longitud necesitan ser procesados por células presentadoras de antígenos profesionales, en particular células dendríticas, antes de que los epítomos (ambos CTL y T auxiliar) se puedan presentar por la célula presentadora de antígenos (Zwaveling, et al, 2002. J.Immunol. 169:350)). Como consecuencia, la presentación en células presentadoras de antígenos no profesionales y extensión sistémica a través del organismo no ocurrirá, y por lo tanto, la inducción de tolerancia, que ha sido observada después de la vacunación con epítomos de CTL presentados en HLA de clase I mínimos (Toes, et al, 1996. J.Immunol. 156: 3911; Toes, et al, 1996. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93:7855.), no ocurrirá. Por lo tanto, péptidos de vacuna de esta longitud son superiores sobre epítomos mínimos de HLA de clase I cortos o proteínas de longitud total.

35 [0073] Uso de la información de los epítomos identificados de CTL CD8⁺ y péptidos derivados de PRAME reactivos auxiliares T CD4⁺, 20 péptidos de vacuna de PRAME fueron diseñados que cumplieran las siguientes tres reglas principales: 1) contienen al menos un epítomo de CTL, preferiblemente más de uno, y de la forma más preferible también epítomos de CTL de los cuales la inmunogenicidad fue confirmada por inducciones de CTL y de forma más preferible presentable por HLA-A2, 2) que contiene al menos un péptido reactivo de células auxiliares T CD4⁺, preferiblemente reactivo tanto en pacientes con una malignidad PRAME positiva y en donantes sanos y 3) una longitud de 19-45 aa., preferiblemente 30 a 35 aminoácidos.

[0074] Los péptidos derivados de PRAME enumerados en la Tabla 6, se diseñan según esta invención y cumplen estos

requisitos. Los péptidos derivados de PRAME en la tabla 6 tienen una capacidad superior para producir una respuesta inmune eficaz, mejorada y prolongada contra las neoplasias de expresión de PRAME y tumores en los sujetos humanos in vivo que fragmentos de PRAME y composiciones previamente descritas en la técnica.

- 5 [0075] Cada uno de los péptidos de la invención como se enumeran en la Tabla 6 en realidad ha sido sintetizado y purificado como se describe en el Ejemplo 1 más arriba. No obstante, para un péptido (SEC ID nº 22: aminoácidos 222-256 de la SEC ID No: 21), que fue inicialmente diseñado usando del mismo criterio que para los péptidos en la Tabla 6, encontramos que en la práctica no podría ser sintetizado en la pureza aceptable (menos del 2% de secuencia correcta). Además notamos que cada uno de estos péptidos de la invención es soluble en soluciones salinas fisiológicamente
10 aceptables (comprendiendo como mucho 35% DMSO) a concentraciones en la gama de 0.5 - 8 mg/ml.

Tabla 6. Veinte péptidos de vacuna de PRAME (ID N° 1 - 20; longitud 33 - 35 aa.) y su caracterización con respecto a epítomos presentados en HLA de clase I y HLA de clase II contenidos en los péptidos.

Vacuna de péptido ^a (n° y posición en PRAME)	Epítomos de HLA de clase II contenidos en péptido de vacuna		Epítomos de HLA de clase I contenidos en péptido de vacuna									
	Péptido de unión de HLA de clase II ^b	Reactividad de célula CD4 ⁺ - Th	Inicio ^a	fin	Secuencia ^e	Longitud ^f	Alelo de HLA de clase I	Unión de HLA de clase I	Capacidad de unión de HLA de clase I	Proceso en C-term ^h	Fragmento intact ⁱ	CTL ^j
#1 PRAME 1-33	1-27	IFN γ / Prolif	5	14	RLWGSQSR	10	HLA-A3	1.59	-	-	-	n.e.
			5	13	RLWGSQSR	9	HLA-A3	1.13	-	-	-	n.e.
			13	22	RYISMSVWTS	10	HLA-A24	5.8	-	-	-	n.e.
			16	24	SMSVWTSR	9	HLA-A3	<1	+	(k)	NT	n.e.
#2 PRAME 19-53	19-45	IFN γ / Prolif	25	34	RLVELAGQSL	10	HLA-A2	11.1	-	-	-	n.e.
			28	36	ELAGQSLK	9	HLA-A3	3.14	-	-	-	n.e.
			33	42	SLKDEALAI	10	HLA-A2	14.0	++	++	+	n.e.
			34	42	LLKDEALAI	9	HLA-A2	10.2	++	++	+	n.e.
			36	45	KDEALAI	10	HLA-B60	2.91	++	++	ND	n.e.
			37	45	DEALAI	9	HLA-B60	1.55	++	++	ND	n.e.
			37	45	DEALAI	9	HLA-B61	<1	++	++	ND	n.e.
			39	47	ALAI	9	HLA-A2	5.1	-	-	-	n.e.
			39	48	ALAI	10	HLA-A2	9.0	-	-	-	n.e.
			41	50	AI	10	HLA-A3	10.75	-	-	-	n.e.
#3	48-69	IFN γ / Prolif	47	56	LLPRELFPPL	10	HLA-A2	2.1	-	-	-	-

PRAME 47-79	53-79	IFN γ / Prolif	48	56	LPRELPPL	9	HLA-B*3501	<1	-	-	n.e.
			48	57	LPREIFPPLF	10	HLA-B*3501	1.58	+	ND	n.e.
			50	58	RELFPPLFM	9	HLA-B60	1.48	++	+	n.e.
			50	58	RELFPPLFM	9	HLA-B61	<1	++	+	n.e.
			50	59	RELFPPLFMA	10	HLA-B61	<1	++	+	n.e.
			52	61	LFPPLFMAAF	10	HLA-A24	<1	++	ND	n.e.
			53	61	FPPLFMAAF	9	HLA-B*3501	<1	-	ND	n.e.
			60	69	AFDGRHSQTL	10	HLA-A24	5.5	+	+	n.e.
			71	80	AMVQAWPFTC	10	HLA-A2	10.4	-	-	n.e.
			77	86	PFTCLPLGVL	10	HLA-A24	2.1	++	+	n.e.
#4 PRAME 69-101	70-96	IFN γ / Prolif	80	88	CLPLGVLMK	9	HLA-A3	<1	-	-	n.e.
			85	94	VLMKGQHLHL	10	HLA-A24	15	-	-	n.e.
			89	97	GQHLHLETF	9	HLA-B62	2.39	++	+	n.e.
			91	99	HLHLETFA	9	HLA-A2	11.1	-	-	n.e.
			94	101	LETFAKAVL	8	HLA-B61	<1	++	+	n.e.
			80	88	CLPLGVLMK	9	HLA-A3	<1	-	-	n.e.
			85	94	VLMKGQHLHL	10	HLA-A24	15	-	-	n.e.
			89	97	GQHLHLETF	9	HLA-B62	2.39	++	+	n.e.
			91	99	HLHLETFA	9	HLA-A2	11.1	-	-	n.e.
			94	101	LETFAKAVL	8	HLA-B61	<1	++	+	n.e.
#5 PRAME 80-114	84-110	IFN γ / Prolif	80	88	CLPLGVLMK	9	HLA-A3	<1	-	-	n.e.
			85	94	VLMKGQHLHL	10	HLA-A24	15	-	-	n.e.
			89	97	GQHLHLETF	9	HLA-B62	2.39	++	+	n.e.
			91	99	HLHLETFA	9	HLA-A2	11.1	-	-	n.e.
			94	101	LETFAKAVL	8	HLA-B61	<1	++	+	n.e.
			80	88	CLPLGVLMK	9	HLA-A3	<1	-	-	n.e.
			85	94	VLMKGQHLHL	10	HLA-A24	15	-	-	n.e.
			89	97	GQHLHLETF	9	HLA-B62	2.39	++	+	n.e.
			91	99	HLHLETFA	9	HLA-A2	11.1	-	-	n.e.
			94	101	LETFAKAVL	8	HLA-B61	<1	++	+	n.e.

96	104	TFKAVLDGL	9	HLA-A24	8.6	-	-	n.e.
99	108	AVLDGLDVLL	10	HLA-A2	9.4	++	+	n.e.
99	107	AVLDGLDVL	9	HLA-A2	13.4	-	-	n.e.
100	108	VLDGLDVLL	9	HLA-A2	5.2	++	+	+
100	109	VLDGLDVLLA	10	HLA-A2	11.9	-	-	n.e.
103	112	GLDVLLAQEV	10	HLA-A2	15.2	-	-	n.e.
# 6 PRAME 94-126								
94	101	LETFKAVL	8	HLA-B61	<1	+	+	n.e.
96	104	TFKAVLDGL	9	HLA-A24	8.6	-	-	n.e.
99	107	AVLDGLDVL	9	HLA-A2	13.4	-	-	n.e.
99	108	AVLDGLDVLL	10	HLA-A2	9.4	++	+	n.e.
100	108	VLDGLDVLL	9	HLA-A2	5.2	++	+	+
100	109	VLDGLDVLLA	10	HLA-A2	11.9	-	-	n.e.
103	112	GLDVLLAQEV	10	HLA-A2	15.2	-	-	n.e.
107	116	LLAQEVPRR	10	HLA-A3	14.0	-	-	n.e.
113	122	RPRRWKLQVL	10	HLA-B7	<1	+	+	+
113	122	RPRRWKLQVL	10	HLA-B8	<1	+	+	n.e.
118	126	KLQVLDLRK	9	HLA-A3	2.15	-	-	n.e.
113	122	RPRRWKLQVL	10	HLA-B7	<1	+	+	+
#7 PRAME 112-144								
113	122	RPRRWKLQVL	10	HLA-B8	<1	+	+	n.e.
118	126	KLQVLDLRK	9	HLA-A3	2.15	-	-	n.e.
136	144	WSGNRASLY	9	HLA-A1	4.3	-	-	n.e.

#8 PRAME 133-166	136	IFN γ /Prolif	133-159	144	WSGNRASLY	9	HLA-A1	4.3	-	-	n.e.
	142			151	SLYSFPEPEA	10	HLA-A2	1.9	++	+	+
	150			158	EEAQPMTKK	9	HLA-A*6801	Pred.	+	NT	n.e.
	150			159	EEAQPMTKKR	10	HLA-A*6801	Pred.	+	NT	n.e.
	173	IFN γ /Prolif	181-207	182	IPVEVLVDLF	10	HLA-A24	<1	-	-	n.e.
#9 PRAME 173-207	182			191	FLKEGACDEL	10	HLA-A2	3.0	-	-	n.e.
	186			195	GACDELFSL	10	HLA-A2	10.6	-	-	n.e.
	186			194	GACDELFSL	9	HLA-B*3501	2.60	+	-	n.e.
	190			199	ELFSYLIEKV	10	HLA-A2	4.5	-	-	n.e.
	190			198	ELFSYLIEK	9	HLA-A3	1.42	+	+	+
	194			202	YLIEKVKRK	9	HLA-A3	3.49	-	-	n.e.
	194			203	YLIEKVKRKK	10	HLA-A3	14.0	-	-	n.e.
	198			207	KVKRKKNVLR	10	HLA-A3	7.5	-	-	n.e.
#10 PRAME 190-223	190	IFN γ	194-220	199	ELFSYLIEKV	10	HLA-A2	4.5	-	-	n.e.
	190			198	ELFSYLIEK	9	HLA-A3	1.42	+	+	+
	194			202	YLIEKVKRK	9	HLA-A3	3.49	-	-	n.e.
	194			203	YLIEKVKRKK	10	HLA-A3	14.0	-	-	n.e.
	198			207	KVKRKKNVLR	10	HLA-A3	7.5	-	-	n.e.
	204			212	NVLRLCCKK	9	HLA-A3	13.5	-	-	n.e.
	205			214	VLRLCCKKLLK	10	HLA-A3	1.3	-	-	n.e.

#11 PRAME 234-268	IFN γ / Prolif	234-255	214	223	KIFAMPMQDI	10	HLA-A2	7.2	-	-	n.e.
			215	223	IFAMPMQDI	9	HLA- A24	1.8	-	-	n.e.
			242	250	CTWKLP TLA	9	HLA-A2	9.3	-	-	n.e.
			242	251	CTWKLP TLA	10	HLA-A3	0.7	-	-	n.e.
			246	255	LPTLAKFSPY	10	HLA- B*3501	0.11	-	-	n.e.
			247	255	PTLAKFSPY	9	HLA-A1	8.5	-	-	n.e.
			248	256	TLAKFSPYL	9	HLA-A2	4.6	+	+	n.e.
			251	260	KFSPYLGQMI	10	HLA- A24	2.5	-	-	n.e.
			253	262	SPYLGQMINL	10	HLA- B*3501	1.98	+	+	n.e.
			254	262	PYLGQMINL	9	HLA- A24	<1	+	+	n.e.
#12 PRAME 247-279	IFN γ / Prolif	247-273	255	264	YLGQMINLRR	10	HLA-A3	4.5	-	-	n.e.
			258	267	QMINLRRL	10	HLA-A2	4.0	+	+	n.e.
			258	267	QMINLRRL	10	HLA-B8	1.67	+	+	+
			259	266	MINLRLL	8	HLA-B8	<1	+	+	n.e.
			260	267	INLRRL	8	HLA-B8	<1	+	+	n.e.
			248	256	TLAKFSPYL	9	HLA-A2	4.6	+	+	n.e.
			251	260	KFSPYLGQMI	10	HLA- A24	2.5	-	-	n.e.
			253	262	SPYLGQMINL	10	HLA- B*3501	1.98	+	+	n.e.
			254	262	PYLGQMINL	9	HLA- A24	<1	+	+	n.e.
			255	264	YLGQMINLRR	10	HLA-A3	4.5	-	-	n.e.

258	267	QMINLRRLLL	10	HLA-A2	4.0	+	+	n.e.
258	267	QMINLRRLLL	10	HLA- B8	1.67	+	+	+
259	266	MINLRRL	8	HLA- B8	<1	+	+	n.e.
260	267	INLRRLLL	8	HLA- B8	<1	+	+	n.e.
261	269	NLRRLLSH	9	HLA- A3	3.5	-	-	n.e.
267	275	LSHIHASSY	9	HLA- A1	1.0	-	-	n.e.
#13 PRAME 262- 262-288								
267	275	LSHIHASSY	9	HLA-A1	1.0	-	-	n.e.
294								
275	284	YISPEKEEQY	10	HLA-A1	3.0	-	-	n.e.
283	292	QYIAQFTSQF	10	HLA- A24	8.2	++	+	n.e.
284	293	YIAQFTSQFL	10	HLA-A2	10.4	++	+	n.e.
284	293	YIAQFTSQFL	10	HLA-A2	10.4	++	+	n.e.
#14 PRAME 284- 290-316								
316								
287	295	QFTSQFLSL	9	HLA- A24	1.0	++	ND	n.e.
292	301	FLSLQCLQAL	10	HLA-A2	2.5	-	-	n.e.
292	302	FLSLQCLQALY	11	HLA-A1	1.0	-	-	n.e.
293	302	LSLQCLQALY	10	HLA-A1	2.9	-	-	n.e.
294	302	SLQCLQALY	9	HLA-A1	2.0	-	-	n.e.
294	303	SLQCLQALYV	10	HLA-A2	3.2	+	-	n.e.
300	308	ALYVDSLFF	9	HLA-A2	2.7	+	+	n.e.
300	308	ALYVDSLFF	9	HLA-A3	8	+	+	n.e.
300	308	ALYVDSLFF	9	HLA-B62	<1	+	+	n.e.
300	309	ALYVDSLFFL	10	HLA-A2	1.7	++	+	+
301	309	LYVDSLFFL	9	HLA-A2	6.3	++	+	n.e.
301	309	LYVDSLFFL	9	HLA-A24	<1	++	+	n.e.

302	310	YVDSLFFLR	9	HLA-A1	1.4	+	-	n.e.
302	310	YVDSLFFLR	9	HLA-A*6801	<1	+	-	n.e.
307	316	FFLRGRDQL	10	HLA-A24	1.8	-	-	n.e.
300	308	ALYVDSLFF	9	HLA-A2	2.7	+	+	n.e.
300	308	ALYVDSLFF	9	HLA-A3	8	+	+	n.e.
300	308	ALYVDSLFF	9	HLA-B62	<1	+	+	n.e.
300	309	ALYVDSLFFL	10	HLA-A2	1.7	++	+	+
301	309	LYVDSLFFL	9	HLA-A2	6.3	++	+	n.e.
301	309	LYVDSLFFL	9	HLA-A24	<1	++	+	n.e.
302	310	YVDSLFFLR	9	HLA-A1	1.4	+	-	n.e.
302	310	YVDSLFFLR	9	HLA-A*6801	<1	+	-	n.e.
307	316	FFLRGRDQL	10	HLA-A24	1.8	-	-	n.e.
308	317	FLRGRDQLL	10	HLA-A2	9.6	-	-	n.e.
316	324	LLRHVMNPL	9	HLA-B62	2.56	-	-	n.e.
355	364	SLSGVMLTDV	10	HLA-A2	9.9	-	-	n.e.
360	369	MLTDVSPEPL	10	HLA-A2	5.6	-	-	n.e.
361	370	LTDVSPEPLQ	10	HLA-A1	3.8	+	+	n.e.
361	371	LTDVSPEPLQA	11	HLA-A1	3.5	+	+	n.e.
371	380	ALLERASATL	10	HLA-A2	12.9	++	+	+
405	414	CSQLTTLSFY	10	HLA-A1	<1	++	-	n.e.

#15 PRAME 295-327
300-326 Prolif.

#16 PRAME 353-387
353-379 IFN γ /Prolif

#17 PRAME 399-431
399-425 IFN γ /Prolif

410	418	TLSFYGNSI	9	HLA-A2	11.0	-	-	n.e.
412	420	SFYGNSISI	9	HLA- A24	<1	++	+	n.e.
419	427	SISALQSLL	9	HLA-A2	5.7	-	-	n.e.
422	431	ALQSLLQHLL	10	HLA-A2	3.2	-	-	n.e.
422	430	ALQSLLQHLL	9	HLA-A2	14.2	-	-	n.e.
419	427	SISALQSLL	9	HLA-A2	5.7	-	-	n.e.
#18 PRAME 417- 424-450								
450								
IFN γ / Prolif								
422	431	ALQSLLQHLL	10	HLA-A2	3.2	-	-	n.e.
422	430	ALQSLLQHLL	9	HLA-A2	14.2	-	-	n.e.
425	433	SLLQHLLGL	9	HLA-A2	3.7	++	+	+
427	436	LQHLLGLSNL	10	HLA- B62	2.41	+	+	n.e.
429	438	HLIGLSNLTH	10	HLA-A3	4.0	+	+	n.e.
432	440	GLSNLTHVL	9	HLA-A2	6.8	+	-	n.e.
432	441	GLSNITHVLY	10	HLA-A3	4.07	-	-	n.e.
433	441	LSNITHVLY	9	HLA-A1	<1	-	-	n.e.
435	443	NLTHVLYPV	9	HLA- A2	2.5	-	-	n.e.
439	448	VLYPVPLESY	10	HLA- A1	10.9	+	+	n.e.
439	448	VLYPVPLESY	10	HLA- A3	2.67	+	+	n.e.
439	448	VLYPVPLESY	10	HLA- B62	1.66	+	+	n.e.
447	455	SYEDIHGTL	9	HLA- A24	<1	-	-	n.e.
#19 PRAME 447- 447-473								
480								
IFN γ / Prolif								
448	457	YEDIHGTLHL	10	HLA- B60	<1	++	-	n.e.
453	462	GTLHLERLAY	10	HLA-A1	2.0	-	-	n.e.
454	462	TLHLERLAY	9	HLA-A1	10.1	-	-	n.e.
454	463	TLHLERLAYL	10	HLA-A2	12.2	-	-	n.e.

459	467	RLAYLHARL	9	HLA-A24	<1	++	+	n.e.
459	468	RLAYLHARLR	10	HLA-A3	1.0	-	-	n.e.
461	470	AYLHARLREL	10	HLA-A24	1	+	+	n.e.
462	470	YLHARLREL	9	HLA-A2	6.2	+	+	n.e.
462	470	YLHARLREL	9	HLA-B8	<1	+	+	n.e.
462	471	YLHARLRELL	10	HLA-A2	13.3	+	+	n.e.
466	474	RLRELLCEL	9	HLA-A2	14.0	-	-	n.e.
466	474	RLRELLCEL	9	HLA-A24	<1	-	-	n.e.
470	479	LLCELGRPSM	10	HLA-A2	10.5	-	-	n.e.
487	496	CPHCGDRTFY	10	HLA- B*3501	1.5	-	-	n.e.
494	502	TFYDPEPIL	9	HLA-A24	<1	-	-	n.e.
499	507	EPILCPCFM	9	HLA- B*3501	0.32	-	-	n.e.

20 PRAME 483-509 IFN γ

477-509

^a Péptidos de vacuna de 33 a 35 aa. de longitud: péptido ID n° y posiciones del primer y último aa. en proteína de PRAME de longitud completa.

^b Posición de inicio y final (aa.) del péptido de unión de HLA de clase II que fue evaluado para reactividad de células Th CD4⁺.

^c Reactividad de células Th CD4⁺ contra los péptidos de unión de HLA de clase II. Nomenclatura: IFN γ :: respuesta de IFN γ - observada después de la estimulación con el péptido indicado; Prolif.: respuesta proliferativa observada después de estimulación con péptido indicado.

^d Posición en PRAME del aminoácido N-terminal del péptido de unión de HLA de clase I. Los péptidos se clasifican por el aa inicial.

^e Secuencia de aa. del péptido de unión de HLA de clase I

^f Longitud del péptido de unión de HLA de clase I

^g IC₅₀ es la concentración de péptido necesitada para inhibir la unión de péptido de referencia marcado con FL para el 50% (IC₅₀ en mM). Pred., alta afinidad de enlace predicha.

^h Generación por digestión mediada por proteasoma de fragmentos con el C-término correcto del péptido de unión de HLA de clase I. La digestión fue evaluada a 1 h de digestión porque éste es fisiológicamente el punto temporal más pertinente. Clasificación: (++) fragmentos presentes para > 5%, (+) presentes para < 5%, (-) ninguno de los fragmentos conteniendo el término C fueron descubiertos. Péptidos con IC₅₀ < 15 mM se consideran ser epítopos potenciales de CTL respecto a su afinidad de enlace.

ⁱ Epítipo intacto descubierto en los fragmentos de digestión después de 1 h de digestión: (+), presente; (-), no presente; (ND), no pudo ser determinado debido a extremidades artificiales de los péptidos de entrada sintéticos; (NT), la integridad de estos epítopos después de la digestión con nardilisina no fue evaluada.

^j CTL inducido contra esta combinación específica de HLA/péptido, específicamente reconociendo células tumorales. Clasificación: +, CTL inducido y reconoce células tumorales; -, CTL inducido pero no reconoce células tumorales; n.e., no evaluado

^k epítipo de CTL PRA(190-198) (ELFSYLIEK) presentado en HLA-A3 se genera por escisiones no proteasómicas como se explica en el ejemplo 3 y figura 2. Los términos C de PRA(16-24), PRA(150-158), PRA(150-159), PRA(253-262) y PRA(254-262) se predice que son hechos directamente por un sitio de escisión abundante de Nardilisina. Los últimos dos péptidos (PRA(253-262), y PRA(254-262)) fueron, además, experimentalmente mostrados para ser generados por una escisión proteasómica en su término C (ver Tabla 4).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0076]

- 5 <110> Academisch Ziekenhuis h.o.d.n. LUMC
- <120> Péptidos derivados de PRAME y composiciones inmunogénicas que comprenden los mismos
- <130> P6008384EP
- 10 <160> 22
- <170> Versión de patentIn 3.3
- 15 <210> 1
- <211> 33
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 20 <400> 1
- Met Glu Arg Arg Arg Leu Trp Gly Ser Ile Gln Ser Arg Tyr Ile Ser
1 5 10 15
- Met Ser Val Trp Thr Ser Pro Arg Arg Leu Val Glu Leu Ala Gly Gln
20 25 30
- Ser
- <210> 2
- <211> 35
- 25 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2
- Val Trp Thr Ser Pro Arg Arg Leu Val Glu Leu Ala Gly Gln Ser Leu
1 5 10 15
- Leu Lys Asp Glu Ala Leu Ala Ile Ala Ala Leu Glu Leu Leu Pro Arg
20 25 30
- Glu Leu Phe
35
- 30 <210> 3
- <211> 33
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 35 <400> 3

ES 2 539 812 T3

Leu Leu Pro Arg Glu Leu Phe Pro Pro Leu Phe Met Ala Ala Phe Asp
1 5 10 15

Gly Arg His Ser Gln Thr Leu Lys Ala Met Val Gln Ala Trp Pro Phe
20 25 30

Thr

<210> 4

<211> 33

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Leu Lys Ala Met Val Gln Ala Trp Pro Phe Thr Cys Leu Pro Leu Gly
1 5 10 15

Val Leu Met Lys Gly Gln His Leu His Leu Glu Thr Phe Lys Ala Val
20 25 30

Leu

10 <210> 5

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 5

Cys Leu Pro Leu Gly Val Leu Met Lys Gly Gln His Leu His Leu Glu
1 5 10 15

Thr Phe Lys Ala Val Leu Asp Gly Leu Asp Val Leu Leu Ala Gln Glu
20 25 30

Val Arg Pro
35

<210> 6

<211> 33

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 539 812 T3

Leu Glu Thr Phe Lys Ala Val Leu Asp Gly Leu Asp Val Leu Leu Ala
1 5 10 15

Gln Glu Val Arg Pro Arg Arg Trp Lys Leu Gln Val Leu Asp Leu Arg
20 25 30

Lys

<210> 7

<211> 33

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Val Arg Pro Arg Arg Trp Lys Leu Gln Val Leu Asp Leu Arg Lys Asn
1 5 10 15

Ser His Gln Asp Phe Trp Thr Val Trp Ser Gly Asn Arg Ala Ser Leu
20 25 30

Tyr

<210> 8

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Trp Thr Val Trp Ser Gly Asn Arg Ala Ser Leu Tyr Ser Phe Pro Glu
1 5 10 15

Pro Glu Ala Ala Gln Pro Met Thr Lys Lys Arg Lys Val Asp Gly Leu
20 25 30

Ser Thr

<210> 9

<211> 35

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

ES 2 539 812 T3

Ile Pro Val Glu Val Leu Val Asp Leu Phe Leu Lys Glu Gly Ala Cys
1 5 10 15

Asp Glu Leu Phe Ser Tyr Leu Ile Glu Lys Val Lys Arg Lys Lys Asn
20 25 30

Val Leu Arg
35

<210> 10

<211> 34

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Leu Phe Ser Tyr Leu Ile Glu Lys Val Lys Arg Lys Lys Asn Val
1 5 10 15

Leu Arg Leu Cys Cys Lys Lys Leu Lys Ile Phe Ala Met Pro Met Gln
20 25 30

Asp Ile

<210> 11

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Ile Glu Asp Leu Glu Val Thr Cys Thr Trp Lys Leu Pro Thr Leu
1 5 10 15

Ala Lys Phe Ser Pro Tyr Leu Gly Gln Met Ile Asn Leu Arg Arg Leu
20 25 30

Leu Leu Ser
35

<210> 12

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 539 812 T3

Pro Thr Leu Ala Lys Phe Ser Pro Tyr Leu Gly Gln Met Ile Asn Leu
1 5 10 15

Arg Arg Leu Leu Leu Ser His Ile His Ala Ser Ser Tyr Ile Ser Pro
20 25 30

Glu

<210> 13

<211> 33

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ser His Ile His Ala Ser Ser Tyr Ile Ser
1 5 10 15

Pro Glu Lys Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Gln Phe Thr Ser Gln Phe Leu
20 25 30

Ser

<210> 14

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Tyr Ile Ala Gln Phe Thr Ser Gln Phe Leu Ser Leu Gln Cys Leu Gln
1 5 10 15

Ala Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu Arg Gly Arg Leu Asp Gln
20 25 30

Leu

<210> 15

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

ES 2 539 812 T3

Leu Gln Cys Leu Gln Ala Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu Arg
1 5 10 15

Gly Arg Leu Asp Gln Leu Leu Arg His Val Met Asn Pro Leu Glu Thr
20 25 30

Leu

<210> 16

<211> 35

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 16

Val Leu Ser Leu Ser Gly Val Met Leu Thr Asp Val Ser Pro Glu Pro
1 5 10 15

Leu Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val
20 25 30

Phe Asp Glu
35

<210> 17

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 17

Leu Pro Ser Leu Ser His Cys Ser Gln Leu Thr Thr Leu Ser Phe Tyr
1 5 10 15

Gly Asn Ser Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu
20 25 30

Ile

<210> 18

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

20

<400> 18

ES 2 539 812 T3

Ser Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly
1 5 10 15

Leu Ser Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr
20 25 30

Glu Asp

<210> 19

<211> 34

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Tyr Glu Asp Ile His Gly Thr Leu His Leu Glu Arg Leu Ala Tyr
1 5 10 15

Leu His Ala Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys Glu Leu Gly Arg Pro Ser
20 25 30

Met Val

10 <210> 20

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 20

Pro Ser Met Val Trp Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro His Cys Gly Asp
1 5 10 15

Arg Thr Phe Tyr Asp Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro Cys Phe Met Pro
20 25 30

Asn

<210> 21

<211> 509

<212> PRT

20 <213> homo sapiens

<400> 21

ES 2 539 812 T3

Met Glu Arg Arg Arg Leu Trp Gly Ser Ile Gln Ser Arg Tyr Ile Ser
1 5 10 15

Met Ser Val Trp Thr Ser Pro Arg Arg Leu Val Glu Leu Ala Gly Gln
20 25 30

Ser Leu Leu Lys Asp Glu Ala Leu Ala Ile Ala Ala Leu Glu Leu Leu
35 40 45

Pro Arg Glu Leu Phe Pro Pro Leu Phe Met Ala Ala Phe Asp Gly Arg
50 55 60

His Ser Gln Thr Leu Lys Ala Met Val Gln Ala Trp Pro Phe Thr Cys
65 70 75 80

Leu Pro Leu Gly Val Leu Met Lys Gly Gln His Leu His Leu Glu Thr
85 90 95

Phe Lys Ala Val Leu Asp Gly Leu Asp Val Leu Leu Ala Gln Glu Val
100 105 110

ES 2 539 812 T3

Arg Pro Arg Arg Trp Lys Leu Gln Val Leu Asp Leu Arg Lys Asn Ser
 115 120 125
 His Gln Asp Phe Trp Thr Val Trp Ser Gly Asn Arg Ala Ser Leu Tyr
 130 135 140
 Ser Phe Pro Glu Pro Glu Ala Ala Gln Pro Met Thr Lys Lys Arg Lys
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Leu Ser Thr Glu Ala Glu Gln Pro Phe Ile Pro Val Glu
 165 170 175
 Val Leu Val Asp Leu Phe Leu Lys Glu Gly Ala Cys Asp Glu Leu Phe
 180 185 190
 Ser Tyr Leu Ile Glu Lys Val Lys Arg Lys Lys Asn Val Leu Arg Leu
 195 200 205
 Cys Cys Lys Lys Leu Lys Ile Phe Ala Met Pro Met Gln Asp Ile Lys
 210 215 220
 Met Ile Leu Lys Met Val Gln Leu Asp Ser Ile Glu Asp Leu Glu Val
 225 230 235 240
 Thr Cys Thr Trp Lys Leu Pro Thr Leu Ala Lys Phe Ser Pro Tyr Leu
 245 250 255
 Gly Gln Met Ile Asn Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ser His Ile His Ala
 260 265 270
 Ser Ser Tyr Ile Ser Pro Glu Lys Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Gln Phe
 275 280 285
 Thr Ser Gln Phe Leu Ser Leu Gln Cys Leu Gln Ala Leu Tyr Val Asp
 290 295 300
 Ser Leu Phe Phe Leu Arg Gly Arg Leu Asp Gln Leu Leu Arg His Val
 305 310 315 320
 Met Asn Pro Leu Glu Thr Leu Ser Ile Thr Asn Cys Arg Leu Ser Glu
 325 330 335
 Gly Asp Val Met His Leu Ser Gln Ser Pro Ser Val Ser Gln Leu Ser
 340 345 350

ES 2 539 812 T3

Val Leu Ser Leu Ser Gly Val Met Leu Thr Asp Val Ser Pro Glu Pro
355 360 365

Leu Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val
370 375 380

Phe Asp Glu Cys Gly Ile Thr Asp Asp Gln Leu Leu Ala Leu Leu Pro
385 390 395 400

Ser Leu Ser His Cys Ser Gln Leu Thr Thr Leu Ser Phe Tyr Gly Asn
405 410 415

Ser Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly
420 425 430

Leu Ser Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr
435 440 445

Glu Asp Ile His Gly Thr Leu His Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His
450 455 460

Ala Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val
465 470 475 480

Trp Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr
485 490 495

Asp Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro Cys Phe Met Pro Asn
500 505

<210> 22

<211> 35

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 22

ES 2 539 812 T3

Asp Ile Lys Met Ile Leu Lys Met Val Gln Leu Asp Ser Ile Glu Asp
 1 5 10 15

Leu Glu Val Thr Cys Thr Trp Lys Leu Pro Thr Leu Ala Lys Phe Ser
 20 25 30

Pro Tyr Leu
 35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido con una longitud de no más de 50 aminoácidos y que comprende al menos 33 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la proteína de PRAME humana, donde el péptido comprende al menos un epítipo de HLA de clase II y al menos un epítipo de HLA de clase I de la secuencia de aminoácidos de la proteína de PRAME humana y donde el péptido comprende SEC ID nº 6.
2. Péptido según la reivindicación 1, donde la longitud de la secuencia de aminoácidos contigua es 33-35 aminoácidos.
- 10 3. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el epítipo de HLA de clase II es capaz de activar una célula Th CD4⁺ en el paciente de cáncer humano y/o un control saludable.
- 15 4. Péptido según la reivindicación 3, donde el epítipo de HLA de clase II es capaz de activar una célula Th CD4⁺ CD45RO positiva.
5. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el epítipo de HLA de clase I es procesado C-terminalmente por escisión proteasómica.
- 20 6. Péptido según la reivindicación 5, donde el epítipo de HLA de clase I es capaz de activar un CTL CD8⁺ en el paciente de cáncer humano y/o en un control saludable, preferiblemente el epítipo HLA-A2 .
7. Composición para vacunación que comprende al menos un péptido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, opcionalmente comprendiendo al menos un adyuvante.
- 25 8. Composición según la reivindicación 7, donde dicha composición comprende además un péptido con una longitud de no más de 50 aminoácidos, que comprende al menos 33 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la proteína de PRAME humana, que comprende al menos un epítipo de HLA de clase II y al menos un epítipo de HLA de clase I de la secuencia de aminoácidos de la proteína de PRAME humana y que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en las secuencias de aminoácidos SEC ID nº: 5, 8, 14, 15,16 y 18.
- 30 9. Composición según la reivindicación 7 o 8, donde el adyuvante actúa a través de un receptor tipo Toll.
10. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para uso como un medicamento, preferiblemente como una vacuna.
- 35 11. Péptido o composición según la reivindicación 10 para usar en el tratamiento o prevención de cáncer.
12. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para la producción de un medicamento, preferiblemente una vacuna para el tratamiento o prevención de cáncer.
- 40 13. Uso según la reivindicación 12, donde el cáncer es seleccionado del grupo consistente en melanoma, linfoma, papilomas, carcinomas de pecho o cervicales, leucemias agudas y crónicas, meduloblastoma, carcinoma de pulmón de célula no pequeña, cáncer de cuello y de cabeza, carcinoma renal, carcinoma pancreático, cáncer de próstata, cáncer pulmonar de célula pequeña, mieloma múltiple, sarcomas y neoplasias hematológicas como leucemia mieloide crónica y leucemia mieloide aguda.
- 45

Fig 1.1

Inicio	Fin	
1	27	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 M E R R R L W G S I Q S R Y I S M S V W T S P R R L V
19	45	19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 V W T S P R R L V E L A G Q S L L K D E A L A I A A L
37	63	37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 D E A L A I A A L E L L P R E L F P P L F M A A F D G
53	79	53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 F P P L F M A A F D G R H S Q T L K A M V Q A W P F T
70	96	70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 K A M V Q A W P F T C L P L G V L M K G Q H L H L E T
84	110	84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 G V L M K G Q H L H L E T F K A V L D G L D V L L A Q
90	116	90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 Q H L H L E T F K A V L D G L D V L L A Q E V R P R R
98	124	98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 K A V L D G L D V L L A Q E V R P R R W K L Q V L D L
116	142	116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 R W K L Q V L D L R K N S H Q D F W T V W S G N R A S
133	159	133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 W T V W S G N R A S L Y S F P E P E A A Q P M T K K R
153	179	153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 Q P M T K K R K V D G L S T E A E Q P F I P V E V L V
173	199	173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 I P V E V L V D L F L K E G A C D E L F S Y L I E K V
182	208	182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 F L K E G A C D E L F S Y L I E K V K R K K N V L R L
203	229	203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 K N V L R L C C K K L K I F A M P M Q D I K M I L K M
239	265	239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 E V T C T W K L P T L A K F S P Y L G Q M I N L R R L
247	273	247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 P T L A K F S P Y L G Q M I N L R R L L L S H I H A S
269	295	269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 H I H A S S Y I S P E K E E Q Y I A Q F T S Q F L S L
290	316	290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 S Q F L S L Q C L Q A L Y V D S L F F L R G R L D Q L

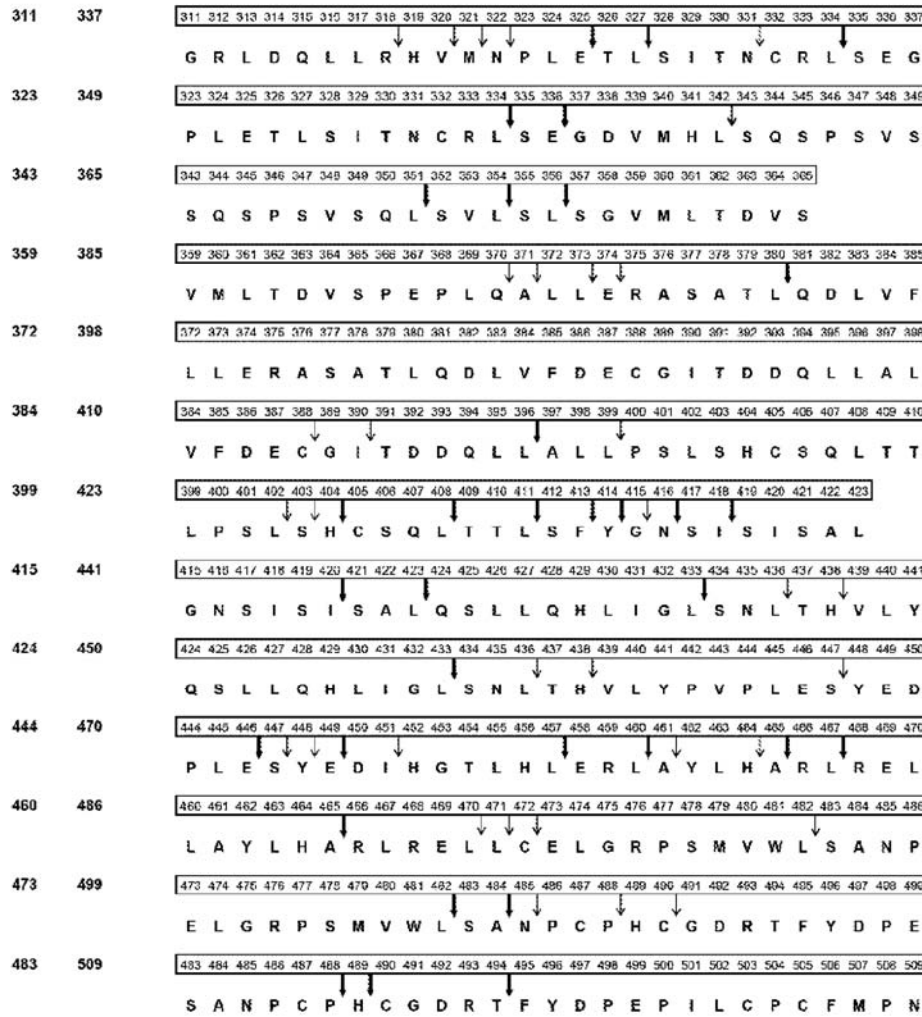
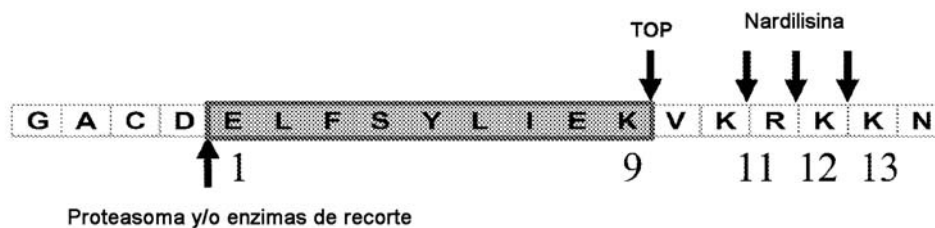
Fig 1.2*Fig 2*

Fig 3a

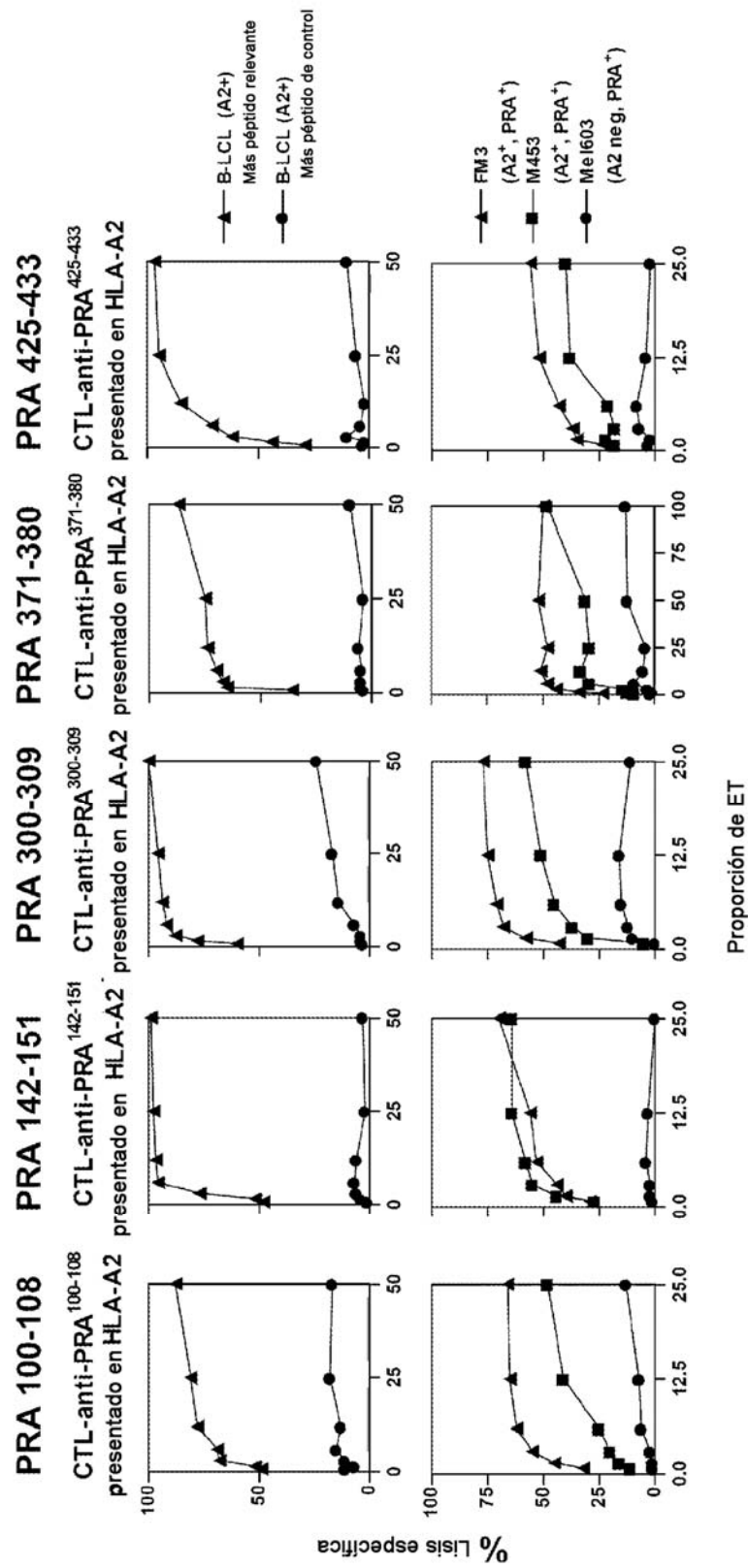


Fig 3b

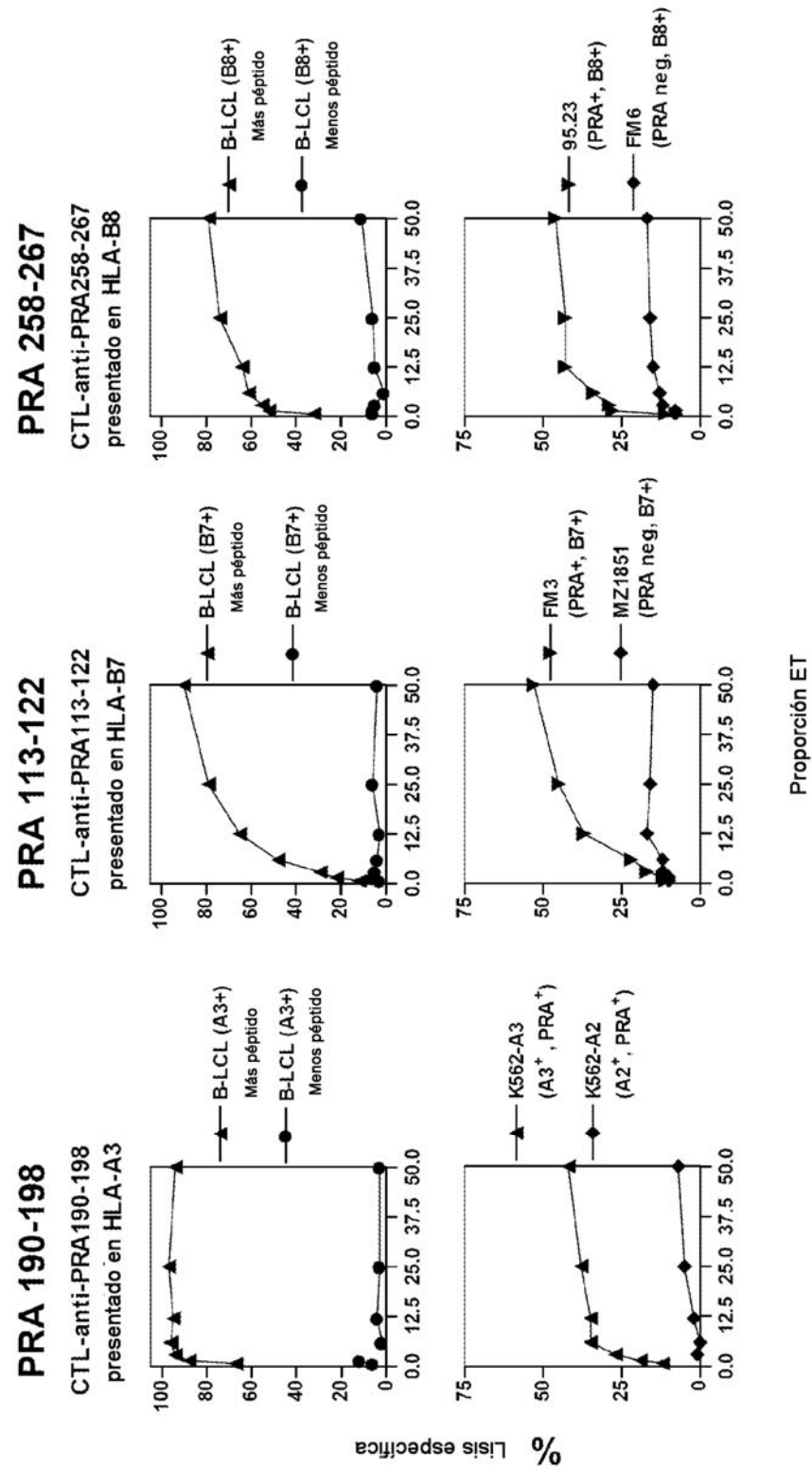


Fig 4

péptidos de unión de HLA de clase I ^a																														
unión de HLA-A3														No intacto en fragmentos de digestión																
unión de HLA-A24														Intacto en fragmentos de digestión																
Digestión PRAME 70-96																														
Posición	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	Fragmento ^b		Intensidad (%) ^c
Substrato	K	A	M	V	Q	A	W	P	F	T	C	L	P	L	G	V	L	M	K	G	Q	H	L	H	L	E	T	Inicio	Fin	1 h
Fragmentos				V	Q	A	W																					73	76	3.0
					Q	A	W																					74	76	8.3
						A	W	P	F																			75	78	1.6
								P	F	T	C	L	P	L	G	V	L											77	86	4
										T	C	L	P	L	G	V	L											79	86	46
													P	L	G	V	L	M										82	87	7.7
															G	V	L	M	K									84	88	2.6
																	V	L	M	K	G							85	89	2.6
								P	F	T	C	L	P	L	G	V	L	M	K	G	Q	H	L	H	L	E	T	77	96	19.6
													P	L	G	V	L	M	K	G	Q	H	L	H	L	E	T	82	96	4.4