

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 141**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2006 E 06826190 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 1951281**

54 Título: **Péptidos WT1 de unión a HLA de clase II, y composiciones y métodos que los comprenden**

30 Prioridad:

17.10.2005 US 726608 P

20.10.2005 US 728304 P

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

31.07.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHEINBERG, DAVID, A.;
PINILLA-IBARZ, JAVIER y
MAY, RENA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 542 141 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 WT1 de unión a HLA de clase II, y composiciones y métodos que los comprenden

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un péptido WT1 aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (SEC ID N° 2) y usos médicos del mismo, en particular, para el tratamiento de, la reducción de la incidencia de y la inducción de respuestas inmunes contra un cáncer que expresa WT1.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El tumor de Wilms (WT), un nefroblastoma pediátrico que se produce con una frecuencia de 1 de cada 10.000 nacimientos, ha sido objeto de una intensa investigación clínica y básica durante varios años. El tumor es de origen embrionario, y normalmente se detecta en los niños durante los primeros 5 años de vida, pudiendo darse de manera unilateral o bilateral. Los WT surgen cuando las células mesenquimales metanéficas condensadas del riñón en desarrollo no se diferencian correctamente. La implicación del gen supresor del tumor de Wilms 1 (WT1) en la etiología del WT ilustra el impacto que las alteraciones genéticas pueden tener en el desarrollo y la tumorigénesis. El documento WO 03/037060 se refiere a composiciones y métodos de inmunoterapia específica de WT1.

15

20

COMPENDIO DE LA INVENCION

En el presente documento, se desvelan péptidos WT1 y métodos de tratamiento de, reducción de la incidencia de, e inducción de respuestas inmunes contra un cáncer que expresa WT1 que los comprenden.

25

La presente invención proporciona un péptido WT1 aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos (AA) RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (SEQ ID No: 2). También se desvela un fragmento de SEC ID N° 2.

30

También se desvela un péptido WT1 aislado que tiene una secuencia de (AA) que comprende o consiste en la secuencia PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEC ID N° 4) o un fragmento de SEC ID N° 4.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende (a) una célula presentadora de antígeno y (b) un péptido que consiste en RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (SEC ID N° 2).

35

En otra realización, la presente invención proporciona el péptido que consiste en SEC ID N° 2 para su uso en el tratamiento de un sujeto con un cáncer que expresa WT1, que comprende la administración al sujeto de una vacuna contra WT1 que comprende un péptido de la presente invención, tratando de este modo a un sujeto con un cáncer que expresa WT1.

40

En otra realización, la presente invención proporciona el péptido que consiste en SEC ID N° 2 para su uso en la reducción de la incidencia de un cáncer que expresa WT1, o su recaída, en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una vacuna contra WT1 que comprende un péptido de la presente invención, reduciendo de este modo la incidencia de un cáncer que expresa WT1, o su recaída, en un sujeto.

45

En otra realización, la presente invención proporciona el péptido que consiste en SEC ID N° 2 para su uso en la inducción de una respuesta inmune anti-mesotelioma en un sujeto, que comprende la etapa de poner en contacto el sujeto con una composición inmunogénica que comprende un péptido de la invención, induciendo así una respuesta inmune anti-mesotelioma en un sujeto.

50

En otra realización, la presente invención proporciona el péptido que consiste en SEC ID N° 2 para su uso en el tratamiento de un sujeto con un mesotelioma, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición inmunogénica que comprende un péptido de la invención, tratando de este modo un sujeto con un mesotelioma.

55

En otra realización, la presente invención proporciona el péptido que consiste en SEC ID N° 2 para su uso en la reducción de una incidencia de un mesotelioma, o su recaída, en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición inmunogénica que comprende un péptido de la invención, reduciendo así la incidencia de un mesotelioma, o su recaída, en un sujeto.

60

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ensayo de estabilización de T2 de péptidos WT-1 nativos y sintéticos contra células HLA A0201 (A) y células HLA A0301 (B-E). El índice de fluorescencia es la proporción entre la mediana de la fluorescencia con el péptido ensayado y la mediana de la fluorescencia sin péptido. Eje X: concentración por pocillo del péptido ensayado.

65

Figura 2. ELISPOT (A) y citotoxicidad (B) del interferón γ (IFN) $CD8^+/CD3^+$ de donantes sanos HLA A0201 contra linfocitos T2 pulsados con los siguientes péptidos: primera barra de cada serie: péptido; segunda barra: mismo péptido usado para la estimulación; tercera barra: péptido nativo correspondiente; cuarta barra: péptido control negativo. Eje X: péptidos usados para estimulaciones. Los experimentos se realizaron por triplicado y se confirmaron de 3 a 5 veces.

Figura 3. ELISPOT del IFN γ $CD8^+$ (A) y $CD3^+$ (B-D) de donantes sanos HLA A0201 usando la asignación de péptidos indicada de las barras en cada serie de la Figura 2. Cada subfigura de B-D representa una repetición distinta del experimento.

Figura 4. Ensayos de citotoxicidad usando linfocitos T $CD8^+$ estimulados con péptidos WT-1 A1 sintéticos de un donante HLA A0201 contra blastocitos de LMC con HLA que presentan secuencias de péptidos nativos. A. Gráficos de barras de resultados. Primera barra de cada serie: SKLY-16 (WT1⁺); segunda barra: BV173 (WT1⁺); tercera barra: LAMA81 (WT1⁺); cuarta barra: CMLA (control negativo adicional). B. Curvas de destrucción. Cuadrados: SKLY-16. Diamantes: células 697. G3, F4, C5 y G5 son clones de linfocitos T generados a partir de un donante HLA-A0201 sano tras múltiples estimulaciones in vitro. Eje Y: porcentaje de citotoxicidad. Eje X: Proporción entre linfocitos T y células diana.

Figura 5, parte 1. ELISPOT de IFN γ tras la estimulación con péptidos WT1 de linfocitos T $CD3^+$ de donantes sanos con diferentes tipos de HLA-DRB1. Eje Y: Porcentaje de citotoxicidad. Eje X: Proporción entre células efectoras y células diana. Parte 2. Se estimularon linfocitos T $CD3^+$ (A: HLA-DRBL*1001/1501; B: HLA-DRB1*0701/1202; C: HLA-DRB 1*0301/901; D: HLA-DRB 1*0407/1302) dos veces con péptido WT1DR 328 o WT1DR 423. Se desafiaron los linfocitos T estimulados en un ensayo ELISPOT de IFN γ con lo siguiente: barras grises: control no desafiado; barras negras: células $CD14^+$ pulsadas con péptido estimulante (bien WT1DR 328 o WT1DR 423); barras blancas: células $CD14^+$ pulsadas con epítipo de péptido $CD4^+$ irrelevante (RAS); barras rayadas: células $CD14^+$ no pulsadas. * -p < 0,05 en comparación con los controles. Eje Y: Número de manchas por 1×10^5 linfocitos T $CD3^+$. Eje X: Péptido usado para la estimulación de linfocitos T.

Figura 6. Los péptidos de la presente invención son procesados, presentados y reconocidos por linfocitos T humanos. A. Se estimularon linfocitos T $CD3^+$ de un donante sano HLA A0201/301DRB1*1301/1302 con DC autólogas previamente incubadas con lisados de tumor 697, luego se desafiaron en un ensayo ELISPOT de IFN γ con DC autólogas previamente incubadas bien con lisado de tumor 697, péptidos WT1 individuales, péptidos de control o DC no pulsadas (eje X). B. Se estimularon linfocitos T $CD3^+$ de un donante sano HLA A0201/101, DRB1*0301/1601 con DC autólogas previamente incubadas con lisados tumorales bien de JMN (barras negras) o MeWo (barras blancas). Las linfocitos T se desafiaron en un ensayo ELISPOT de IFN γ con DC autólogas previamente incubadas con lisados tumorales JMN o MeWo, péptidos WT1DR individuales o péptido de control de clase II (eje X). Barras sombreadas: Nivel de fondo de las manchas de DC autólogas incubadas en ausencia de linfocitos T. * - P < 0,05 en comparación con los péptidos de control. Eje Y: Número de manchas por 1×10^5 células $CD3^+$.

Figura 7. ELISPOT de interferón γ de $CD3^+$ frente a líneas celulares de mesotelioma. Se estimularon PBMC totales de un donante HLA-A0201 dos veces con los diferentes péptidos WT1DR y, a continuación, se desafiaron linfocitos T en un ensayo ELISPOT de IFN γ con lo siguiente: línea celular de mesotelioma H-Meso1A (barras negras; WT1+, A0201+); línea celular de melanoma MeWo de control (WT1⁻, A0201⁻; barras grises). * - p \leq 0,01 en comparación con los controles de MeWo. Eje Y: Número de manchas por 2×10^5 PBMC. Eje X: Péptido usado para la estimulación de los linfocitos T.

Figura 8. ELISPOT de IFN γ de $CD3^+$ frente a líneas celulares de mesotelioma. Se estimularon PBMC totales de un donante HLA-A0201 dos veces con los diferentes péptidos WT1DR y, a continuación, se desafiaron linfocitos T en un ensayo ELISPOT de IFN γ con lo siguiente: línea celular de mesotelioma H-Meso1A (barras negras; WT1+, A0201+); línea celular de MeWo (WTF⁻, A0201⁻; barras grises). * - p \leq 0,01 en comparación con los controles de MeWo. Eje Y: Número de manchas por 2×10^5 PBMC. Eje X: Péptido usado para la estimulación de los linfocitos T.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un péptido WT1 aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (SEC ID N° 2). También se proporciona un péptido WT1 aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (SEC ID N° 2) para su uso en el tratamiento de, la reducción de la incidencia de y la inducción de respuestas inmunes contra un cáncer que expresa WT1.

Según lo estipulado en el presente documento, los péptidos de la presente invención provocan respuestas de linfocitos T $CD4^+$ (Ejemplos 3- 4).

También se desvela un péptido WT1 aislado que tiene una secuencia de AA que comprende la secuencia PGCNKR YFKLSHLQMHSRKHTG (SEC ID N° 4) o que consiste en SEC ID N° 4.

5 También se desvela un péptido WT1 aislado que tiene una secuencia de AA que comprende o que consiste en la SEC ID N° 1, o que consiste en un fragmento de SEC ID N° 1.

También se desvela un péptido WT1 aislado que tiene una secuencia de AA que comprende o que consiste en la SEC ID N° 3, o que consiste en un fragmento de SEC ID N° 3.

10 En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende (a) una célula presentadora de antígeno y (b) un péptido que consiste en la secuencia RSEDELVRHHNMHQRNMTKL (SEC ID N° 2) y, opcionalmente, también un péptido que tiene la secuencia PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEC ID N° 4). En otra realización, la composición comprende además un péptido de unión a la molécula HLA de clase II adicional. En otra
 15 realización, la molécula HLA de clase I es una molécula HLA-A. En otra realización, la secuencia de AA del péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I comprende una secuencia seleccionada entre SEC ID N° 5-38. En otra realización, la secuencia de AA del péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I es de SEC ID N° 5-38. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

20 La proteína WT1 de los métodos y las composiciones de la presente invención puede ser cualquier proteína WT1 conocida en la técnica.

La molécula de WT1 de la que se deriva un péptido de la presente invención tiene, en otra realización, la secuencia:

MGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGGALPVSAAAQWAPVLDFAAPPASAYGSLGGPA
 PPPAPPPPPPPPHSFIKQEPSWGGAEPEEQCLSFTVHFSGQFTGTAGACRYGPF
 PPPPSQASSGQARMFPNAPYLPSCLSQPAIRNQGYSTVTFDGTSPSYGHTPSHAAQ
 FPNHSFKHEDPMGQQGSLGEQQYSVPPVYGCHTPTDSTGSAALLRTPYSSDNL
 YQMTSQLECMTNQMNLGATLKGVAAGSSSSVKWTEGQSNHSTGYESDNHTTPI
 LCGAQYRIHTHGVRFGIQDVRVPGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFK
 LSHLQMHSRKHTGKPYQCDFKDCERRFSRSDQLKRHRHTGVPFQCKTCQRK
 FSRSDHLKTHTRTHTGKTSEKPFSCRWPCQKKFARSDELVRHHNMHQRNMTKLQ
 25 LAL (Número de acceso del GenBank AY245105; SEC ID N° 50).

En otra realización, la molécula de WT1 tiene la secuencia:

TGTAGACRYGPFPPPPPSQASSGQARMFPNAPYLPSCLSQPAIRNQGYSTVTFDGTSPSYGHT
 PSHHAAQFPNHSFKHEDPMGQQGSLGEQQYSVPPVYGCHTPTDSTGSAALLRTPYSSDN
 LYQMTSQLECMTNQMNLGATLKGHSTGYESDNHTTPI LCGAQYRIHTHGVRFGIQDVRV
 PGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTGKPYQCDFKDCERRF
 SRSDQLKRHRHTGVPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRTHTGKPFSCRWPCQKKFARS
 DELVRHHNMHQRNMTKLQ LAL (Número de acceso del GenBank NM_000378; SEC ID N°51)

30 En otra realización, la molécula de WT1 tiene la secuencia:

MQDPASTCVPEPASQHILRSGPGCLQQPEQQGVDRDPGGIWAKLGAAEASAERLQGRRSRGA
 SGSEPQQMGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGGCALPVSGAAQWAPVLDFAPPGASAYGSLGGP
 APPPAPPPPPPPPHSFIKQEPSWGGAEPEHEEQCLSFTVHFSGQFTGTAGACRYGPFPPPPSQ
 ASSGQARMFPNAPYLPSCLSQPAIRNQGYSTVTFDGTSPSYGHTPSHAAQFPNHSFKHEDP
 MGQQGSLGEQQYSVPPVYGCHTPTDSCTGSQALLRTPYSSDNLQMTSLECMWTWNQM
 NLGATLKGVAAGSSSSVKWTEGQSNHSTGYESDNHTTPILCGAQYRIHTHGVRGIQDVRRV
 PGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTGEKPYQCDFKDCERRF
 SRSDQLKRHRQRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRHTGEKPFSCRWPSCQKKFARS
 DELVRHNMHQ RNMTKLQLAL (Número de acceso del GenBank NP_077742; SEC ID N°52)

En otra realización, la molécula de WT1 comprende la secuencia:

MGHHHHHHHHHSSGHIEGRHMRRVPGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFKLS
 HLQMHSRKHTGEKPYQCDFKDCERRFFRSDDLKRHRQRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLK
 THTRHTGEKPFSCRWPSCQKKFARSDELVRHNMHQ RNMTKLQLAL (SEC ID N° 53)

5

En otra realización, la proteína WT1 tiene la secuencia expuesta en el N° de acceso del GenBank NM_024426. En otras realizaciones, la proteína WT1 tiene o comprende una de las secuencias expuestas en 1 de las siguientes entradas de secuencia: NM_024425, NM_024424, NM_000378, S95530, D13624, D12496, D12497 o X77549. En otra realización, la proteína WT1 tiene cualquier otra secuencia de WT1 conocida en la técnica.

10

"Péptido", en otra realización de los métodos y las composiciones de la presente invención, se refiere a un compuesto de subunidad AA conectada por enlaces peptídicos. En otra realización, el péptido comprende un análogo de AA. En otra realización, el péptido comprende un peptidomimético. A continuación, se enumeran los diferentes análogos de AA y peptidomiméticos que se pueden incluir en los péptidos de los métodos y las composiciones de la presente invención. Las subunidades están, en otra realización, unidas por enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad está unida por otro tipo de enlace, por ejemplo, éster, éter, etc. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

15

Los péptidos WT1 inalterados y heteróclitos descritos tanto anteriormente como más adelante se denominan colectivamente en el presente documento "péptidos WT1". Cada una de las características enumeradas a continuación para los "péptidos WT1" se refiere a péptidos WT1 inalterados y a péptidos heteróclitos de HLA de clase I y clase II.

20

En otra realización, un péptido WT1 de la presente invención se une a una molécula HLA de clase II. En otra realización, la molécula HLA de clase II es una molécula HLA-DRB. En otra realización, la molécula HLA de clase II es una molécula HLA-DRA. En otra realización, la molécula HLA es una molécula HLA-DQA1. En otra realización, la molécula HLA es una molécula HLA-DQB1. En otra realización, la molécula HLA es una molécula HLA-DPA1. En otra realización, la molécula HLA es una molécula HLA-DPB 1. En otra realización, la molécula HLA es una molécula HLA-DMA. En otra realización, la molécula HLA es una molécula HLA-DMB. En otra realización, la molécula HLA es una molécula HLA-DOA. En otra realización, la molécula HLA es una molécula HLA-DOB. En otra realización, la molécula HLA es cualquier otra molécula HLA de clase II conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

30

En otra realización, un péptido WT1 de los métodos y las composiciones de la presente invención está diseñado para presentar afinidad por una molécula HLA. En otra realización, la afinidad es una alta afinidad, como se describe en el presente documento.

35

Las moléculas HLA, conocidas en otra realización como moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), se unen a péptidos y los presentan a las células inmunes. Por lo tanto, en otra realización, la inmunogenicidad de un péptido está parcialmente determinada por su afinidad por moléculas HLA. Las moléculas HLA de clase I interactúan con las moléculas de CD8, que, en general, están presentes en los linfocitos T citotóxicos (CTL). Las moléculas HLA de clase II interactúan con moléculas de CD4, que, en general, están presentes en los linfocitos T auxiliares.

40

45

En otra realización, un péptido de la presente invención es inmunogénico. En otra realización, "inmunogénico" se refiere a una capacidad de estimular, provocar o participar en una respuesta inmune. En otra realización, la respuesta inmune provocada es una respuesta inmune mediada por células. En otra realización, la respuesta inmune es una combinación de respuestas mediadas por células y humorales.

5 En otra realización, los linfocitos T que se unen al complejo de molécula de MHC-péptido se activan y son inducidos a proliferar y lisar células que expresan una proteína que comprende el péptido. Por lo general, los linfocitos T son inicialmente activados por las células presentadoras de antígeno "profesionales" ("APC"; por ejemplo, células dendríticas, monocitos y macrófagos), que presentan moléculas coestimulantes que fomentan la activación de los
10 linfocitos T en oposición con la anergia o la apoptosis. En otra realización, la respuesta es heteróclita, como se describe en el presente documento, de manera que el CTL lisa una célula neoplásica que expresa una proteína que tiene una secuencia de AA homóloga a un péptido de la presente invención, o un péptido diferente del usado para estimular inicialmente el linfocito T.

15 En otra realización, un encuentro de un linfocito T con un péptido de la presente invención induce su diferenciación en una célula efectora y/o un linfocito T de memoria. Los posteriores encuentros entre la célula efectora o el linfocito T de memoria y el mismo péptido o, en otra realización, con un péptido relacionado de la presente invención, conducen a una respuesta inmune más rápida y más intensa. Dichas respuestas se miden, en otra realización, midiendo el grado de proliferación de la población de linfocitos T expuesta al péptido. En otra realización, dichas
20 respuestas se miden mediante cualquiera de los métodos enumerados más adelante en el presente documento.

En otra realización, los péptidos de los métodos y las composiciones de la presente invención se unen a una molécula HLA de clase II con alta afinidad. En otras realizaciones, la molécula HLA de clase II es cualquier molécula HLA de clase II enumerada en el presente documento. Cada posibilidad representa una realización distinta de la
25 presente invención.

También se desvelan péptidos que se unen a una molécula HLA de clase I con alta afinidad. La molécula de MHC de clase I es cualquier molécula de MHC de clase I enumerada en el presente documento.

30 También se desvela un péptido que se une a una molécula HLA de clase II con una afinidad significativa, mientras que un péptido derivado del péptido original se une a una molécula HLA de clase I con una afinidad significativa.

En otra realización, "afinidad" se refiere a la concentración de péptido necesaria para inhibir la unión de un péptido patrón a la molécula de MHC indicada en 50 %. En otra realización, "alta afinidad" se refiere a que la afinidad es tal
35 que se requiere una concentración de aproximadamente 500 nanomolar (nM) o inferior del péptido para una obtener una inhibición de 50 % de la unión de un péptido patrón. En otra realización, se requiere una concentración de aproximadamente 400 nM o inferior del péptido. En otra realización, la afinidad de unión es de 300 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 200 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 150 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 100 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 80 nM. En otra
40 realización, la afinidad de unión es de 60 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 40 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 30 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 20 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 15 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 10 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 8 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 6 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 4 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 3 nM. En otra realización, la afinidad
45 de unión es 2 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 1,5 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 1 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 0,8 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 0,6 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 0,5 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 0,4 nM. En otra realización, la afinidad de unión es de 0,3 nM. En otra realización, la afinidad de unión es inferior a 0,3 nM.

50 En otra realización, "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de unión a la molécula de MHC. En otra realización, la afinidad se mide usando un método conocido en la técnica para medir las afinidades de unión competitiva. En otra realización, la afinidad se mide usando un método conocido en la técnica para medir las afinidades de unión relativas. En otra realización, el método es un ensayo de unión competitiva. En otra realización, el método es radioinmunoensayo o RIA. En otra realización, el método es el análisis BiaCore. En otra realización, el
55 método es cualquier otro método conocido en la técnica. En otra realización, el método produce una CI_{50} en relación con una CI_{50} de un péptido de referencia de afinidad conocida.

Cada tipo de afinidad y método de medición de la afinidad representa una realización distinta de la presente invención.

60 En otra realización, "alta afinidad" se refiere a una CI_{50} de 0,5-500 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 1-300 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 1,5-200 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 2-100 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 3-100 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 4-100 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 6-100 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 10-100 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 30-100 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 3-80 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 4-60 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 5-50 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 6-50 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 8-50 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 10-50 nM. En otra
65

realización, la CI_{50} es de 20-50 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 6-40 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 8-30 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 10-25 nM. En otra realización, la CI_{50} es de 15-25 nM. Cada afinidad e intervalo de afinidades representa una realización distinta de la presente invención.

- 5 En otra realización, un péptido de los métodos y las composiciones de la presente invención se une a una superfamilia de moléculas HLA. Las superfamilias de moléculas HLA comparten motivos de unión muy similares o idénticos. En una realización, la superfamilia es un superfamilia de HLA de clase II.

10 Las expresiones "péptido de unión a HLA", "péptido de unión a molécula HLA de clase I" y "péptido de unión a molécula HLA de clase II" se refieren, en otra realización, a un péptido que se une a una molécula HLA con una afinidad medible. En otra realización, las expresiones se refieren a un péptido que se une a una molécula HLA con alta afinidad. En otra realización, las expresiones se refieren a un péptido que se une a una molécula HLA con una afinidad suficiente para activar un precursor de linfocitos T. En otra realización, las expresiones se refieren a un péptido que se une a una molécula HLA con una afinidad suficiente para mediar en el reconocimiento por un linfocito T. La molécula HLA es, en otras realizaciones, cualquiera de las moléculas HLA enumeradas en el presente documento. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

20 "Heteróclito" se refiere a un péptido que genera una respuesta inmune que reconoce al péptido original del que se derivó el péptido heteróclito (por ejemplo, el péptido no contiene las mutaciones de los restos de anclaje). Por ejemplo, YMFNPAPYL (SEC ID N° 6) se generó a partir de RMFPNAPYL (SEC ID N° 5) mediante la mutación del resto 1 a tirosina (Ejemplos). "Heteróclito" se puede referir a un péptido que genera una respuesta inmune que reconoce al péptido original del que se derivó el péptido heteróclito, siendo la respuesta inmune generada mediante la vacunación con el péptido heteróclito superior a la respuesta inmune generada mediante la vacunación con el péptido original. Una respuesta inmune "heteróclita" se puede referir a una respuesta inmune que reconoce al péptido original del que se derivó el péptido mejorado (por ejemplo, el péptido no contiene la mutación del resto de anclaje) o a una respuesta inmune que reconoce al péptido original del que se derivó el péptido heteróclito, siendo la magnitud de la respuesta inmune generada por la vacunación con el péptido heteróclito superior a la respuesta inmune generada por la vacunación con el péptido original. La magnitud de la respuesta inmune generada por la vacunación con el péptido heteróclito es superior a la respuesta inmune sustancialmente igual a la respuesta a la vacunación con el péptido original o superior a la respuesta inmune inferior a la respuesta a la vacunación con el péptido original. Los métodos de identificación de los restos de HLA de clase I y clase II, y de mejora de la unión a HLA mediante la mutación de los restos, son bien conocidos en la técnica, como se describe a continuación.

35 También se desvela un péptido heteróclito de HLA de clase II derivado de un péptido WT1 aislado desvelado en el presente documento. El proceso de derivación comprende la introducción de una mutación que aumenta una unión del péptido con una molécula HLA de clase I o una molécula HLA de clase II. La mutación puede estar en un resto de anclaje de HLA de clase II. Un péptido heteróclito de clase II de la presente invención se puede identificar y ensayar de una manera análoga a la identificación y al ensayo de péptidos heteróclitos de HLA de clase I, como se ilustra en el presente documento.

40 El sitio de unión de HLA de clase II en un péptido se puede crear o mejorar mediante la mutación de un resto de anclaje de motivo HLA de clase II. El resto de anclaje que se modifica está en la posición P1, en la posición P2, en la posición P6, en la posición P9, en la posición P3, en la posición P4, en la posición P5, en la posición P6, en la posición P8, en la posición P10, en la posición P11, en la posición P12, en la posición P13 o en cualquier otro resto de anclaje de una molécula HLA de clase II que se conoce en la técnica. Los restos distintos de P1, P2, P6 y P9 sirven como restos de anclaje secundarios. Por lo tanto, la mutación de los mismos puede mejorar la unión del HLA de clase II.

50 Se puede generar un péptido heteróclito mediante la introducción de una mutación que cree un motivo de anclaje. Los "motivos de anclaje" o "restos de anclaje" se refieren a 1 o un conjunto de restos preferidos situados en determinadas posiciones de una secuencia de unión a HLA. La secuencia de unión a HLA puede ser una secuencia de unión a HLA de clase II o una secuencia de unión a HLA de clase I. Las posiciones correspondientes a los motivos de anclaje son las que desempeñan un papel significativo en la unión de la molécula HLA. El resto de anclaje puede ser un motivo de anclaje primario o un motivo de anclaje secundario.

55 Los métodos de predicción de epítomos MHC de clase II son bien conocidos en la técnica. El epítomo MHC de clase II se predijo usando TEPITOPE (Meister G. E., Roberts C. G. et al, "Vaccine" 1995 13: 581-91), EpiMatrix (De Groot A. S., Jesdale B. M. et al, AIDS Res Hum Retroviruses 1997 13: 529-31), el método Predict (Yu K., Petrovsky N. et al, Mol Med. 2002 8: 137- 48), usando algoritmo de predicción de epítomos SYFPEITHI (Ejemplos), Rankpep o cualquier otro método conocido en la técnica.

60 En otra realización, un péptido WT1 de la presente invención se une a 2 moléculas HLA de clase II distintas. En otra realización, el péptido se une a tres moléculas HLA de clase II distintas. En otra realización, el péptido se une a cuatro moléculas HLA de clase II distintas. En otra realización, el péptido se une a cinco moléculas HLA de clase II distintas. En otra realización, el péptido se une a seis moléculas HLA de clase II distintas. En otra realización, el péptido se une a más de seis moléculas HLA de clase II distintas.

5 En otra realización, las moléculas HLA de clase II que se unen por un péptido WT1 de la presente invención están codificadas por dos o más alelos diferentes en un locus de HLA de clase II dado. En otra realización, las moléculas HLA de clase II están codificadas por 3 alelos distintos en un locus. En otra realización, las moléculas HLA de clase II están codificadas por 4 alelos distintos en un locus. En otra realización, las moléculas HLA de clase II están codificadas por 5 alelos distintos en un locus. En otra realización, las moléculas HLA de clase II están codificadas por 6 alelos distintos en un locus. En otra realización, las moléculas HLA de clase II están codificadas por más de seis alelos distintos en un locus.

10 En otra realización, las moléculas HLA de clase II unidas por el péptido WT1 están codificadas por genes del HLA de clase II en 2 locus distintos. En otra realización, las moléculas HLA unidas están codificadas por genes del HLA de clase II en 2 o más locus distintos. En otra realización, las moléculas HLA unidas están codificadas por genes del HLA de clase II en 3 locus distintos. En otra realización, las moléculas HLA unidas están codificadas por genes del HLA de clase II en 3 o más locus distintos. En otra realización, las moléculas HLA unidas están codificadas por genes del HLA de clase II en 4 locus distintos. En otra realización, las moléculas HLA unidas están codificadas por genes del HLA de clase II en 4 o más locus distintos. En otra realización, las moléculas HLA unidas están codificadas por genes del HLA de clase II en 4 locus distintos. En otras realizaciones, los locus se seleccionan entre locus HLA-DRB. En otra realización, el péptido de unión a HLA de clase II es un péptido de unión a HLA-DRA. En otra realización, el péptido es un péptido de unión a HLA-DQA1. En otra realización, el péptido es un péptido de unión a HLA-DQB1. En otra realización, el péptido es un péptido de unión a HLA-DPA1. En otra realización, el péptido es un péptido de unión a HLA-DPB1. En otra realización, el péptido es un péptido de unión a HLA-DMA. En otra realización, el péptido es un péptido de unión a HLA-DMB. En otra realización, el péptido es un péptido de unión a HLA-DOA. En otra realización, el péptido es un péptido de unión a HLA-DOB. En otra realización, el péptido se une a cualquier otra molécula HLA de clase II conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

20 En otra realización, un péptido WT1 de la presente invención se une a 2 moléculas HLA-DRB diferentes. En otra realización, el péptido se une a 3 moléculas HLA-DRB diferentes. En otra realización, el péptido se une a 4 moléculas HLA-DRB diferentes. En otra realización, el péptido se une a 5 moléculas HLA-DRB diferentes. En otra realización, el péptido se une a 6 moléculas HLA-DRB diferentes. En otra realización, el péptido se une a más de 6 moléculas HLA-DRB diferentes.

30 En otra realización, un péptido WT1 de la presente invención se une a las moléculas HLA-DRB que están codificadas por los 2 alelos HLA-DRB diferentes. En otra realización, las moléculas HLA-DRB están codificadas por 3 alelos HLA-DRB diferentes. En otra realización, las moléculas HLA-DRB están codificadas por 4 alelos HLA-DRB diferentes. En otra realización, las moléculas HLA-DRB están codificadas por 5 alelos HLA-DRB diferentes. En otra realización, las moléculas HLA-DRB están codificadas por 6 alelos HLA-DRB diferentes. En otra realización, las moléculas HLA-DRB están codificadas por más de 6 alelos HLA-DRB diferentes. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

40 En otra realización, un péptido WT1 de la presente invención se une a moléculas HLA-DRB que están codificadas por 2 alelos HLA-DRB diferentes seleccionados entre DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101 y DRB 1501. En otra realización, el péptido WT1 se une a moléculas HLA-DRB codificadas por 3 alelos HLA-DRB diferentes seleccionados entre DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101 y DRB 1501. En otra realización, el péptido WT1 se une a moléculas HLA-DRB codificadas por 4 alelos HLA-DRB diferentes seleccionados entre DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101 y DRB 1501. En otra realización, el péptido WT1 se une a moléculas HLA-DRB codificadas por 5 alelos HLA-DRB diferentes seleccionados entre DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101 y DRB 1501. En otra realización, el péptido WT1 se une a moléculas HLA-DRB codificadas por cada uno de los siguientes alelos HLA-DRB: DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101 y DRB 1501. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

50 En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende 2 péptidos WT1 distintos, uno de los cuales consiste en SEC ID N° 2. En otra realización, los 2 péptidos WT1 distintos están inalterados. En otra realización, 1 de los péptidos WT1 (el que consiste en la SEC ID N° 2) está inalterado, mientras que el otro es heteróclito.

55 En otra realización, la composición comprende 3, 4 o 5 péptidos WT1 distintos, uno de los cuales consiste en la SEC ID N° 2.

60 En otra realización, 2 de los péptidos WT1 de la composición están sin modificar. En otra realización, 2 de los péptidos WT1 adicionales de la composición son heteróclitos. En otra realización, 2 de los péptidos WT1 de la composición están sin modificar y 2 son heteróclitos. En otra realización, más de 2 de los péptidos WT1 de la composición están sin modificar. En otra realización, más de 2 de los péptidos WT1 adicionales de la composición son heteróclitos. En otra realización, más de 2 de los péptidos WT1 de la composición están sin modificar y más de 2 de los adicionales son heteróclitos. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

65

En otra realización, 1 de los péptidos WT1 adicionales de una composición de la presente invención tiene una secuencia seleccionada entre las secuencias expuestas en SEC ID N° 1-3. En otra realización, 2 de los péptidos WT1 adicionales tienen una secuencia seleccionada entre las secuencias expuestas en SEC ID N° 1-3. En otra realización, 3 de los péptidos WT1 adicionales tienen una secuencia seleccionada entre las secuencias expuestas en SEC ID N° 1-3.

En otra realización, se utiliza cualquier otro péptido WT1 inmunogénico conocido en la técnica como péptido WT1 adicional. En otra realización, se utiliza cualquier combinación de péptidos WT1 inmunogénicos conocidos en la técnica.

Cada combinación del péptido que consiste en SEC ID N° 2 y al menos un péptido WT1 adicional representa una realización distinta de la presente invención.

Los péptidos heteróclitos de HLA de clase II se pueden derivar del mismo péptido WT1 aislado. Pueden contener mutaciones en diferentes restos de anclaje de la molécula HLA de clase II o contener diferentes mutaciones en los mismos restos de anclaje. Los péptidos heteróclitos de HLA de clase II se pueden derivar de diferentes péptidos WT1 aislados.

El péptido de la invención y el péptido adicional, o dos de los péptidos adicionales se solapan entre sí. El solapamiento entre los péptidos puede ser de al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos (AA).

En otra realización, los péptidos de una composición de la presente invención se unen a 2 moléculas HLA de clase II distintas. En otra realización, los péptidos se unen a 3 moléculas HLA de clase II distintas. En otra realización, los péptidos se unen a 4 moléculas HLA de clase II distintas. En otra realización, los péptidos se unen a 5 moléculas HLA de clase II distintas. En otra realización, los péptidos se unen a más de 5 moléculas HLA de clase II distintas. En otra realización, los péptidos de la composición se unen a las mismas moléculas HLA de clase II.

En otra realización, cada uno de los péptidos WT1 de una composición de la presente invención se une a un conjunto de moléculas HLA de clase II. En otra realización, cada uno de los péptidos WT1 se une a un conjunto distinto de moléculas HLA de clase II. En otra realización, los péptidos WT1 de la composición se unen al mismo conjunto de moléculas HLA de clase II. En otra realización, 2 de los péptidos WT1 se unen a un conjunto distinto pero solapado de moléculas HLA de clase II. En otra realización, 2 o más de los péptidos WT1 se unen al mismo conjunto de moléculas HLA de clase II, mientras que otro de los péptidos WT1 se une a un conjunto distinto. En otra realización, 2 o más de los péptidos WT1 se unen a un conjunto solapado de moléculas HLA de clase II, mientras que otro de los péptidos WT1 se une a un conjunto distinto.

En otra realización, cada uno de 2 o más de los péptidos WT1 de una composición de la presente invención se une a más de 1 molécula HLA-DRB. En otra realización, las 4 o más moléculas HLA-DRB unidas por los péptidos de la composición son distintas entre sí. En otra realización, las moléculas HLA-DRB están codificadas por diferentes alelos de HLA-DRB. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, 2 o más de las moléculas HLA de clase II unidas por péptidos WT1 de una composición de la presente invención son moléculas HLA-DRB. En otra realización, 3 o más de las moléculas HLA de clase II que están unidas son moléculas HLA-DRB. En otras realizaciones, las moléculas HLA de clase II que están unidas pueden ser cualquiera de las moléculas HLA de clase II enumeradas en el presente documento. En otra realización, las moléculas HLA de clase II que están unidas están codificadas por 2 o más alelos de HLA de clase II distintos en un locus dado. En otra realización, las moléculas HLA de clase II que están unidas están codificadas por genes de HLA de clase II en 2 o más locus distintos.

Cada una de las composiciones anteriores representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, un "conjunto de moléculas HLA de clase II" se refiere a las moléculas HLA de clase II codificadas por diferentes alelos en un determinado locus. En otra realización, la expresión se refiere a moléculas HLA de clase II con una determinada especificidad de unión. En otra realización, la expresión se refiere a moléculas HLA de clase II con una determinada secuencia peptídica de consenso. En otra realización, la expresión se refiere a una superfamilia de moléculas HLA de clase II. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase II no modificado de la presente invención (que consiste en SEC ID N° 2) y un segundo péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I y, opcionalmente, un péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase II adicional. En otra realización, la composición comprende más de un péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I, además del péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase II que consiste en SEC ID N° 4. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, la secuencia de AA del péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I comprende una secuencia seleccionada entre SEC ID N° 5-38. En otra realización, la secuencia de AA del péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase se selecciona entre las secuencias expuestas en la SEC ID N° 5-38. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

5 En otras realizaciones, la molécula HLA de clase I unida por el péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I está codificada por cualquiera de los genes de HLA-A. En otras realizaciones, la molécula HLA de clase I está codificada por cualquiera de los genes de HLA-B. En otras realizaciones, la molécula HLA de clase I está codificada por cualquiera de los genes de HLA-C. En otra realización, la molécula HLA de clase I es una molécula HLA-0201.
10 En otra realización, la molécula es HLA A1. En otras realizaciones, la molécula es HLA A3.2, HLA A11, HLA A24, HLA B7, HLA B8, HLA B27 o HLA A2, A3, A4, A5 o B8. HLA A1, HLA A2.1 o HLA A3.2. En otra realización, la molécula HLA de clase II está codificada por cualquiera de los genes HLA HLA-DP, -DQ o -DR. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

15 En otra realización, el péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I de los métodos y las composiciones de la presente invención se une a una superfamilia de moléculas HLA de clase I. En otra realización, la superfamilia es la superfamilia A2. En otra realización, la superfamilia es la superfamilia A3. En otra realización, la superfamilia es la superfamilia A24. En otra realización, la superfamilia es la superfamilia B7. En otra realización, la superfamilia es la superfamilia B27. En otra realización, la superfamilia es la superfamilia B44. En otra realización, la superfamilia es la superfamilia C1. En otra realización, la superfamilia es la superfamilia C4. En otra realización, la superfamilia es cualquier otra superfamilia conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención. En otra realización, la molécula HLA es HLA A0201.
20

En otra realización, el péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I es un péptido heteróclito de HLA de clase I. En otra realización, el péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I contiene una mutación en un resto de anclaje de molécula HLA de clase I del mismo, como se describe más detalladamente en el presente documento. Según lo estipulado en el presente documento, los péptidos derivados de WT1 se modificaron en restos de anclaje a HLA para generar péptidos heteróclitos con una mayor unión predicha a HLA-A0201 y HLA-A0301. Los péptidos con una mayor unión predicha también mostraron una mayor capacidad para unirse a moléculas HLA de clase I y una mayor inmunogenicidad.
25
30

En otra realización, la mutación que aumenta la unión al MHC está en el resto situado en la posición 1 del péptido heteróclito de HLA de la clase I. En otra realización, el resto se cambia a tirosina. En otra realización, el resto se cambia a glicina. En otra realización, el resto se cambia a treonina. En otra realización, el resto se cambia a fenilalanina. En otra realización, el resto se cambia a cualquier otro resto conocido en la técnica. En otra realización, una sustitución en la posición 1 (por ejemplo, a tirosina) estabiliza la unión del resto de anclaje de la posición 2.
35

En otra realización, la mutación está en la posición 2 del péptido heteróclito de HLA de la clase I. En otra realización, el resto se cambia a leucina. En otra realización, el resto se cambia a valina. En otra realización, el resto se cambia a isoleucina. En otra realización, el resto se cambia a metionina. En otra realización, el resto se cambia a cualquier otro resto conocido en la técnica.
40

En otra realización, la mutación está en la posición 6 del péptido heteróclito de HLA de la clase I. En otra realización, el resto se cambia a valina. En otra realización, el resto se cambia a cisteína. En otra realización, el resto se cambia a glutamina. En otra realización, el resto se cambia a histidina. En otra realización, el resto se cambia a cualquier otro resto conocido en la técnica.
45

En otra realización, la mutación está en la posición 9 del péptido heteróclito de HLA de la clase I. En otra realización, la mutación cambia el resto de la posición C-terminal del mismo. En otra realización, el resto se cambia a valina. En otra realización, el resto se cambia a treonina. En otra realización, el resto se cambia a isoleucina. En otra realización, el resto se cambia a leucina. En otra realización, el resto se cambia a alanina. En otra realización, el resto se cambia a cisteína. En otra realización, el resto se cambia a cualquier otro resto conocido en la técnica.
50

En otra realización, la mutación puntual está en un resto de anclaje primario. En otra realización, los restos de anclaje primarios de HLA de clase I son las posiciones 2 y 9. En otra realización, la mutación puntual está en un resto de anclaje secundario. En otra realización, los restos de anclaje secundarios de HLA de clase I son las posiciones 1 y 8. En otra realización, los restos de anclaje secundarios de HLA de clase I son las posiciones 1, 3, 6, 7 y 8. En otra realización, la mutación puntual está en una posición seleccionada entre las posiciones 4, 5 y 8. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.
55
60

En otra realización, la mutación puntual está en 1 o más restos situados en posiciones seleccionadas entre las posiciones 1, 2, 8 y 9 del motivo de unión a HLA de clase I. En otra realización, la mutación puntual está en 1 o más restos situados en posiciones seleccionadas entre las posiciones 1, 3, 6 y 9. En otra realización, la mutación puntual está en 1 o más restos situados en posiciones seleccionadas entre las posiciones 1, 2, 6 y 9. En otra realización, la mutación puntual está en 1 o más restos situados en posiciones seleccionadas entre las posiciones 1, 6 y 9. En otra realización, la mutación puntual está en 1 o más restos situados en posiciones seleccionadas entre las posiciones 1,
65

- 2 y 9. En otra realización, la mutación puntual está en 1 o más restos situados en posiciones seleccionadas entre las posiciones 1, 3 y 9. En otra realización, la mutación puntual está en 1 o más restos situados en posiciones seleccionadas entre las posiciones 2 y 9. En otra realización, la mutación puntual está en 1 o más restos situados en posiciones seleccionadas entre las posiciones 6 y 9. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.
- 5 Cada uno de los restos de anclaje y sustituciones anteriores representa una realización distinta de la presente invención.
- 10 En otra realización, el péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I comprende una secuencia seleccionada entre SEC ID N° 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24-26, 28-30, 32-34 y 36-38. En otra realización, el péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I tiene una secuencia seleccionada entre las secuencias expuestas en SEC ID N° 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24-26, 28-30, 32-34 y 36-38.
- 15 En otra realización, el péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I tiene una longitud de 9-13 AA. En otra realización, la longitud es de 8-13 AA. En otra realización, el péptido tiene cualquiera de las longitudes de un péptido de la presente invención enumerado en el presente documento.
- 20 En otra realización, el péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I tiene una longitud de 9 AA. En otra realización, el péptido tiene una longitud de 10 AA. Según lo estipulado en el presente documento, los péptidos nativos y heteróclitos de 9-10 AA presentaron una unión sustancial a moléculas HLA de clase I y capacidad para generar la secreción de citocinas y la citólisis por CTL.
- 25 En otra realización, la molécula HLA de clase I que está unida por el péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I es una molécula HLA-A. En otra realización, la molécula HLA de clase I es una molécula HLA-A2. En otra realización, la molécula HLA de clase I es una molécula HLA-A3. En otra realización, la molécula HLA de clase I es una molécula HLA-A11. En otra realización, la molécula HLA de clase I es una molécula HLA-B8. En otra realización, la molécula HLA de clase I es una molécula HLA-0201. En otra realización, la molécula HLA de clase I se une a cualquier otra molécula HLA de clase I conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.
- 30 En otra realización, un péptido WT1 de los métodos y las composiciones de la presente invención tiene una longitud de 8-30 aminoácidos. En otra realización, el péptido tiene una longitud de 9-11 AA. En otra realización, el péptido varía en tamaño de 7 a 25 AA, o en otra realización, de 8 a 11, o en otra realización, de 8 a 15, o en otra realización, de 9 a 20, o en otra realización, de 9 a 18, o en otra realización, de 9 a 15, o en otra realización, de 8 a 12, o en otra realización, de 9 a 11 AA de longitud. En otra realización, el péptido tiene una longitud de 8 AA, o en otra realización, de 9 AA o, en otra realización, de 10 AA o, en otra realización, de 12 AA o, en otra realización, de 25 AA de longitud o, en otra realización, cualquier longitud entre las mismas. En otra realización, el péptido es de mayor longitud, por ejemplo, de 50 o 100, o más. En dicha realización, la célula procesa el péptido hasta una longitud de 7 y 25 AA de longitud. En dicha realización, la célula procesa el péptido hasta una longitud de 9 a 11 AA. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.
- 35 En otra realización, el péptido adicional es de 15-23 AA de longitud. En otra realización, la longitud es de 15-24 AA. En otra realización, la longitud es de 15-25 AA. En otra realización, la longitud es de 15-26 AA. En otra realización, la longitud es de 15-27 AA. En otra realización, la longitud es de 15-28 AA. En otra realización, la longitud es de 14-30 AA. En otra realización, la longitud es de 14-29 AA. En otra realización, la longitud es de 14-28 AA. En otra realización, la longitud es de 14-26 AA. En otra realización, la longitud es de 14-24 AA. En otra realización, la longitud es de 14-22 AA. En otra realización, la longitud es de 14-20 AA. En otra realización, la longitud es de 16-30 AA. En otra realización, la longitud es de 16-28 AA. En otra realización, la longitud es de 16-26 AA. En otra realización, la longitud es de 18-30 AA. En otra realización, la longitud es de 18-28 AA. En otra realización, la longitud es de 18-26 AA. En otra realización, la longitud es de 18-24 AA. En otra realización, la longitud es de 18-22 AA. En otra realización, la longitud es de 18-20 AA. En otra realización, la longitud es de 20-30 AA. En otra realización, la longitud es de 20-28 AA. En otra realización, la longitud es de 20-26 AA. En otra realización, la longitud es de 20-24 AA. En otra realización, la longitud es de 22-30 AA. En otra realización, la longitud es de 22-28 AA. En otra realización, la longitud es de 22-26 AA. En otra realización, la longitud es de 24-30 AA. En otra realización, la longitud es de 24-28 AA. En otra realización, la longitud es de 24-26 AA.
- 45 Cada uno de los péptidos anteriores, longitudes de péptidos y tipos de péptidos representa una realización distinta de las composiciones de la presente invención.
- 50 En otra realización, se realizan modificaciones menores a los péptidos adicionales de las composiciones de la presente invención sin reducir su afinidad hacia moléculas HLA ni cambiar su especificidad hacia TCR, utilizando principios bien conocidos en la técnica. En el caso de los péptidos de unión a HLA de clase I, "modificaciones menores" se refiere, en otra realización, por ejemplo, a inserción, eliminación o sustitución de un AA, inclusive, o la eliminación o adición de 1-3 AA fuera de los restos de entre 2 y 9, ambos inclusive. Aunque los algoritmos
- 55
- 60
- 65

informáticos descritos en el presente documento son útiles para predecir el potencial de unión a MHC de clase I de los péptidos, tienen 60-80 % de precisión predictiva; y, por lo tanto, los péptidos se deben evaluar empíricamente antes de realizar una determinación final de la afinidad de unión a MHC de clase I. Por lo tanto, los péptidos adicionales de las composiciones de la presente invención no se limitan a los péptidos predichos por los algoritmos que presentan una fuerte afinidad de unión a MHC de clase I. Los tipos son modificaciones que se pueden realizar que se enumeran a continuación. Cada modificación representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización de las composiciones, un péptido adicional enumerado en los el apartado de Ejemplos de la presente invención se modifica adicionalmente mediante la mutación de un resto de anclaje en un resto de anclaje a MHC de clase I preferido, que puede ser, en otras realizaciones, cualquiera de los restos de anclaje enumerados en el presente documento. En otra realización, un péptido adicional de las composiciones de la presente invención que contiene un resto de anclaje a MHC de clase I preferido se modifica adicionalmente mediante la mutación del resto de anclaje en un resto de anclaje a MHC de clase I preferido diferente para esa ubicación. El resto preferido diferente puede ser, en otras realizaciones, cualquiera de los restos preferidos enumerados en el presente documento.

En otra realización de las composiciones, el resto de anclaje del péptido adicional que se modifica adicionalmente está en la posición 1. En otra realización, el resto de anclaje está en la posición 2. En otra realización, el resto de anclaje está en la posición 3. En otra realización, el resto de anclaje está en la posición 4. En otra realización, el resto de anclaje está en la posición 5. En otra realización, el resto de anclaje está en la posición 6. En otra realización, el resto de anclaje está en la posición 7. En otra realización, el resto de anclaje está en la posición 8. En otra realización, el resto de anclaje está en la posición 9. En el caso de péptidos de unión a HLA de clase I, los restos distintos de 2 y 9 pueden servir como restos de anclaje secundarios. Por lo tanto, la mutación de los mismos puede mejorar la unión al MHC de clase I. Cada posibilidad representa una realización distinta de las composiciones de la presente invención.

En otra realización, el péptido adicional de las composiciones de la presente invención es una variante de longitud de un péptido enumerado en los ejemplos. En otra realización, la variante de longitud es un aminoácido (AA) más corto que el péptido de los Ejemplos. En otra realización, la variante de longitud es dos AA más corto que el péptido de los Ejemplos. En otra realización, la variante de longitud es más de dos AA más corto que el péptido de los Ejemplos. En otra realización, el péptido más corto está truncado en el extremo N-terminal. En otra realización, el péptido más corto está truncado en el extremo C-terminal. En otra realización, el péptido truncado está truncado en ambos extremos N-terminal y C-terminal. Los péptidos son, en otra realización, susceptibles al truncamiento sin cambiar la afinidad hacia las moléculas HLA, como es bien conocido en la técnica.

Cada uno de los péptidos truncados anteriores representa una realización distinta de las composiciones de la presente invención.

En otra realización de las composiciones, la variante de longitud del péptido adicional es más larga que un péptido enumerado en los ejemplos de la presente invención. En otra realización, el péptido más largo se extiende en el extremo N-terminal de acuerdo con la secuencia de WT1 circundante. Los péptidos son, en otra realización, susceptibles a la extensión en el extremo N-terminal sin cambiar la afinidad hacia las moléculas HLA, como es bien conocido en la técnica. Dichos péptidos son, por tanto, equivalentes de los péptidos enumerados en los ejemplos. En otra realización, el péptido extendido N-terminal está extendido en un resto. En otra realización, el péptido extendido N-terminal está extendido en dos restos. En otra realización, el péptido extendido N-terminal está extendido en tres restos. En otra realización, el péptido extendido N-terminal está extendido en más de tres restos.

En otra realización de las composiciones, el péptido adicional más largo se extiende en el extremo C-terminal de acuerdo con la secuencia de WT1 circundante. Los péptidos son, en otra realización, susceptibles a la extensión en el extremo C-terminal sin cambiar la afinidad hacia las moléculas HLA, como es bien conocido en la técnica. Dichos péptidos son, por tanto, equivalentes de los péptidos enumerados en los ejemplos de la presente invención. En otra realización, el péptido extendido C-terminal está extendido en un resto. En otra realización, el péptido extendido C-terminal está extendido en dos restos. En otra realización, el péptido extendido C-terminal está extendido en tres restos. En otra realización, el péptido extendido C-terminal está extendido en más de tres restos.

En otra realización de las composiciones, el péptido adicional extendido se extiende en el extremo tanto N-terminal como C-terminal de acuerdo con la secuencia de WT1 circundante.

Cada uno de los péptidos adicionales extendidos anteriores representa una realización distinta de las composiciones de la presente invención.

En otra realización de las composiciones, un péptido adicional truncado conserva los restos de anclaje a HLA (por ejemplo, los restos de anclaje a HLA de clase I) en el segundo resto y el resto C-terminal, con un número menor de restos intermedios (por ejemplo, 5) que un péptido enumerado en los ejemplos de la presente invención. Los péptidos son, en otra realización, susceptibles a dicha mutación sin cambiar la afinidad hacia las moléculas HLA. En otra realización, dicho péptido truncado se diseña mediante la eliminación de uno de los restos intermedios de una

de las secuencias anteriores. En otra realización, los restos de anclaje a HLA están conservados en el segundo y octavo resto. En otra realización, los restos de anclaje a HLA están conservados en el primer y octavo resto. Cada posibilidad representa una realización distinta de las composiciones de la presente invención.

5 En otra realización de las composiciones, un péptido adicional extendido conserva los restos de anclaje a HLA (por ejemplo, los restos de anclaje a HLA de clase I) en el segundo resto y el resto C-terminal, con un mayor número de restos intermedios (por ejemplo, 7 o 8) que un péptido enumerado en los ejemplos de la presente invención. En otra realización, dicho péptido extendido se diseña mediante la adición de uno o más restos entre dos de los restos intermedios de una de las secuencias anteriores. Es bien conocido en la técnica que los restos se pueden retirar de
10 o añadirse entre las secuencias intermedias de los péptidos de unión a HLA sin cambiar la afinidad hacia HLA. Dichos péptidos son, por tanto, equivalentes de los péptidos enumerados en los ejemplos de la presente invención. En otra realización, los restos de anclaje a HLA están conservados en el segundo y noveno resto. En otra realización, los restos de anclaje a HLA están conservados en el primer y octavo resto. En otra realización, los restos de anclaje a HLA están conservados en los dos restos separados por seis restos intermedios. Cada posibilidad
15 representa una realización distinta de la composición de la presente invención.

"Fragmento", en otra realización de las composiciones, se refiere a un péptido adicional de 11 o más AA de longitud. En otra realización, un fragmento de péptido de la presente invención es de 16 o más AA de longitud. En otra realización, el fragmento es de 12 o más AA de longitud. En otra realización, el fragmento es de 13 o más AA. En otra realización, el fragmento es de 14 o más AA. En otra realización, el fragmento es de 15 o más AA. En otra realización, el fragmento es de 17 o más AA. En otra realización, el fragmento es de 18 o más AA. En otra realización, el fragmento es de 19 o más AA. En otra realización, el fragmento es de 22 o más AA. En otra realización, el fragmento es de 8-12 AA. En otra realización, el fragmento es de aproximadamente 8-12 AA. En otra realización, el fragmento es de 16-19 AA. En otra realización, el fragmento es de aproximadamente 16-19 AA. En otra realización, el fragmento es de 10-25 AA. En otra realización, el fragmento es de aproximadamente 10-25 AA. En otra realización, el fragmento tiene cualquier otra longitud. Cada posibilidad representa una realización distinta de las composiciones de la presente invención.

"Fragmento de una proteína WT1", en otra realización, se refiere a cualquiera de las definiciones de "fragmento" encontradas en el presente documento.

Según lo estipulado en el presente documento, las células de mesotelioma expresan la proteína WT1 (Ejemplo 7). Además, las células de mesotelioma procesan y presentan péptidos desvelados en el presente documento o los correspondientes péptidos nativos (Ejemplo 5). Por otra parte, la presentación es lo suficientemente potente como para generar respuestas inmunes específicas contra WT1 (Ejemplo 5). Por lo tanto, las células de mesotelioma pueden ser diana de la terapia inmune contra WT1.

En otra realización de las composiciones, un péptido adicional es homólogo a un péptido enumerado en los ejemplos. Los términos "homología", "homólogo", etc., cuando se refieren a cualquier proteína o péptido, se refieren, en otra realización, a un porcentaje de restos de aminoácidos de la secuencia candidata que son idénticos a los restos de un polipéptido nativo correspondiente, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de homología, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Los métodos y programas informáticos para el alineamiento son bien conocidos en la técnica.

En otra realización, el término "homología", cuando se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico, indica de manera similar un porcentaje de nucleótidos de una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico nativa correspondiente.

En otra realización, la homología se determina mediante el algoritmo informático para la alineación de secuencias, mediante métodos bien descritos en la técnica. En otras realizaciones, el análisis mediante el algoritmo informático de la homología de las secuencias de ácido nucleico incluye la utilización de cualquier número de paquetes informáticos disponibles tales como, por ejemplo, el paquete BLAST, DOMAIN, BEAUTY (herramienta de alineación mejorada de BLAST), GENPEPT y TREMBL.

En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 70 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 72 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 75 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 78 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 80 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 82 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 83 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 85 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 87 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre

SEC ID N°: 1-38 superior a 88 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 90 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 92 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 93 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 95 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 96 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 97 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 98 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 superior a 99 %. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-38 de 100 %. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, la homología se determina a través de la determinación de la hibridación de la secuencia candidata, cuyos métodos están bien descritos en la técnica (véase, por ejemplo, "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1985); Sambrook et al., 2001, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, N. Y. y Ausubel et al., 1989, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y). En otras realizaciones, los métodos de hibridación se llevan a cabo, en condiciones de moderadas a rigurosas, con el complemento de una ADN que codifica un péptido caspasa nativo. Las condiciones de hibridación son, por ejemplo, la incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende: formamida al 10-20 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado.

Cada uno de los homólogos y variantes de péptidos anteriores enumerados en los ejemplos representa una realización distinta de las composiciones de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un péptido que consiste en SEC ID N° 2. En otra realización, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición comprende además un adyuvante. En otra realización, la composición comprende un péptido que consiste en SEC ID N° 2 y al menos 1 péptido desvelado en el presente documento. En otra realización, la composición comprende además cualquiera de los aditivos, compuestos o excipientes expuestos a continuación en el presente documento. En otra realización, el adyuvante es KLH, QS21, adyuvante completo o incompleto de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, BCG o alumbre. En otras realizaciones, el vehículo es cualquier vehículo enumerado en el presente documento. En otras realizaciones, el adyuvante es cualquier adyuvante enumerado en el presente documento. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un péptido de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una célula presentadora de antígeno (APC) y un péptido de la presente invención. En otra realización, la vacuna comprende además un vehículo. En otra realización, la vacuna comprende además un adyuvante. En otra realización, la vacuna comprende además una APC. En otra realización, la vacuna comprende además una combinación de más de 1 de un antígeno, vehículo y/o APC. En otra realización, la vacuna es una composición a base de células. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, el término "vacuna" se refiere a un material o una composición que, cuando se introduce en un sujeto, proporciona una respuesta profiláctica o terapéutica hacia una determinada enfermedad, afección o síntoma del mismo. En otra realización, la presente invención comprende vacunas a base de péptidos, en las que el péptido comprende cualquier realización enumerada en el presente documento, incluyendo compuestos inmunomoduladores tales como citocinas, adyuvantes, etc.

En otra realización, una vacuna de los métodos y las composiciones de la presente invención comprende además un adyuvante. En otra realización, el adyuvante es Montanide ISA 51. Montanide ISA 51 contiene un aceite metabolizable natural y un emulsionante refinado. En otra realización, el adyuvante es GM-CSF. La GM-CSF recombinante es una proteína humana cultivada, en otra realización, en un vector de levadura (*S. cerevisiae*). GM-CSF potencia la expansión clonal y la diferenciación de células hematopoyéticas progenitoras, APC, y células dendríticas y linfocitos T.

En otra realización, el adyuvante es una citocina. En otra realización, el adyuvante es un factor de crecimiento. En otra realización, el adyuvante es una población de células. En otra realización, el adyuvante es QS21. En otra realización, el adyuvante es adyuvante incompleto de Freund. En otra realización, el adyuvante es fosfato de aluminio. En otra realización, el adyuvante es hidróxido de aluminio. En otra realización, el adyuvante es BCG. En otra realización, el adyuvante es alumbre. En otra realización, el adyuvante es una interleucina. En otra realización, el adyuvante es una quimiocina. En otra realización, el adyuvante es cualquier otro tipo de adyuvante conocido en la técnica. En otra realización, la vacuna contra WT1 comprende los dos adyuvantes anteriores. En otra realización, la

vacuna contra WT1 comprende más de los dos adyuvantes anteriores. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

5 En otras realizaciones, una vacuna o composición de la presente invención puede comprender un péptido que consiste en SEC ID N° 2 en combinación con cualquiera de las realizaciones de los péptidos WT1 desvelados en el presente documento. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

10 Se ha de entender que se puede emplear cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, en relación con los péptidos, las vacunas y las composiciones de la presente invención en cualquiera de los usos de la presente invención. Cada combinación de péptido, vacuna o composición con un uso representa una realización de la misma.

15 En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna de la invención para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con un cáncer que expresa WT1, que comprende administrar al sujeto una vacuna contra WT1 de la presente invención, tratando así un sujeto con un cáncer que expresa WT1.

20 En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna de la invención para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con MDS, que comprende administrar al sujeto una vacuna contra WT1 de la presente invención, tratando así un sujeto con MDS.

25 En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna de la invención para su uso en un método de inhibición o detención de la progresión de un cáncer que expresa WT1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una vacuna contra WT1 de la presente invención, inhibiendo o deteniendo así la progresión de un cáncer que expresa WT1.

30 En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna de la invención para su uso en un método de reducción de la incidencia de un cáncer que expresa WT1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una vacuna contra WT1 de la presente invención, reduciendo así la incidencia de un cáncer que expresa WT1 en un sujeto.

35 En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna de la invención para su uso en un método de reducción de la incidencia de AML en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una vacuna contra WT1 de la presente invención, reduciendo así la incidencia de AML.

40 En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna de la invención para su uso en un método de reducción de la incidencia de la recaída de un cáncer que expresa WT1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una vacuna contra WT1 de la presente invención, reduciendo así la incidencia de recaída de un cáncer que expresa WT1 en un sujeto.

45 En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna de la invención para su uso en un método de reducción de la incidencia de la recaída de AML en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una vacuna contra WT1 de la presente invención, reduciendo así la incidencia de la recaída de AML en un sujeto.

50 En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna de la invención para su uso en un método de ruptura de una tolerancia de los linfocitos T de un sujeto a un cáncer que expresa WT1, que comprende administrar al sujeto una vacuna contra WT1 de la presente invención, rompiendo así una tolerancia de los linfocitos T a un cáncer que expresa WT1.

55 También se desvela un método de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer que expresa WT1 que comprende (a) inducir en un donante la formación y la proliferación de los linfocitos T citotóxicos humanos (CTL) que reconocen una célula maligna del cáncer mediante un método desvelado en el presente documento; y (b) infundir los CTL humanos en el sujeto, tratando así un sujeto que tiene un cáncer.

60 También se desvela un método de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer que expresa WT1, que comprende (a) inducir la formación y proliferación ex vivo de CTL humanos que reconocen una célula maligna del cáncer mediante un método desvelado en el presente documento, en el que las células inmunes humanas se obtienen de un donante; y (b) infundir los CTL humanos en el sujeto, tratando de este modo un sujeto que tiene un cáncer.

65 Los métodos para la inmunoterapia ex vivo son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente de EE.UU. N° de serie 2006/0057130, 2005/0221481, 2005/0214268, 2003/0175272, 2002/0127718 y la patente de EE.UU. N° 5.229.115, que se incorporan en el presente documento por referencia. Hay métodos adicionales bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Davis I. D. et al ("Blood dendritic cells generated with Flt3 ligand and CD40 ligand prime CD8+ T cells efficiently in cancer patients". J Immunother. Septiembre-octubre de 2006; 29(5):499-511) y Mitchell M. S. et al ("The cytotoxic T cell response to peptide analogs of the HLA-A*0201 -restricted MUC1 signal sequence epitope, M1.2". Cancer Immunol Immunother. 28 de julio de 2006). Cada método representa una realización distinta de la presente invención.

5 También se desvela un método de inducción de la formación y proliferación de CTL específicos de las células de un cáncer que expresa WT1, comprendiendo el método la puesta en contacto de una población de linfocitos con una vacuna de la presente invención. La vacuna puede ser una APC asociada con un péptido de la presente invención o una APC asociada con una mezcla de péptidos de la presente invención.

10 También se desvela un método de generación de una respuesta inmune heteróclita en un sujeto, en el que la respuesta inmune heteróclita se dirige contra un cáncer que expresa WT1; método que comprende la administración al sujeto de una vacuna de la presente invención, generando de este modo una respuesta inmune heteróclita.

15 En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un péptido que consiste en SEC ID N° 2 para su uso en un método de inducción de una respuesta inmune anti-mesotelioma en un sujeto, que comprende la etapa de poner en contacto el sujeto con dicha composición inmunogénica, induciendo así una respuesta inmune anti-mesotelioma en un sujeto. En otra realización, el mesotelioma es un mesotelioma maligno. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

20 También se desvela un método de inducción de una respuesta inmune anti-mesotelioma en un sujeto; método que comprende la etapa de poner en contacto el sujeto con una composición inmunogénica que comprende una molécula de nucleótidos que codifica (a) una proteína WT1; o (b) un fragmento de una proteína WT1, induciendo así una respuesta inmune anti-mesotelioma en un sujeto. El mesotelioma puede ser un mesotelioma maligno.

25 En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un péptido que consiste en SEC ID N° 2 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con un mesotelioma, que comprende la etapa de administrar al sujeto dicha composición inmunogénica, tratando así un sujeto con un mesotelioma. En otra realización, el mesotelioma es un mesotelioma maligno. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

30 También se desvela un método de tratamiento de un sujeto con un mesotelioma; método que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición inmunogénica que comprende una molécula de nucleótidos que codifica (a) una proteína WT1; o (b) un fragmento de una proteína WT1, tratando así un sujeto con un mesotelioma. El mesotelioma puede ser un mesotelioma maligno.

35 En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un péptido que consiste en SEC ID N° 2 para su uso en un método de reducción de una incidencia de un mesotelioma, o su recaída, en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto dicha composición inmunogénica, reduciendo así la incidencia de una mesotelioma, o su recaída, en un sujeto. En otra realización, el mesotelioma es un mesotelioma maligno. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

40 También se desvela un método de reducción de una incidencia de un mesotelioma, o su recaída, en un sujeto; método que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición inmunogénica que comprende una molécula de nucleótidos que codifica (a) una proteína WT1; o (b) un fragmento de una proteína WT1, reduciendo así la incidencia de una mesotelioma, o su recaída, en un sujeto. El mesotelioma puede ser un mesotelioma maligno.

45 En otra realización, una célula diana de una respuesta inmune provocada mediante un método de la presente invención presenta el péptido WT1 de la presente invención, o un fragmento de WT1 correspondiente, en una molécula HLA. En otra realización, la molécula HLA es una molécula HLA de clase I. En otras realizaciones, la molécula HLA es cualquier subtipo de HLA de clase I o molécula HLA de clase I conocida en la técnica. En otra realización, la respuesta inmune contra el péptido WT1 o fragmento de WT1 es una respuesta inmune heteróclita. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

50 En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es una leucemia mielógena aguda (AML). En otra realización, el cáncer que expresa WT1 está asociado con un síndrome mielodisplásico (MDS). En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un MDS. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un tumor de Wilms. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es una leucemia. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer hematológico. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un linfoma. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un tumor desmoplásico de células pequeñas redondas. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un mesotelioma. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un mesotelioma maligno. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer gástrico. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer de colon. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer de pulmón. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer de mama. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un tumor de células germinales. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer de ovario. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer de útero. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer de tiroides. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un carcinoma hepatocelular. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer de tiroides. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer de hígado. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un cáncer renal. En otra realización, el cáncer que

expresa WT1 es un sarcoma de Kaposi. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un sarcoma. En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es cualquier otro carcinoma o sarcoma.

En otra realización, el cáncer que expresa WT1 es un tumor sólido. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer que expresa WT1. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un síndrome mielodisplásico (MDS). En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer de pulmón. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer de mama. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer colorrectal. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer de próstata. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer de ovario. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer renal. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer de páncreas. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer de cerebro. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer gastrointestinal. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un cáncer de piel. En otra realización, el tumor sólido está asociado con un melanoma.

Un cáncer o tumor tratado mediante los usos de la presente invención expresa WT1.

Cada tipo de cáncer que expresa WT1 o tumor representa una realización distinta de la presente invención.

Cualquiera de las realizaciones enumeradas en el presente documento, en relación con los péptidos, las vacunas y las composiciones de la presente invención, se puede emplear en cualquiera de los métodos de la presente invención, representando cada uno una realización de la misma.

En otra realización, en los métodos de la presente invención, se usan múltiples péptidos desvelados en el presente documento para estimular una respuesta inmune.

Según lo establecido en el presente documento, los péptidos desvelados en el presente documento provocan respuestas de linfocitos T CD8⁺ (Ejemplos 1-2) y respuestas de linfocitos T CD4⁺ (Ejemplos 3-4) específicas del antígeno. Los linfocitos T CD4⁺ reconocen los péptidos unidos a la molécula HLA de clase II en APC. En otra realización, las respuestas de los linfocitos T CD4⁺ específicas del antígeno ayudan en la inducción y el mantenimiento de las respuestas de los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺. En otra realización, los linfocitos CD4⁺ activados aumentan la inmunidad autorizando a las células dendríticas, sosteniendo así la activación y la supervivencia de los linfocitos T citotóxicos. En otra realización, los linfocitos T CD4⁺ activados provocan la muerte de células tumorales mediante el contacto directo con la célula tumoral o mediante la activación de la vía de apoptosis. Las células de tumores de mesotelioma, por ejemplo, son capaces de procesar y presentar antígenos en el contexto de las moléculas HLA de clase I y clase II.

En otra realización, las vacunas de la presente invención tienen la ventaja de activar o generar linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ que reconocen los antígenos WT1. En otra realización, la activación o generación de linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ proporciona una respuesta inmune sinérgica contra WT1, relativa a la activación de cualquier población sola.

Los expertos en la materia entenderán que los métodos desvelados en el presente documento permiten el diseño de otros péptidos derivados de WT1. Los métodos permiten además el diseño de péptidos que se unen a otras moléculas HLA. Los métodos permiten además el diseño de vacunas que combinan los péptidos derivados de WT1 desvelados en el presente documento.

En otra realización, las vacunas de la presente invención tienen la ventaja de activar o generar linfocitos T CD4⁺ específicos de WT1 que contienen una variedad de alelos HLA de clase II diferentes. En otra realización, las vacunas tienen la ventaja de activar o generar linfocitos T CD4⁺ específicos de WT1 en una proporción sustancial de la población (por ejemplo, en diferentes realizaciones, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de 95 %). En otra realización, las vacunas activan o generan linfocitos T CD4⁺ específicos de WT1 en una proporción sustancial de una determinada población (por ejemplo, caucásicos estadounidenses). Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, los usos de la presente invención proporcionan una mejora de una respuesta inmune que ya ha sido elevada por un sujeto. En otra realización, los usos de la presente invención comprenden la administración del péptido, de la composición o de la vacuna 2 o más veces. En otra realización, los péptidos varían en su composición, concentración o en una combinación de ambas. En otra realización, los péptidos proporcionan el inicio de una respuesta inmune contra un antígeno de interés en un sujeto que todavía no ha iniciado una respuesta inmune contra el antígeno. En otra realización, los CTL que son inducidos proliferan en respuesta a la presentación del péptido en la célula APC o cancerosa. En otras realizaciones, la referencia a la modulación de la respuesta inmune implica la rama humoral y/o mediada por células del sistema inmune, que viene acompañada de la presencia de linfocitos T auxiliares Th2 y Th1, respectivamente, o en otra realización, cada rama individualmente.

En otras realizaciones, los usos que afectan al crecimiento de un tumor producen (1) la inhibición directa de la división celular tumoral; o (2) la lisis de células tumorales mediada por células inmunes; o ambas, lo que conduce a una supresión de la red de expansión de las células tumorales.

5 El experto habitual en la materia puede determinar fácilmente la inhibición del crecimiento tumoral mediante cualquiera de estos dos mecanismos en base a una serie de métodos bien conocidos. En otra realización, la inhibición del tumor se determina midiendo el tamaño real del tumor durante un período de tiempo. En otra
10 realización, la inhibición del tumor se puede determinar estimando el tamaño de un tumor (durante un período de tiempo) utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Más concretamente, para estimar el tamaño del tumor, se puede utilizar una variedad de métodos de formación de imágenes radiológicas (por ejemplo, tomografía computarizada de emisión de positrones y de un solo fotón; véase, en general, "Nuclear Medicine in
15 Clinical Oncology", Winkler, C. (ed.) Springer-Verlag, Nueva York, 1986). Dichos métodos también pueden utilizar una variedad de agentes de formación de imágenes, incluyendo, por ejemplo, agentes convencionales de formación de imágenes (por ejemplo, citrato de galio-67), así como reactivos especializados para la formación de imágenes de metabolitos, formación de imágenes de receptores o formación de imágenes inmunológicas (por ejemplo, marcadores tumorales específicos de anticuerpos monoclonales radiomarcados). Además, para estimar el tamaño de una tumor, también se pueden utilizar métodos no radiactivos tales como ultrasonidos (véase, "Ultrasonic
Differential Diagnosis of Tumors", Kossoff y Fukuda, (eds.), Igaku-Shoin, Nueva York, 1984)).

20 Además de los métodos in vivo para determinar la inhibición tumoral, descritos anteriormente, se puede utilizar una variedad de métodos in vitro para predecir la inhibición tumoral in vivo. Los ejemplos representativos incluyen la actividad citolítica antitumoral mediada por linfocitos determinada, por ejemplo, por un ensayo de liberación de ⁵¹Cr (Ejemplos), la proliferación de linfocitos dependiente de un tumor (Ioannides, et al., J. Immunol. 146 (5): 1700-1707,
25 1991), la generación in vitro de anticuerpos específicos de tumores (Herlyn, et al., J. Immunol. Meth. 73: 157-167, 1984), la inhibición mediada por células (por ejemplo, CTL, linfocitos T auxiliares) o humoral (por ejemplo, anticuerpo) del crecimiento celular in vitro (Gazit, et al., Cancer Immunol Immunother. 35:135-144, 1992) y, para cualquiera de estos ensayos, la determinación de la frecuencia del precursor celular (Véase, Int. J. Cancer 30:135-142 (1982) y otros.

30 En otra realización, los usos de inhibición del crecimiento tumoral indica un estado de crecimiento que se reduce en comparación con el crecimiento sin contacto con, o la exposición a, un péptido de la presente invención. El crecimiento de las células tumorales se puede evaluar mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, la medición del tamaño del tumor, la determinación de si las células tumorales están proliferando usando un ensayo de incorporación de ³H-timidina o el recuento de las células tumorales. La "inhibición" del
35 crecimiento de las células tumorales se refiere, en otras realizaciones, a la ralentización, el retardo o la detención del crecimiento del tumor, o a la reducción del tumor. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

40 En otra realización de los usos y de las composiciones de la presente invención, se mide la expresión de WT1. En otra realización, se mide la expresión de la transcripción de WT1. En otra realización, se miden los niveles de proteína WT1 en el tumor. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

45 Los métodos para determinar la presencia y la magnitud de una respuesta inmune son bien conocidos en la técnica. En otra realización, se emplean ensayos de proliferación de linfocitos, en los que se mide la absorción de linfocitos T de una sustancia radiactiva, por ejemplo, ³H-timidina, en función de la proliferación celular. En otras realizaciones, la detección de la proliferación de los linfocitos T se realiza mediante la medición de los aumentos en la producción de la interleucina-2 (IL-2), el flujo de Ca²⁺ o la absorción de colorante tal como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

50 En otra realización, la estimulación de los CTL se determina mediante medios conocidos por los expertos en la materia, entre los que se incluyen la detección de la proliferación celular, la producción de citocinas y otros. El análisis de los tipos y de las cantidades de citocinas secretadas por los linfocitos T tras el contacto con dianas pulsadas con ligandos puede ser una medida de la actividad funcional. Las citocinas se pueden medir mediante ensayos de ELISA o ELISPOT para determinar la velocidad y la cantidad total de producción de citocinas. (Fujihashi
55 K. et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160: 181; Tanguay S. y Killion J. J. (1994) Lymphokine Cytokine Res. 13:259).

60 En otra realización, la actividad de los CTL se determina mediante el ensayo de lisis de liberación de ⁵¹Cr. La lisis de dianas marcadas con ⁵¹Cr pulsadas con péptidos realizada por linfocitos T específicos del antígeno se puede comparar con las células diana pulsadas con un péptido de control. En otra realización, los linfocitos T se estimulan con un péptido de la presente invención, pudiéndose determinar la lisis de las células diana que expresan el péptido nativo en el contexto del MHC. La cinética de la lisis, así como la lisis diana global en un punto temporal fijo (por ejemplo, 4 horas) se usan, en otra realización, para evaluar el rendimiento del ligando. (Ware C. F. et al. (1983) J Immunol 131: 1312).

65 Los métodos de determinación de la afinidad de un péptido hacia una molécula HLA son bien conocidos en la técnica. En otra realización, la afinidad se determina mediante ensayos de estabilización de TAP (Ejemplos).

En otra realización, la afinidad se determina mediante un radioinmunoensayo de competencia. En otra realización, se utiliza el siguiente protocolo: se lavan las células diana dos veces en PBS con albúmina de suero bovino al 1 % (BSA; Fisher Chemicals, Fairlawn, NJ). Se vuelven a suspender las células a 10^7 /ml en hielo, y se extraen los péptidos unidos a la superficie celular nativos durante 2 minutos a 0 °C usando tampón de citrato-fosfato en presencia de 3 mg/ml de microglobulina $\beta 2$. Se vuelve a suspender el sedimento a 5×10^6 células/ml en PBS/BSA al 1 % en presencia de 3 mg/ml de microglobulina $\beta 2$ y 30 mg/ml de desoxirribonucleasa, y se incuban alícuotas de 200 ml en presencia o ausencia de péptidos específicos de HLA durante 10 min a 20 °C, luego con péptido marcado con ^{125}I durante 30 min a 20 °C. Se determina el ^{125}I unido total tras dos lavados con PBS/BSA al 2 % y un lavado con PBS. Se determinan las afinidades relativas comparando las concentraciones crecientes del péptido de ensayo frente a un péptido de unión conocido.

En otra realización, se realiza un análisis de la especificidad de la unión del péptido a HLA en la superficie de células vivas (por ejemplo, células SKLY-16) para confirmar que la unión es con la molécula HLA apropiada y para caracterizar su restricción. Esto incluye, en otra realización, la competencia con péptidos no marcados en exceso que se sabe que se unen a las mismas o diferentes moléculas HLA y el uso de células diana que expresan los mismos o diferentes tipos de HLA. Este ensayo se realiza, en otra realización, en PBMC humanas vivas recién preparadas o fijadas en paraformaldehído al 0,25 %, líneas celulares de leucemia y líneas de linfocitos T transformadas con EBV de tipos específicos de HLA. La avidéz relativa de los péptidos que resultan unirse a moléculas de MHC en las células específicas se ensaya mediante ensayos de competición como se ha descrito anteriormente contra péptidos marcados con ^{125}I de alta afinidad conocida hacia la molécula HLA pertinente, por ejemplo, tirosinasa o una secuencia de péptido VHB.

En otra realización, un péptido de unión a HLA de clase II de los usos y de las composiciones de la presente invención tiene una longitud superior a la longitud mínima para la unión a una molécula HLA de clase II, que es, en otra realización, de aproximadamente 12 AA. En otra realización, el aumento de la longitud del péptido de unión a la HLA de clase II permite la unión a más de una molécula HLA de clase II. En otra realización, el aumento de la longitud permite la unión a una molécula HLA de clase II cuyo motivo de unión es desconocido. En otra realización, el aumento de la longitud permite la unión a una molécula HLA de clase I. En otra realización, se conoce el motivo de unión de la molécula HLA de clase I. En otra realización, no se conoce el motivo de unión de la molécula HLA de clase I. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, los péptidos adicionales utilizados en los usos y en las composiciones de la presente invención comprenden un aminoácido no clásico tal como: 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato (Kazmierski et al (1991) J. Am Chem. Soc. 113:2275-2283); (2S,3S)-metil-fenilalanina, (2S,3R)-metil-fenilalanina, (2R,3S)-metil-fenilalanina y (2R,3R)-metil-fenilalanina (Kazmierski y Hruby (1991) Tetrahedron Lett 32(41):5769-5772); ácido 2-aminotetrahidronaftalen-2-carboxílico (Landis (1989) Tesis Doctoral, Universidad de Arizona); hidroxí-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato (Miyake et al. (1984) J. TakedaRes. Labs. 43:53-76), ácido isoquinolin-carboxílico de histidina (Zechel et al (1991) Int. J. Pep. Protein Res. 38(2):131-138); y HIC (urea cíclica de histidina), (Dharanipragada et al. (1993) Int. J. Pep. Protein Res. 42(1):68-77) y ((1992) Acta. Crst., Crystal Struc. Comm. 48(IV): 1239-124).

En otra realización, un péptido adicional de las composiciones de la presente invención comprende un análogo de AA o peptidomimético que, en otras realizaciones, induce o favorece estructuras secundarias específicas. Dichos péptidos comprenden, en otras realizaciones, los siguientes: LL-Acp (ácido LL-3-amino-2-propenidon-6-carboxílico), un análogo de dipéptido inductor del giro β (Kemp et al (1985) J. Org. Chem. 50:5834-5838); análogos inductores de láminas β (Kemp et al. (1988) Tetrahedron Lett. 29:5081-5082); análogos inductores del giro β (Kemp et al. (1988) Tetrahedron Lett. 29:5057-5060); análogos inductores de la hélice α (Kemp et al., (1988) Tetrahedron Lett. 29: 4935-4938); análogos inductores del giro γ (Kemp et al. (1989) J. Org. Chem. 54: 109:115); análogos proporcionados por las siguientes referencias: Nagai y Sato (1985) Tetrahedron Lett.26:647-650; y DiMaio et al. (1989) J. Chem. Soc. Perkin Trans, pág. 1687; un análogo del giro Gly-Ala (Kahn et al. (1989) Tetrahedron Lett. 30:2317); isómero de enlace amida (Jones et al. (1988) Tetrahedron Lett. 29(31):3853-3856); tretrazol (Zabrocki et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:5875-5880); DTC (Samanen et al. (1990) Int. J. Protein Pep. Res. 35:501:509); y análogos enseñados en Olson et al. (1990) J. Am. Chem. Sci. 112:323-333 y Garvey et al. (1990) J. Org. Chem. 55(3):936-940. En la patente de EE.UU. N° 5.440.013, concedida el 8 de agosto de 1995 a Kahn, se describen miméticos restringidos en cuanto a la configuración de giros β y protuberancias β , y los péptidos que los contienen.

En otras realizaciones, se conjuga un péptido de la presente invención con una de otras varias moléculas, como se describe a continuación en el presente documento, que puede ser a través de enlace covalente o no covalente (complejado), cuya naturaleza varía, en otra realización, en función del fin particular. En otra realización, el péptido forma un complejo covalente o no covalentemente con un vehículo macromolecular (por ejemplo, un vehículo inmunogénico), incluyendo, pero sin limitación, polímeros naturales y sintéticos, proteínas, polisacáridos, polipéptidos (aminoácidos), alcohol polivinílico, pirrolidona de polivinilo y lípidos. En otra realización, un péptido de la presente invención se enlaza a un sustrato. En otra realización, el péptido se conjuga con un ácido graso para la introducción en un liposoma (patente de EE.UU. N° 5.837.249). En otra realización, un péptido de la invención forma

un complejo covalente o no covalentemente con un soporte sólido, una variedad de los cuales es conocida en la técnica. En otra realización, el enlace del péptido con el vehículo, sustrato, ácido graso o soporte sólido sirve para aumentar y generar una respuesta inmune.

5 En otras realizaciones, el vehículo es tiroglobulina, una albúmina (por ejemplo albúmina de suero humano), toxoide tetánico, poliaminoácidos tales como poli (lisina: ácido glutámico), una proteína de la gripe, proteína del núcleo del virus de la hepatitis B, hemocianina de lapa californiana, una albúmina u otra proteína portadora o un péptido portador; vacuna recombinante del virus de la hepatitis B o una APC. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

10 En otra realización, el término "aminoácido" (AA) se refiere a un AA natural o, en otra realización, un AA no natural o sintético, y puede incluir, en otras realizaciones, glicina, isómeros ópticos D o L, análogos de AA, peptidomiméticos o combinaciones de los mismos.

15 En otra realización, los términos "cáncer", "neoplasia", "neoplásico" o "tumor" se usan indistintamente y se refieren a células que han sufrido una transformación maligna que las ha vuelto patológicas para el organismo hospedador. Las células cancerosas primarias (es decir, las células obtenidas de cerca del sitio de la transformación maligna) se pueden distinguir fácilmente de las células no cancerosas mediante técnicas bien establecidas, particularmente mediante examen histológico. La definición de una célula cancerosa, como se usa en el presente documento, no solo incluye una célula cancerosa primaria, sino también cualquier célula derivada de un ancestro de células cancerosas. Esto incluye las células cancerosas en metástasis, y cultivos y líneas celulares derivadas de células cancerosas in vitro. En otra realización, un tumor es detectable en base a la masa tumoral; por ejemplo, mediante procedimientos tales como exploración TAC, formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), rayos X, ultrasonidos o palpación, y en otra realización, se identifica por los hallazgos bioquímicos o inmunológicos, usándose estos últimos para identificar también las células cancerosas en otras realizaciones.

20 Los métodos de síntesis de péptidos son bien conocidos en la técnica. En otra realización, los péptidos de la presente invención se sintetizan usando un procedimiento sintético en estado sólido apropiado (véase, por ejemplo, Steward y Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", Freeman, San Francisco, Calif. (1968); Merrifield (1967) Recent Progress in Hormone Res 23: 451). La actividad de estos péptidos se ensaya, en otras realizaciones, usando ensayos según lo descrito en el presente documento.

30 En otra realización, los péptidos de la presente invención se purifican mediante métodos convencionales incluyendo la cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, afinidad y columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. En otra realización, se usa la cromatografía de inmunoafinidad, en la que se aísla un epítipo mediante la unión a una columna de afinidad que comprende anticuerpos generados contra ese péptido, o un péptido relacionado de la invención, y fijados a un soporte estacionario.

40 En otra realización, se unen marcadores de afinidad tales como hexa-His (Invitrogen), dominio de unión a la maltosa (New England Biolabs), la secuencia de la cubierta de la gripe (Kolodziej et al. (1991) Meth. Enzymol. 194: 508-509), glutatión-S-transferasa u otros, a los péptidos de la presente invención para permitir la purificación fácil mediante el paso sobre una columna de afinidad apropiada. Los péptidos aislados también se pueden caracterizar físicamente, en otras realizaciones, usando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X.

50 En otra realización, los péptidos de la presente invención se producen mediante la traducción in vitro, a través de técnicas conocidas, como será evidente para un experto en la materia. En otra realización, los péptidos se modifican diferencialmente durante o después de la traducción, por ejemplo, por fosforilación, glucosilación, reticulación, acilación, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo, molécula de membrana u otro ligando, (Ferguson et al. (1988) Ann. Rev. Biochem. 57: 285-320).

55 En otra realización, los péptidos de la presente invención comprenden además un marcador detectable, que en otra realización, es fluorescente, o en otra realización, luminiscente, o en otra realización, radiactivo, o en otra realización, denso a los electrones. En otras realizaciones, el marcador detectable comprende, por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP), DS-Red (proteína roja fluorescente), fosfatasa alcalina secretada (SEAP), β -galactosidasa, luciferasa, ^{32}P , ^{125}I , ^3H y ^{14}C , fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo y umbeliferona, luciferina o cualquier número de otros de dichos marcadores conocidos para un experto en la materia. El marcador particular usado dependerá del tipo de inmunoensayo usado.

60 En otra realización, un péptido de la presente invención se enlaza a un sustrato que, en otra realización, sirve como vehículo. En otra realización, el enlace del péptido a un sustrato sirve para aumentar y generar una respuesta inmune.

65 En otra realización, los péptidos de la presente invención se enlazan a otras moléculas, como se describe en el presente documento, usando agentes de reticulación convencionales tales como carbodiimidias. Los ejemplos de

carbodiimidias son 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida (CMC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y 1-etil-3-(4-azonia-44-dimetilpentil)carbodiimida.

En otras realizaciones, los agentes de reticulación comprenden bromuro de cianógeno, glutaraldehído y anhídrido succínico. En general, se puede usar cualquiera de una serie de agentes homobifuncionales incluyendo un aldehído homobifuncional, un epóxido homobifuncional, un imidoéster homobifuncional, un éster de N-hidroxisuccinimida homobifuncional, una maleimida homobifuncional, un haluro de alquilo homobifuncional, un disulfuro de piridilo homobifuncional, un haluro de arilo homobifuncional, una hidrazida homobifuncional, un derivado de diazonio homobifuncional y un compuesto fotorreactivo homobifuncional. También se prevén, en otras realizaciones, compuestos heterobifuncionales, por ejemplo, compuestos que tienen un grupo reactivo con amino y un grupo reactivo con sulfhidrilo, compuestos con un grupo reactivo con amino y un grupo fotorreactivo, y compuestos con un grupo reactivo con carbonilo y un grupo reactivo con sulfhidrilo.

En otras realizaciones, los agentes de reticulación homobifuncionales incluyen los ésteres de N-hidroxisuccinimida bifuncionales ditiobis(propionato de succinimidilo), suberato de disuccinimidilo y tartrato de disuccinimidilo; los imidoésteres bifuncionales adipimidato de dimetilo, pimelimidato de dimetilo y suberimidato de dimetilo; los reticulantes reactivos con sulfhidrilo bifuncionales 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)propionamido]butano, bismaleimidohexano y bis-N-maleimido-1,8-octano; los haluros de arilo bifuncionales 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona; agentes fotorreactivos bifuncionales tales como bis-[b-(4-azidosaliclamido)etil]disulfuro; los aldehídos bifuncionales formaldehído, malondialdehído, succinaldehído, glutaraldehído y adipaldehído; un epóxido bifuncional tal como diglicidiléter de 1,4-butaneodiol; las hidrazidas bifuncionales hidrazida de ácido adipico, carbohidrazida y dihidrazida de ácido succínico; diazonios bifuncionales o-tolidina, bencidina diazotizada y bis-diazotizada; los haluros de alquilo bifuncionales N1N'-etilen-bis(yodoacetamida), N1N'-hexametilen-bis(yodoacetamida), N1N'-undecametilen-bis(yodoacetamida), así como haluros de bencilo y halomostazas, tales como ácido a1a'-diyodo-p-xileno-sulfónico y tri(2-cloroetil)amina, respectivamente.

En otras realizaciones, los agentes de reticulación heterobifuncionales usados para enlazar los péptidos a otras moléculas, según lo descrito en el presente documento, incluyen, pero sin limitación, SMCC (ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo)), MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), SIAB (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo, SMPB (4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo), GMBS (éster de N-(γ -maleimidobutiriloxi)succinimida), MPBH (hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico), M2C2H (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-hidrazida), SMPT (succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno) y SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo).

En otra realización, los péptidos de la invención también se pueden formular como una unión no covalente de monómeros a través de interacciones iónicas, de adsorción o bioespecíficas. Se pueden realizar complejos de péptidos con moléculas cargadas altamente positiva o negativamente, en otra realización, a través de la formación de puentes salinos en entornos de baja fuerza iónica tales como en agua desionizada. Se pueden crear grandes complejos, en otra realización, usando polímeros cargados tales como poli(ácido L-glutámico) o poli(L-lisina) que contienen numerosas cargas negativas y positivas, respectivamente. En otra realización, los péptidos son adsorbidos a superficies tales como perlas de látex de micropartículas o en otros polímeros hidrófobos, formando complejos de péptido-superantígeno asociados no covalentemente que imitan eficazmente la proteína reticulada o polimerizada químicamente, en otras realizaciones. En otra realización, los péptidos están enlazados de manera no covalente a través del uso de interacciones bioespecíficas entre otras moléculas. Por ejemplo, la utilización de la fuerte afinidad de la biotina por proteínas tales como la avidina o la estreptavidina o sus derivados se podría usar para formar complejos peptídicos. De acuerdo con un aspecto y en otra realización, los péptidos se pueden modificar para que posean grupos de biotina usando reactivos de biotilación comunes tales como el N-hidroxisuccinimidiléster de D-biotina (NHS-biotina), que reacciona con los grupos amino disponibles.

En otra realización, un péptido de la presente invención se enlaza a un vehículo. En otra realización, el vehículo es KLH. En otras realizaciones, el vehículo es cualquier otro vehículo conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, tiroglobulina, albúminas tales como albúmina de suero humano, toxoide tetánico, poliaminoácidos tales como poli(lisina: ácido glutámico), gripe, proteína del núcleo del virus de la hepatitis B, vacuna recombinante del virus de la hepatitis B y similares. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, los péptidos de la presente invención se conjugan con un lípido tal como P3 CSS. En otra realización, los péptidos de la presente invención se conjugan con una perla.

En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden además compuestos inmunomoduladores. En otras realizaciones, el compuesto inmunomodulador es una citocina, quimioquina o componente de complemento que aumenta la expresión de moléculas auxiliares o de adhesión del sistema inmune, sus receptores o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el compuesto inmunomodulador incluye interleucinas, por ejemplo, interleucinas 1 a 15, interferones α , β y γ , factor de necrosis tumoral, factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), quimiocinas tales como proteína activadora de neutrófilos (NAP), factor quimiotáctico y de activación de macrófagos (MCAF), RANTES, péptidos inflamatorios de

macrófagos MIP-1a y MIP-1b, componentes del complemento, o sus combinaciones. En otras realizaciones, el compuesto inmunomodulador estimula la expresión, o la expresión aumentada de OX40, OX40L (gp34), linfotactina, CD40, CD40L, B7.1, B7.2, TRAP, ICAM-1, 2 o 3, receptores de citocinas, o una combinación de los mismos.

5 En otra realización, el compuesto inmunomodulador induce o aumenta la expresión de moléculas coestimulantes que participan en la respuesta inmune, que incluyen, en algunas realizaciones, CD40 o su ligando, CD28, CTLA-4 o una molécula B7. En otra realización, el compuesto inmunomodulador induce o aumenta la expresión de un antígeno estable al calor (HSA) (Liu Y. et al. (1992) J. Exp. Med. 175: 437-445), cadena no variante de MHC modificado con sulfato de condroitina (li-CS) (Naujokas M. F. et al. (1993) Cell 74: 257-268) o una molécula de adhesión intracelular
10 1 (ICAM-1) (Van R. H. (1992) Cell 71: 1065-1068), que ayuda, en otra realización, a la coestimulación mediante la interacción con sus ligandos afines en los linfocitos T.

15 En otra realización, la composición comprende un disolvente, incluyendo agua, medios de dispersión, medios de cultivo celular, agentes isotónicos y similares. En otra realización, el disolvente es una solución tamponada isotónica acuosa con un pH de aproximadamente 7,0. En otra realización, la composición comprende un diluyente tal como agua, solución salina tamponada con fosfato o solución salina. En otra realización, la composición comprende un disolvente, que es no acuoso, tal como propiltilenglicol, polietilenglicol y aceites vegetales.

20 En otra realización, la composición se formula para la administración mediante cualquiera de las muchas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la presente invención proporciona la administración de la composición farmacéutica por vía parenteral, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramucosa, tópica, oral o por inhalación.

25 En otra realización, la vacuna que comprende un péptido de la presente invención comprende además una población de células que, en otra realización, comprende linfocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales, células madre o combinaciones de los mismos que, en otra realización son autólogos, alogénicos o singénicos entre sí. En otra realización, la población de células comprende un péptido de la presente invención. En otra realización, la población de células ocupa el péptido. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

30 En otra realización, las poblaciones de células de la presente invención se obtienen de fuentes in vivo tales como, por ejemplo, sangre periférica, producto sanguíneo obtenido por leucoféresis, producto sanguíneo obtenido por aféresis, ganglios linfáticos periféricos, tejido linfoide asociado al intestino, bazo, timo, sangre del cordón, ganglios linfáticos mesentéricos, hígado, sitios de lesiones inmunológicas, por ejemplo, líquido sinovial, páncreas, líquido cefalorraquídeo, muestras tumorales, tejido granulomatoso, o cualquier otra fuente de la que se puedan obtener
35 dichas células. En otra realización, las poblaciones de células se obtienen de fuentes humanas que son, en otras realizaciones, de origen fetal humano, neonatal, infantil o de adultos. En otra realización, las poblaciones de células de la presente invención se obtienen de fuentes animales tales como, por ejemplo, porcina o de simio, o de cualquier otro animal de interés. En otra realización, las poblaciones de células de la presente invención se obtienen de
40 sujetos que son normales, o en otra realización, de sujetos enfermos, o en otra realización, susceptibles a una enfermedad de interés.

45 En otra realización, las poblaciones de células de la presente invención se separan a través de métodos de separación basados en la afinidad. Las técnicas para la separación por afinidad incluyen, en otras realizaciones, la separación magnética, usando perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo, la cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o su uso en combinación con un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, complemento y citotoxinas, y selección con un anticuerpo unido a una matriz sólida, tal como una placa, o cualquier otra técnica conveniente. En otra realización, las técnicas de separación incluyen el uso de clasificadores de células
50 activados por fluorescencia, que pueden tener diversos grados de sofisticación, tales como múltiples canales de color, canales de detección de dispersión de la luz de bajo ángulo y obtuso, canales de impedancia, etc. En otras realizaciones, se puede emplear cualquier técnica que permita la separación de las poblaciones de células de la presente invención, y se considerará parte de la presente invención.

55 En otra realización, las células dendríticas son de la población diversa de tipos de células morfológicamente similares encontradas en una variedad de tejidos linfoides y no linfoides, calificados como tales (Steinman (1991) Ann. Rev. Immunol.9: 271-296). En otra realización, las células dendríticas usadas en la presente invención se aíslan de la médula ósea, o en otra realización, derivan de células progenitoras de médula ósea o, en otra realización, se aíslan/derivadas de sangre periférica, o en otra realización, derivan de o son una línea celular.

60 En otra realización, las poblaciones de células descritas en el presente documento se aíslan de la fracción de glóbulos blancos de un mamífero, tal como un mamífero murino, simio o un ser humano (Véase, por ejemplo, el documento WO 96/23060). La fracción de glóbulos blancos se puede aislar, en otra realización, de la sangre periférica de mamífero.

65 Los métodos de aislamiento de células dendríticas son bien conocidos en la técnica. En otra realización, las DC se aíslan a través de un método que incluye las siguientes etapas: (a) proporcionar una fracción de glóbulos blancos

obtenida de una fuente de mamífero mediante métodos conocidos en la técnica tales como leucoforesis; (b) separar la fracción de glóbulos blancos de la etapa (a) en cuatro o más subfracciones mediante elutriación centrífuga a contracorriente; (c) estimular la conversión de los monocitos de una o más fracciones de la etapa (b) en células dendríticas poniendo en contacto las células con ionóforo de calcio, GM-CSF e IL-13 o GM-CSF e IL-4; (d) identificar la fracción enriquecida en células dendríticas de la etapa (c); y (e) recoger la fracción enriquecida de la etapa (d), preferentemente a aproximadamente 4 °C.

En otra realización, la fracción enriquecida en células dendríticas se identifica mediante clasificación de células activadas por fluorescencia, que identifica al menos uno de los siguientes marcadores: HLA-DR, HLA-DQ o B7.2, y la ausencia simultánea de los siguientes marcadores: CD3, CD14, CD16, 56, 57 y CD 19, 20.

En otra realización, la población de células comprende linfocitos, que son, en otra realización, linfocitos T, o en otra realización, linfocitos B. Los linfocitos T, en otras realizaciones, se caracterizan como células NK, linfocitos T auxiliares, linfocitos T citotóxicos (CTL), TIL, linfocitos T sin tratamiento previo o combinaciones de los mismos. Se ha de entender que los linfocitos T que son primarios o líneas celulares, clones, etc. se considerarán parte de la presente invención. En otra realización, los linfocitos T son CTL, o líneas de CTL, clones de CTL o CTL aislados de tumores, antiinflamatorios u otros infiltrados.

En otra realización, las células madre hematopoyéticas o progenitoras tempranas comprenden las poblaciones de células usadas en la presente invención. En otra realización, dichas poblaciones se aíslan o derivan por leucoféresis. En otra realización, la leucoféresis se realiza tras la administración de citocinas, de la médula ósea, sangre periférica (PB) o sangre del cordón umbilical neonatal. En otra realización, las células madre o progenitoras se caracterizan por su expresión en la superficie del marcador de antígeno de superficie conocido como CD34⁺, y la exclusión de la expresión de los marcadores de linaje de antígeno de superficie, Lin⁻.

En otra realización, el sujeto recibe un péptido, una composición o una vacuna de la presente invención en combinación con células de médula ósea. En otra realización, la realización de la administración junto con las células de la médula ósea se realiza tras la irradiación previa del sujeto, como parte del curso de la terapia, para suprimir, inhibir o tratar el cáncer en el sujeto.

En otra realización, la expresión "puesta en contacto de una célula" o "puesta en contacto de una población" se refiere a un método de exposición que puede ser, en otras realizaciones, directa o indirecta. En otra realización, dicho contacto comprende la inyección directa de la célula a través de cualquier medio bien conocido en la técnica, tal como microinyección. También se prevé, en otra realización, que el suministro a la célula sea indirecto, tal como suministrando un medio de cultivo que rodee a la célula, o mediante su administración a un sujeto, por cualquier vía bien conocida en la técnica, y como se describe en el presente documento.

En otra realización, la generación de CTL de los métodos de la presente invención se realiza in vivo, y se efectúa mediante la introducción en un sujeto de una célula presentadora de antígeno puesta en contacto in vitro con un péptido de la presente invención (Véase, por ejemplo Paglia et al. (1996) J. Exp. Med. 183: 317-322).

En otra realización, los péptidos de los métodos y de las composiciones de la presente invención se administran a una célula APC. En otra realización, se administra la APC pulsada con péptido a un sujeto para generar una respuesta inmune, o tratar o inhibir el crecimiento o la reparación de un tumor. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, los péptidos se administran a las APC en forma de ADNc que codifica los péptidos. En otra realización, la expresión "células presentadoras de antígeno (APC)" se refiere a células dendríticas (DC), monocitos/macrófagos, linfocitos B u otro/s tipo/s de célula/s que expresan las moléculas de MHC/coestimulantes necesarias, que permitan eficazmente el reconocimiento de linfocitos T del péptido presentado. En otra realización, la APC es una célula cancerosa. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, los CTL se ponen en contacto con 2 o más poblaciones de APC. En otra realización, las 2 o más poblaciones de APC presentan diferentes péptidos. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, se usan técnicas que conducen a la expresión del antígeno en el citosol de APC (por ejemplo, DC) para administrar los péptidos a las APC. Los métodos de expresión de antígenos en APC son bien conocidos en la técnica. En otra realización, las técnicas incluyen (1) la introducción en la APC de ADN desnudo que codifica un péptido de la presente invención; (2) la infección de la APC con vectores recombinantes que expresan un péptido de la presente invención; y (3) la introducción de un péptido de la presente invención en el citosol de una APC usando liposomas. (Véase Boczkowski D. et al. (1996) J. Exp. Med. 184: 465-472; Rouse et al. (1994) J. Virol. 68: 5685-5689; y Nair et al. (1992) J. Exp. Med. 175: 609-612).

En otra realización, se usan APC Foster tales como las derivadas de la línea celular humana 174xCEM.T2, denominada T2, que contiene una mutación en su ruta de procesamiento de antígeno que restringe la asociación de

péptidos endógenos con moléculas MHC de clase I de superficie celular (Zweierink et al. (1993) J. Immunol. 150: 1763-1771), como se ilustra en el presente documento.

5 En otra realización, como se describe en el presente documento, el sujeto está expuesto a un péptido o a una composición/población de células que comprende un péptido de la presente invención, que difiere de la proteína nativa expresada, en la que posteriormente se desarrolla una reactividad cruzada inmune del hospedador con la proteína nativa/antígeno.

10 En otra realización, el sujeto al que se hace referencia en cualquiera de los usos o realizaciones de la presente invención es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto es un mamífero, que puede ser un ratón, una rata, un conejo, un hámster, una cobaya, un caballo, una vaca, una oveja, una cabra, un cerdo, un gato, un perro, un mono, o un simio. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

15 En otra realización, los péptidos, las vacunas y las composiciones de la presente invención estimulan una respuesta inmune que produce la lisis de células tumorales.

20 Se puede usar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para generar CTL, que se generan in vitro o ex vivo. Los CTL resultantes se pueden administrar al sujeto, tratando de este modo la afección asociada con el péptido, un producto de expresión que comprende el péptido o un homólogo del mismo.

25 El método desvelado en el presente documento puede implicar la introducción de la secuencia genética que codifica los péptidos desvelados en el presente documento usando, por ejemplo, una o más técnicas de administración de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y mezclas de ADN y ARN, solos o en combinación con componentes que no son ácidos nucleicos. El método puede comprender la administración al sujeto de un vector que comprende una secuencia de nucleótidos, que codifica un péptido desvelado en el presente documento (Tindle, R. W. et al., "Virology" (1994) 200: 54). El método puede comprender la administración al sujeto de ADN desnudo que codifica un péptido, o dos o más péptidos desvelados en el presente documento (Nabel et al., PNAS-USA (1990) 90: 11307). Se pueden utilizar vacunas multiepitópicas contra el cáncer basadas en análogos (Fikes et al., "Design of multi-epitope, analogue-based cancer vaccines". Expert Opin Biol Ther. Septiembre de 2003; 3(6):985-93).

Los ácidos nucleicos se pueden administrar a un sujeto por cualquier medio como se conoce en la técnica, incluyendo la administración parenteral o intravenosa, o por medio de una pistola de genes o en una composición.

35 Los vectores para su uso de acuerdo con dichos métodos pueden comprender cualquier vector que facilite o permita la expresión de un péptido. Los vectores comprenden virus atenuados, tales como vaccinia o de la viruela aviar, tal como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 4.722.848, incorporada en el presente documento por referencia. El vector puede ser BCG (Bacilo de Calmette y Guerin), tal como se describe en Stover et al. (Nature 351: 456-460 (1991)). Hay una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración terapéutica o la inmunización de los péptidos desvelados en el presente documento, por ejemplo, vectores de Salmonella typhi y similares, que serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción del presente documento.

40 El vector puede codificar además para un compuesto inmunomodulador, tal como se describe en el presente documento. El sujeto puede recibir un vector adicional que codifique el mismo, simultánea, anterior o posteriormente a la administración del vector que codifica un péptido desvelado en el presente documento al sujeto.

45 En otra realización, los péptidos, las composiciones y las vacunas de la presente invención se administran a un sujeto, o se utilizan en los usos de la presente invención, en combinación con otros compuestos y agentes quimioterapéuticos contra el cáncer, incluyendo los anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos del cáncer alternativos o, en otra realización, epítopos que consisten en una secuencia de AA que corresponde a, o en parte a, aquella de la que se derivan los péptidos de la presente invención.

50 La presente invención contempla diversas realizaciones de intervalos de dosificación. En otra realización, la dosis es de 20 µg por péptido al día. En otra realización, la dosis es de 10 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 30 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 40 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 60 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 80 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 100 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 150 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 200 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 300 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 400 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 600 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 800 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 1.000 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 1.500 µg/péptido/día. En otra realización, la dosis es de 2.000 µg/péptido/día.

60 En otra realización, la dosis es de 10 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 30 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 40 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 60 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 80 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 100 µg/péptido/dosis. En otra

realización, la dosis es de 150 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 200 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 300 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 400 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 600 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 800 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 1.000 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 1.500 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 2.000 µg/péptido/dosis.

En otra realización, la dosis es de 10-20 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 20-30 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 20-40 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 30-60 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 40-80 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 50-100 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 50-150 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 100-200 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 200-300 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 300-400 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 400-600 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 500-800 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 800-1.000 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 1.000-1.500 µg/péptido/dosis. En otra realización, la dosis es de 1.500-2.000 µg/péptido/dosis.

En otra realización, la cantidad total de péptido por dosis o por día es una de las cantidades anteriores. En otra realización, la dosis total de péptido por dosis es una de las cantidades anteriores.

Cada una de las dosis anteriores representa una realización distinta de la presente invención.

APARTADO DE DATOS EXPERIMENTALES

EJEMPLO 1: UNIÓN DE HLA-A0201 Y -A0301 MEDIANTE ANÁLOGOS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE WT1

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Péptidos

Los péptidos fueron sintetizados por Genemed Synthesis Inc, CA usando la química de fluorenilmetoxicarbonilo y la síntesis en fase sólida, y se purificaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se determinó la calidad de los péptidos mediante análisis de HPLC, y se midió el peso molecular esperado usando espectrometría de masas de desorción por láser asistida por matriz. Los péptidos eran estériles y tenían una pureza > 90 %. Se disolvieron los péptidos en DMSO y se diluyeron en PBS a pH 7,4 o solución salina, proporcionando una concentración de 5 miligramos por mililitro (mg/ml) y se almacenaron a -80 °C. Para los experimentos in vitro, se usó un péptido de control irrelevante, HLA A24 consenso.

Análisis de las secuencias peptídicas

El análisis de las secuencias peptídicas se realizó usando 2 bases de datos. La primera fue el programa informático del Departamento de Bioinformática y Análisis Molecular (Institutos Nacionales de Sanidad, Washington, DC) (Parker K. C. et al, "Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains". J Immunol 152:163-175,1994), que ocupa péptidos 9-meros o 10-meros sobre un coeficiente de disociación en tiempo medio predicho de moléculas HLA de clase I. La segunda base de datos, el programa informático de predicción SYFPEITHI, se describe en Rammensee H. G. et al (SYFPEITHI: base de datos para los ligandos del MHC y motivos peptídicos. Immunogenetics 50: 213-219, 1999). Los péptidos de control irrelevantes usados para los experimentos in vitro fueron: RAS (TEYKLVVVGAPGVGKSALTIQ; SEC ID N° 46) o CML b2a2 (VHSIPLTINKEEALQRPVASFDFE; SEC ID N° 47) para la clase II, y HIV pol (ILKEPVGHV; SEC ID N° 48) o CML F (YLKALQRPY; SEC ID N° 49) para la clase I.

Líneas celulares

Se cultivaron las líneas celulares en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 5 %, penicilina, estreptomina, glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol a 37 °C en aire humidificado que contenía CO₂ al 5 %. T2 es una línea celular humana que carece de TAP1 y TAP2, por tanto, es incapaz de presentar péptidos derivados de proteínas citosólicas. Las células Raji son células humanas de linfoma de Burkitt que presentan un alto nivel de expresión de TAP.

Las líneas de células de mesotelioma humanas estudiadas incluían: sarcomatoide (VAMT, H2373, H28), epiteliode (H2452) y bifásica (JMN, MSTO y H-Meso1A). Las líneas celulares se obtuvieron de las siguientes fuentes: H-Meso1A: NCI, Bethesda, MD; JMN y VAMT: Dr. Sirotnak, Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC); H-2452 y H2373: Dr. Pass, Instituto Karmanos del cáncer, Universidad Estatal de Wayne, Detroit, MI; H28 y MSTO: Colección americana de cultivos tipo (ATCC, Manassas, VA). Las líneas celulares se mantuvieron en los medios recomendados por los proveedores y se incubaron en un incubador humidificado con CO₂ al 5 %.

Se obtuvieron las líneas de células de mesotelioma Meso 11, Meso 34, Meso 37, Meso 47 y Meso 56 del Dr. M Gregoire (Instituto de Biología, Nantes, Francia) y se cultivaron en medio RPMI 1640 (Life Technologies) + suero de ternera fetal al 10 % (FCS), penicilina-estreptomicina al 1 % y L-glutamina al 1 %. Todas las células fueron clasificadas como HLA por el Departamento de Inmunología Celular del MSKCC. La línea celular de melanoma Mewo (WT1⁻ A201⁺) se obtuvo de la ATCC. El carcinoma de células renales SKRC-52 se obtuvo de L. Old del Instituto Ludwig. Las líneas celulares de leucemia se cultivaron en RPMI 1640 + FCS al 10 %, penicilina-estreptomicina al 1 %, glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol a 37 °C/CO₂ al 5 %. Las leucemias LAMA81, BV 173 y 697, Ph⁺ que son todas WT1⁺ y A0201⁺, fueron proporcionadas por el Dr. H. J. Stauss (University College London). SKLY-16 es un linfoma de linfocitos B humanos (WT1⁻, A0201⁺); K562, RwLeu4 y HL60, todas leucemias WT1⁺, se obtuvieron de la ATCC.

Ensayo de T2 en cuanto a la unión al péptido y estabilización de las moléculas HLA A0201

Se incubaron linfocitos T2 (TAP⁻, HLA-A0201⁺) durante una noche a 27 °C a una concentración de 1 x 10⁶ células/ml en medio RPMI exento de FCS suplementado con 5 µg/ml de β2m humana (Sigma, St Louis, MO) en ausencia (control negativo) o presencia de bien un péptido de tirosinasa de referencia positiva o péptidos de ensayo a diversas concentraciones finales (50, 10, 1 y 0,1 microgramos (µg)/ml). Tras una incubación de 4 horas con 5 µg/ml de brefeldina A (Sigma), se marcaron los linfocitos T2 durante 30 minutos a 4 °C con una concentración saturante de anticuerpo monoclonal contra HLA-A2.1 (BB7.2) y, a continuación, se lavaron dos veces. Luego se incubaron las células durante 30 minutos, a 4 °C con una concentración saturante de Ig antimurina IgG F(ab')₂ de cabra conjugada con FITC (Caltag, San Francisco, CA), se lavaron dos veces, se fijaron en PBS/paraformaldehído al 1 % y se analizaron usando un citofluorómetro Calibur[®] de FACS (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

Se usó la intensidad media de fluorescencia (MIF) observada para cada concentración de péptido (tras dividir entre la MIF en ausencia de péptido) como indicador de la unión al péptido y se expresó como un "índice de fluorescencia". Los ensayos de estabilización se realizaron de manera similar. Tras la evaluación inicial de la unión al péptido en el punto temporal 0, se lavaron las células en medio RPMI completo para eliminar los péptidos libres y se incubaron en presencia continua de 0,5 µg/ml de brefeldina A durante 2, 4, 6 o 8 horas.

Se estimó el número de complejos de péptido-HLA-A2.1 estables como se ha descrito anteriormente por inmunofluorescencia. El tiempo medio de los complejos es una estimación del tiempo necesario para una reducción de 50 % del valor de MIF en el punto temporal = 0.

RESULTADOS

Se identificaron los péptidos de la secuencia de WT1 que tenían una afinidad predicha por moléculas HLA-A0201 y HLA-A0301. Se modificaron estos péptidos nativos WT-1 para generar péptidos heteróclitos con un aumento de la unión predicha a moléculas HLA-A0201 y HLA-A0301, como se muestra en las Tablas 1-2. Varios de los péptidos heteróclitos estabilizaron significativamente las moléculas HLA-A0201 y HLA-A0301 en ensayos de termoestabilización usando una línea celular negativa TAP 1/2 (T2) y células HLA-A0301 Raji. En concreto, WT1-A1, B1 y C1 presentaron una unión similar o aumentada en comparación con los correspondientes péptidos nativos WT1-A, B y C. WT1-D1 presentó una unión similar o aumentada en comparación con el correspondiente péptido nativo WT1-D (Figura 1A). Una comparación de la unión a HLA A0301 de A3 WT1-A, -B, -C y -D con cada uno de sus tres análogos respectivos demostró una unión similar (Figuras 1B-5E).

Por lo tanto, los péptidos WT1 heteróclitos de la presente invención presentan una mayor unión a moléculas HLA de clase I.

TABLA 1

Péptidos nativos de unión a HLA 0201 de WT-1 y análogos sintéticos			
Nombre	Secuencia	SEC ID N°	Puntuación BIMAS
WT-1 A (nativo)	RMFPNAPYL	5	313
WT-1 AI (ANÁLOGO)	YMFPNAPYL	6	1444
WT-1 B (nativo)	SLGEQQYSV	7	285
WT-1 B1 (ANÁLOGO)	YLGEQQYSV	8	1311
WT-1 C (nativo)	ALLPAVPSL	9	181
WT-1 C1 (ANÁLOGO)	YLLPAVPSL	10	836
WT-1 D (nativo)	NLGATLKGV	11	159
WT-1 D1 (ANÁLOGO)	YLGATLKGV	12	735
WT-1 E (nativo)	DLNALLPAV	13	11
WT-1 E1 (ANÁLOGO)	YLNALLPAV	14	735
WT-1 F (nativo)	GYFRGIQDV	15	51
WT-1 F1 (ANÁLOGO)	GLRRGIQDV	16	591

WT-1 G (nativo)	KRYFKLSHL	17	1
WT-1 G1 (ANÁLOGO)	KLYFKLSHL	18	550
WT-1 H (nativo)	ALLLRTPYS	19	1
WT-1 H1 (ANÁLOGO)	ALLLRTPYV	20	1415
WT-1 J (nativo)	CMTWNQMNL	21	15
WT-1 J1 (ANÁLOGO)	YMTWNQMNL	22	70

TABLA 2

Péptidos nativos de unión a HLA 0201 de WT-1 y análogos sintéticos			
Nombre	Secuencia	SEC ID N°	Puntuación BIMAS
A3WT-1 A (nativo)	NMHQRNMTK	23	40
A3WT-1 A1 (ANÁLOGO)	NMYQRNMTK	24	200
A3WT-1 A2 (ANÁLOGO)	NMHQRVMTK	25	120
A3 WT-1 A3 (ANÁLOGO)	NMYQRVMTK	26	600
A3WT-1 B (nativo)	QMNLGATLK	27	20
A3WT-1B1 (ANÁLOGO)	QMYLGATLK	28	100
A3WT-1 B2 (ANÁLOGO)	QMNLGVTLK	29	60
A3WT-1 B3 (ANÁLOGO)	QMYLGVTLK	30	300
A3WT-1 C (nativo)	FMCAYPGCNK	31	30
A3WT-1 C1 (ANÁLOGO)	FMYAYPGCNK	32	150
A3WT-1 C2 (ANÁLOGO)	FMCAYPFCNK	33	90
A3WT-1 C3 (ANÁLOGO)	FMYAYPGCNK	34	450
A3WT-1D (nativo)	KLSHLQMHSR	35	18
A3WT-1 D1 (ANÁLOGO)	KLYHLQMHSR	36	90
A3WT-1 D2 (ANÁLOGO)	KLSHLQMHSK	37	90
A3WT-1 D3 (ANÁLOGO)	KLYHLQMHSK	38	450

EJEMPLO 2: INDUCCIÓN DE RESPUESTAS INMUNES CONTRA ANÁLOGOS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE WT1

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Estimulaciones de péptidos

Se purificaron PBMC de donantes sanos positivos en HLA-A0201 y pacientes con LMC por centrifugación en un medio de centrifugación Ficoll-Paque (Amersham Biosciences). Se generaron células dendríticas de sangre periférica (DC) de la siguiente manera: se aislaron fracciones de PBMC enriquecidas en monocitos, usando una técnica de adhesión a plástico, de PBMC totales. Se cultivaron las células adherentes al plástico adicionalmente en medio RPMI 1640 (Invitrogen) con plasma autólogo al 1-5 %, 1.000 unidades por mililitro (U/ml) de interleucina humana recombinante (IL)-4 (Schering-Plough, N. J.) y 1.000 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos humano recombinante (GM-CSF) (Immunex, Seattle).

En los días 2 y 4 de la incubación, se añadió medio de cultivo recién preparado complementado con IL-4 y GM-CSF. El día 6, se cambió la mitad del medio por medio de cultivo que contenía IL-4, GM-CSF, 10 ng/ml de factor de necrosis tumoral humano recombinante (TNF)- α (sistema R & D) y 500 ng/ml de CD40L trimérico soluble (Immunex, Seattle). En el día 9, se recogieron las células y se usaron como APC para la estimulación del antígeno. Las células expresaron antígenos asociados a DC, tales como CD80, CD83, CD86 y HLA de clase I y de clase II en sus superficies celulares.

Se aislaron linfocitos T de los mismos donantes mediante el uso de selección negativa por el agotamiento con un anticuerpo monoclonal contra CD11b, CD56 y CD19 (Miltenyi, CA). Se cultivaron 1×10^6 linfocitos T con 1×10^5 DC autólogas en medio RPMI 1640 que contenía plasma autólogo humano inactivado por calor al 5 % con 10 μ g/ml de péptido y 2 μ g/ml de microglobulina β_2 , 5 ng/ml de IL-7 recombinante humana (Genzyme) y 0,1 ng/ml de IL-12 en placas de 24 pocillos.

Tras cultivar durante 3 días, se añadieron 20 U/ml de IL-2 recombinante (Sandoz Pharmaceutical). Tras 10 días, se estimularon de nuevo 1×10^6 células mediante la adición de 2×10^5 monocitos CD14⁺ aislados magnéticamente autólogos junto con 10 ng/ml de IL-7, 20 U/ml de IL-2 y 10 μ g/ml de péptido. En algunos casos, tras el cultivo durante otros 7 días, se estimularon las células de la misma manera una tercera vez. Tras la última estimulación, se aislaron magnéticamente los linfocitos T CD8⁺, y se determinaron la citotoxicidad y la secreción de IFN- γ .

RESULTADOS

Para determinar la capacidad de los péptidos WT1 heteróclitos para generar respuestas inmunes contra péptidos WT nativos y heteróclitos, se aisló la subpoblación de PBMC CD3⁺ de un donante sano y se estimuló con DC pulsadas con péptido derivadas de monocitos autólogos, y luego se volvieron a estimular con monocitos CD14⁺ pulsados con péptido. A continuación, se determinó la presencia de linfocitos T específicos del antígeno activados usando líneas celulares leucémicas compatibles con HLA pulsadas. Varios análogos peptídicos generaron mayores respuestas inmunes (es decir, una mayor frecuencia de precursor de linfocitos T en comparación con los péptidos nativos) mediante ELISPOT de IFN γ (Figura 2A) y el ensayo de liberación de cromo (Figura 2B). Se observaron resultados similares usando subpoblaciones de donantes CD3⁺ (Figuras 3B-D) y CD8⁺ (Figura 3A). Por otra parte, los linfocitos T CD8⁺ estimulados con los péptidos WT1 heteróclitos reaccionaron de forma cruzada con los péptidos WT1 nativos, y fueron capaces de lisar los blastocitos de LMC compatibles con HLA (Figuras 4A-B).

Por lo tanto, los péptidos WT1 heteróclitos de la presente invención son capaces de generar linfocitos T que (a) secretan citocinas inflamatorias y (b) realizan la citólisis en respuesta a las células presentadoras de péptidos WT1. Además, los linfocitos T generados por los péptidos WT1 heteróclitos reconocen los péptidos WT1 tanto nativos como heteróclitos.

EJEMPLO 3: SELECCIÓN DE PÉPTIDOS WT1 SINTÉTICOS QUE SE UNEN A MOLÉCULAS HLA DE CLASE II

Para identificar los péptidos WT1 que se unen a muchas moléculas diferentes HLA de clase II con afinidades relativamente altas, se determinaron las frecuencias de los alelos HLA-DRB en la población caucásica norteamericana, usando la base de datos NCBI MHC (Wheeler D. L. et al., "Database resources of the National Center for Biotechnology Information". Nucleic Acids Res. 1 de enero de 2005; 33:D39-45; Wheeler D. L. et al., "Database resources of the National Center for Biotechnology Information"; Nucleic Acids Res. 1 de enero de 2006; 34:D173-80)). Usando el algoritmo de predicción de epítopos SYFPEITHI, se identificaron 2 péptidos de WT1 con unión predicha a moléculas HLA-DRB con afinidades relativamente altas (Tabla 3).

Tabla 3: Péptidos WT1 nativos con unión predicha a los alelos HLA-DR basándose en el algoritmo SYFPEITHI (0 (baja) -28 (alta)).

Identificador de péptido	SEC ID N°	DRB 101	DRB 301	DRB 401	DRB 701	DRB 1101	DRB 1501
Frecuencia alélica		17,9 %	18,6 %	13,8 %	25,5 %	10,4 %	15,9 %
427	1	15	7	12	8	1	4
423	2	15	17	20	14	10	24
331	3	28	2	28	18	25	10
328	4	28	11	28	18	25	20

Las secuencias de AA de los péptidos de la Tabla 3 son LVRHHNMHQRNMTKL (427); RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (423); NKRYFKLSHLQMHSR (331); y PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHGT (328).

Por lo tanto, los péptidos WT1 de unión a HLA de clase II de la presente invención se unen a moléculas HLA de clase II en un gran porcentaje de la población.

EJEMPLO 4: LOS PÉPTIDOS WT1 DE UNIÓN A MOLÉCULAS HLA DE CLASE II ESTIMULAN LINFOCITOS T CD4⁺

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES (PRESENTE EJEMPLO Y EJEMPLOS POSTERIORES)

Preparación de DC y células efectoras CD4⁺

Se purificaron PBMC de sangre en Ficoll y se volvieron a suspender a 5×10^6 /ml en medio Ex-Vivo-15[®] (BioWhittaker, Walkersville, MD) que contenía plasma autólogo al 1 %. Tras una incubación de 2 horas a 37 °C, se recogió la fracción no adherente y se lavó repetidamente con PBS, y después se volvió a suspender en medio que contenía 1×10^3 UI/ml de GM-CSF y 0,0032 UI/ml de IL-4. El día 2 y 4, se añadió el mismo medio como re-alimentación (es decir, se añadió 1/2 volumen de medio, que contenía suficientes citocinas para todo la placa). En el día 5, se añadieron 10 μ g/ml de péptido.

En el día 6, se añadió un cóctel de maduración de citocinas, y se cultivaron las células durante otras 48 horas. El cóctel de maduración consistió en: 4×10^2 UI/ml de IL-1- β , 0,0032 UI/ml de IL-4, 1×10^3 UI/ml de IL-6, 1×10^3 UI/ml de GMCSF, 10 μ g/ml de TNF- α y 1 μ g/ml de PGE2.

El día 7, se cosecharon DC y se lavaron dos veces con RPMI, se contaron, se dividieron en alícuotas y se volvieron a suspender a 1×10^6 /ml en medio X-vivo 15[®] (sin suero). Se añadieron los péptidos a una concentración final de 10 μ g/ml y se incubaron durante 2 h, a 37 °C y CO₂ al 5 %, se volvieron a suspender suavemente cada 15 minutos, luego se lavaron dos veces en HBSS y se volvieron a suspender en RPMI + plasma autólogo al 5 % a una concentración apropiada en función del número de efectores aislados en la siguiente etapa.

Además, el día 7, se usaron más PBMC para generar más células DC y CD3⁺. Se aislaron las DC de la fracción adherente y se prepararon como se ha descrito anteriormente para la segunda estimulación de las células efectoras en el día 14. Se aislaron las células CD3⁺ de la fracción no adherente por selección negativa y se estimularon con las DC previamente preparadas volviendo a suspender las células CD3⁺ a una concentración de 2×10^6 células/ml en RPMI + plasma autólogo al 5 %, y añadiendo DC en una proporción de células efectoras con respecto a DC de 20:1 y 10 ng/ml de IL-15. A continuación, se sembraron las células en 2 ml y se incubaron conjuntamente a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 1 semana.

El día 14, se estimularon las células CD3⁺ una segunda vez del mismo modo con el segundo lote de DC, excepto que se mezclaron 1×10^6 células/ml en una proporción de células efectoras con respecto a DC de 50:1. El día 18, se añadió el mismo medio como realimentación. El día 20, se descongelaron las DC de la generación anterior y se incubaron en citocinas de maduración en medio X-vivo 15[®]. En el día 21, se realizó el ensayo ELISPOT.

Ensayo ELISPOT

Se humedecieron previamente las placas con 30 µl/pocillo de alcohol al 70 %, agitándolas para asegurar la cobertura de toda la superficie, se lavaron 3 veces con 150 µl/pocillo de PBS estéril, después se incubaron durante la noche a 4 °C con 10 µg/ml de anticuerpo de recubrimiento (clon anti-INF) en PBS, 100 µl/pocillo, se envolvieron en papel de aluminio. A continuación, se lavaron las placas 2 veces con 150 µl/pocillo de PBS y 1 vez con RPMI/plasma autólogo (AP) al 10 %, luego se bloquearon con 150 µl/pocillo de RPMI/AP al 5 % durante 2 horas a 37 °C. Se suspendieron las PBMC en RPMI/AP al 5 % a 1×10^6 /ml. Se añadieron 1×10^5 células y 2 µg de los péptidos apropiados por pocillo, y se llevó el volumen hasta 200 µl/pocillo con medio. Se añadió 1 µl/pocillo de 2,5 mg/ml de solución madre de PHA a los pocillos de control. Se envolvieron las placas en papel de aluminio y se incubaron durante 20 horas a 37 °C.

Para el revelado, se lavaron las placas 3 veces con PBS/Tween 2 al 0,05 % y 3 veces con PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de biotina contra INF-γ (Clon 7-B6-1), diluida 1:500 en PBS/BSA al 0,5 %, y se incubaron las placas durante 2 horas a 37 °C. Tras 1 hora y 30 minutos, se preparó complejo de avidina-peroxidasa (ABC) (Vectastain Elite Kit, Vector) añadiendo 1 gota de reactivo A y 1 gota de reactivo B a 10 ml de PBS/Tween 20 al 0,1 %, y se almacenaron a temperatura ambiente (TA) envueltas en papel de aluminio. Se lavaron las placas 3 veces con PBS/Tween al 0,05 % y 3 veces con PBS, a continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de complejo de avidina-peroxidasa y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente envueltas en papel de aluminio, después se lavaron 3 veces con PBS/Tween-20 al 0,05 %, seguidas de 3 veces con PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato, se incubaron las placas durante 4 minutos a temperatura ambiente a oscuras, y se detuvo la reacción con agua. Se secaron los pocillos y se almacenaron las placas durante la noche a oscuras a temperatura ambiente. Se determinó automáticamente el número de manchas con el uso de un analizador de imágenes de vídeo asistido por ordenador con el programa informático KS ELISPOT 4.0 (Carl Zeiss Vision, Alemania).

Preparación del sustrato

Para preparar la solución N° 1: (tampón de acetato), se mezclaron 23,4 ml H₂O dd, 2,3 ml de ácido acético 0,1 N y 5,5 ml de acetato de sodio 0,1 N. Para preparar la solución N° 2, se disolvió 1 comprimido de AEC (Sigma) en 2,5 ml de dimetilformamida. A continuación, se mezclaron 1,25 ml de la solución N° 2 con 23,7 ml de solución N° 1, se añadieron 13 µl de H₂O₂ al 30 %, y la solución resultante se mezcló bien y se filtró usando un filtro de 0,45 µm.

Experimentos comparativos de cebado

Se realizó una estimulación in vitro de CD3⁺ como se ha descrito anteriormente. Se incubaron 2×10^6 células DC inmaduras con lisado celular total a partir de 2×10^6 células tumorales que se habían preparado previamente mediante 3 ciclos de congelación/descongelación. Tras una incubación de 18 horas, se añadieron citocinas de maduración a las DC como se ha descrito anteriormente. Se estimularon las células CD3⁺ 3 veces con estas DC maduras autólogas, tras lo que se ensayaron los linfocitos T en un ensayo ELISPOT de IFN-γ para medir la reactividad contra DC maduras autólogas que se habían pulsado con péptidos CD4⁺ individuales cuando estaban en estado inmaduro. Se volvieron a exponer dichas DC al péptido durante el ensayo ELISPOT como se ha descrito anteriormente.

Ensayo de citotoxicidad de cromo 51

Se midió la presencia de CTL específicos en un ensayo de liberación de 4 h de cromo convencional. Se pulsaron las células diana con 10 microgramos (µg)/ml péptidos sintéticos durante una noche a 37 °C y se marcaron con 300 µCi de Na₂⁵¹CrO₄ (NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA). Tras lavar extensamente, se incubaron las células diana con linfocitos T en una proporción de E:T que variaba de 100:1 a 10:1. Todas las condiciones se realizaron por triplicado. Se incubaron las placas durante 4 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. Se recogieron los fluidos sobrenadantes y se midió la radiactividad en un contador gamma. Se determinó el porcentaje de lisis específica a partir de la siguiente fórmula: $100 \times [(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})]$

liberación espontánea)]. Se determinó la liberación máxima mediante la lisis de las dianas radiomarcadas en Triton X-100 al 2,5 %.

Estadística

Se realizaron análisis estadísticos con el programa informático Statview (SAS Institute, Gary, NC) usando un ensayo t para muestras independientes de dos colas, con el nivel de significación estadística fijado en 0,05.

RESULTADOS

Para determinar la capacidad de los péptidos WT1 de unión a HLA de clase II de la presente invención para estimular linfocitos T CD4⁺, se aislaron subpoblaciones de PBMC CD4⁺ de donantes sanos y se estimularon con DC autólogas pulsadas con péptidos derivadas de monocitos, y luego se volvieron a estimular con monocitos CD14⁺ pulsados con péptidos. El péptido 328, y en un grado ligeramente inferior, el péptido 423, estimularon una respuesta significativa de linfocitos T CD4⁺ específica del péptido en una variedad de donantes con diferentes tipos de HLA-DRB1, como se observa mediante ELISPOT de IFN- γ (Figura 5). Como era de esperar, las células estimuladas con RAS (péptido de control irrelevante) o solo con APC no produjeron IFN- γ por encima de los niveles de fondo.

Por lo tanto, los péptidos WT1 de unión a HLA de clase II de la presente invención son capaces de estimular los linfocitos T que reconocen células que presentan péptidos WT1.

EJEMPLO 5: LAS CÉLULAS QUE EXPRESAN WT1 PROCESAN Y PRESENTAN LOS PÉPTIDOS DE LA PRESENTE INVENCION

Se realizaron estudios comparativos de cebado para determinar si las células que expresan WT1 procesan y presentan los péptidos de la presente invención o los correspondientes péptidos nativos. Se prepararon lisados tumorales totales de 3 líneas celulares diferentes: 697 (WT1⁺, HLA A0201⁺), una línea celular de leucemia el2; JMN (WT1⁺, HLA A0201⁺), una línea celular de mesotelioma bifásico; y como control, MeWo (WT1⁻, HLA A0201⁺), una línea celular de melanoma maligno. Se incubaron DC de donantes A0201⁺ sanos durante 18 horas con los lisados tumorales y se usaron para estimular linfocitos T CD3⁺ autólogos. Tras 3 estimulaciones, se ensayaron los linfocitos T para determinar su reactividad hacia las DC autólogas pulsadas con los péptidos WT1. Los linfocitos T que habían sido estimulados con lisados tumorales WT1⁺ reconocieron los péptidos individuales de unión a HLA de clase II (Figura 6A-B), mientras que los linfocitos T estimulados con DC pulsados con lisado de MeWo no estimularon los linfocitos T específicos de WT1. Como control positivo, en el ELISPOT, se usó lisado de 697, lo que produjo números de manchas aproximadamente iguales a 423 y 328. Se repitieron estos experimentos en 5 donantes distintos. Los linfocitos T estimulados reconocieron el péptido WT1DR 328 en 3 de los 5 experimentos y WT1DR 427 en todos los experimentos. Por lo tanto, a pesar de la baja expresión de la transcripción de WT1 en las líneas celulares de mesotelioma (véase más abajo), los epítotos CD4 de WT1 de la presente invención fueron procesados y presentados por las moléculas HLA de clase II de las células de mesotelioma.

Estos hallazgos muestran que los péptidos de la presente invención son (a) absorbidos y presentados por APC en una forma antigénica; y (b) presentados por APC expuestas a células tumorales que expresan WT1; y (c) que las APC expuestas a los péptidos WT1 122 y 122A1 generan la formación de linfocitos T que reconocen las células tumorales que expresan WT1. Así pues, las células que expresan WT1, incluyendo las células de mesotelioma y de leucemia, procesan y presentan los péptidos de la presente invención o los correspondientes péptidos nativos.

EJEMPLO 6: LOS LINFOCITOS T CD4⁺ ESPECÍFICOS DEL ANTÍGENO GENERADOS POR LOS PÉPTIDOS DE LA PRESENTE INVENCION RECONOCEN LAS CÉLULAS TUMORALES QUE EXPRESAN WT1

Para ensayar si los linfocitos T CD4⁺ específicos del antígeno generados por los péptidos de la presente invención reconocen las células tumorales que expresan WT1, se desafiaron los linfocitos T estimulados por los péptidos en un ELISPOT de IFN- γ con células tumorales WT-1⁺ y WT-1⁻. Se presentó una cantidad suficiente de péptido WT1 en la superficie de la célula tumoral de mesotelioma WT1⁺ para que los linfocitos T estimulados con péptidos WT1DR individuales reconocieran las células tumorales de mesotelioma, en comparación con las células de melanoma negativas en WT1 de control (Figura 7). Por lo tanto, la vacunación con los péptidos de la presente invención genera linfocitos T específicos del antígeno con actividad contra los tumores que expresan WT1.

EJEMPLO 7: EXPRESIÓN DE WT1 EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS DE MESOTELIOMA

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

RT-PCR cuantitativa para las transcripciones de WT-1

Se aisló ARN total de líneas celulares por extracción con fenol/cloroformo. Se confirmó la pureza del ARN mediante absorbancia a 260 nm. La reacción RT se adaptó a partir de los protocolos suministrados por Applied Biosystems (Foster City, CA). Partiendo de 1 μ g de ARN total, se usaron hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa para aislar

el ADNc. Para la reacción de PCR, se mezcló ADNc con los siguientes cebadores y la sonda WT1: cebador directo (ubicado en el exón 7): 5'-CAGGCTGCAATAAGAGATATTTTAAGCT-3' (SEC ID N° 39); y cebador inverso (ubicado en el exón 8): 5'-GAAGTCACACTGGTATGGTTTCTCA-3' (SEC ID N° 40); sonda Taqman (ubicada en el exón 7) 5'-CTTACAGATGCACAGCAGGAAGCACACTG-3' (SEC ID N° 41). La sonda WT1 fluorescente 5'-56-FAM/CTTACAGATGCACAGCAGGAAGCACACTG/3BHQ_1/-3 (SEC ID N° 42) se marcó con fosforamida de 6-carboxifluoresceína (FAM) como colorante indicador en el extremo 5' y con el colorante inactivador carboxitetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo 3' (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Los parámetros para la reacción de PCR fueron: 2 minutos a 50 °C, 10 min a 95 °C; seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 60 s a 62 °C. Cada reacción se realizó por triplicado, y se excluyeron las discrepancias > 1 Ct en 1 de los pocillos. La reacción Q-RT-PCR y las mediciones de fluorescencia se realizaron en el Sistema PCR 7500 Real Time® de Applied Biosystems. Los cebadores y las sondas de control ABL fueron: cebador directo 5'-TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3 (SEC ID N° 43; ubicado en EnF-10030)'; cebador inverso 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3' (SEC ID N° 44; ubicado en ENR-1063); sonda fluorescente 5'-/56 FAM/CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT/3BHQ_1/-3' (SEC ID N° 45; ubicada en ENPr-1043).

RESULTADOS

Para determinar los niveles de expresión de WT1 en el mesotelioma, se cuantificaron los niveles de transcripción de WT1 en una serie de líneas celulares humanas de mesotelioma (sarcomatoide, epiteloide y bifásica) por RT-PCR y se compararon con varias líneas celulares de leucemia con la expresión de WT1 conocida. 12 de las 12 líneas celulares de mesotelioma expresaron el mensaje de WT1, en la mayoría de los casos, a un nivel inferior que las líneas celulares de leucemia (Figura 8). Por el contrario, las líneas celulares de melanoma (MeWo) y linfoma (SKLY16) fueron negativas en WT1. SK-RC-52, una línea celular humana de carcinoma de células renales no expresó WT1, a pesar de la baja expresión de WT1 en los podocitos renales adultos. El análisis de citometría de flujo confirmó que todas las líneas celulares de mesotelioma expresaron las moléculas de clase II y que algunas (JMN y H-2452) expresaron las moléculas de clase I.

Por lo tanto, los métodos de la presente invención se pueden usar para inducir respuestas inmunes y para la vacunación contra las células de mesotelioma

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> David, Scheinberg A

<120> Péptidos WT1 de unión a HLA de clase II, y composiciones y métodos que los comprenden

<130> P-8273-PC

<160> 53

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu
 1 5 10 15

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met
 1 5 10 15

Thr Lys Leu

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 542 141 T3

	Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg
	1 5 10 15
<210> 4	
<211> 22	
<212> PRT	
5 <213> Homo sapiens	
<400> 4	
	Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His
	1 5 10 15
	Ser Arg Lys His Thr Gly
	20
<210> 5	
10 <211> 9	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
	Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
15	1 5
<210> 6	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
20 <400> 6	
	Tyr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
	1 5
<210> 7	
<211> 9	
25 <212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 7	
	Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
30	1 5
<210> 8	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
35 <400> 8	
	Tyr Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
	1 5
<210> 9	
<211> 9	
<212> PRT	
40 <213> Homo sapiens	
<400> 9	
	Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
	1 5
<210> 10	
45 <211> 9	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 10	
	Tyr Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
50	1 5
<210> 11	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
55 <400> 11	

ES 2 542 141 T3

		Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val
		1 5
	<210> 12	
	<211> 9	
	<212> PRT	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 12	
		Tyr Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val
		1 5
	<210> 13	
10	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 13	
		Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val
		1 5
15	<210> 14	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 14	
		Tyr Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val
		1 5
	<210> 15	
25	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 15	
		Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val
		1 5
30	<210> 16	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 16	
		Gly Leu Arg Arg Gly Ile Gln Asp Val
		1 5
35	<210> 17	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 17	
		Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu
		1 5
	<210> 18	
45	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 18	
		Lys Leu Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu
		1 5
50	<210> 19	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 19	
		Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser
		1 5
	<210> 20	
	<211> 9	

ES 2 542 141 T3

	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 20		
5		Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Val	
	<210> 21	1	5
	<211> 9		
	<212> PRT		
10	<213> Homo sapiens		
	<400> 21		
		Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu	
	<210> 22	1	5
	<211> 9		
15	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 22		
		Tyr Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu	
20	<210> 23	1	5
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
25	<400> 23		
		Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys	
	<210> 24	1	5
	<211> 9		
	<212> PRT		
30	<213> Homo sapiens		
	<400> 24		
		Asn Met Tyr Gln Arg Asn Met Thr Lys	
35	<210> 25	1	5
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 25		
40		Asn Met His Gln Arg Val Met Thr Lys	
	<210> 26	1	5
	<211> 9		
	<212> PRT		
45	<213> Homo sapiens		
	<400> 26		
		Asn Met Tyr Gln Arg Val Met Thr Lys	
	<210> 27	1	5
	<211> 9		
50	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 27		
55		Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys	
	<210> 28	1	5
	<211> 9		
	<212> PRT		
60	<213> Homo sapiens		

ES 2 542 141 T3

	<400> 28	Gln Met Tyr Leu Gly Ala Thr Leu Lys
		1 5
	<210> 29	
	<211> 9	
5	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 29	Gln Met Asn Leu Gly Val Thr Leu Lys
		1 5
10	<210> 30	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 30	Gln Met Tyr Leu Gly Val Thr Leu Lys
		1 5
	<210> 31	
	<211> 10	
	<212> PRT	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 31	Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys
		1 5 10
	<210> 32	
	<211> 10	
	<212> PRT	
25	<213> Homo sapiens	
	<400> 32	Phe Met Tyr Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys
		1 5 10
	<210> 33	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 33	Phe Met Cys Ala Tyr Pro Phe Cys Asn Lys
		1 5 10
	<210> 34	
	<211> 10	
	<212> PRT	
40	<213> Homo sapiens	
	<400> 34	Phe Met Tyr Ala Tyr Pro Phe Cys Asn Lys
		1 5 10
	<210> 35	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 35	Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg
		1 5 10
	<210> 36	
	<211> 10	
	<212> PRT	
55	<213> Homo sapiens	
	<400> 36	Lys Leu Tyr His Leu Gln Met His Ser Arg
		1 5 10

ES 2 542 141 T3

<210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 37
 Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Lys
 1 5 10
 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 38
 Lys Leu Tyr His Leu Gln Met His Ser Lys
 1 5 10
 15
 <210> 39
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> cebador
 <400> 39
 25
 caggctgcaa taagagatat ttaagct 28
 <210> 40
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> cebador
 <400> 40
 35
 gaagtcacac tggtaggtt tctca 25
 <210> 41
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> sonda
 45
 <400> 41
 cttacagatg cacagcagga agcacactg 29
 50
 <210> 42
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> sonda
 <400> 42
 60
 cttacagatg cacagcagga agcacactg 29
 <210> 43
 <211> 31

ES 2 542 141 T3

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> cebador

<400> 43

10 tggagataac actctaagca taactaaagg t 31

<210> 44
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador

<400> 44

20 gatgtagttg ctgggaccc a 21

<210> 45
 <211> 28
 25 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> sonda

30 <400> 45

ccattttgg ttgggcttc acaccatt 28

35 <210> 46
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 46

Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Pro Gly Val Gly Lys Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Thr Ile Gln
 20

45 <210> 47
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

50 Val His Ser Ile Pro Leu Thr Ile Asn Lys Glu Glu Ala Leu Gln Arg
 1 5 10 15

Pro Val Ala Ser Asp Phe Glu
 20

<210> 48
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
1 5

5 <210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 49

Tyr Leu Lys Ala Leu Gln Arg Pro Tyr
1 5

15 <210> 50
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 542 141 T3

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 435 440 445
 Leu

5 <210> 51
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

ES 2 542 141 T3

Ala Ala Glu Ala Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly
 1 5 10 15

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

Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys
 35 40 45

Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe
 50 55 60

Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro
 65 70 75 80

Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile
 85 90 95

Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys
 100 105 110

Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala
 115 120 125

Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala
 130 135 140

Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser
 145 150 155 160

Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val
 165 170 175

Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala
 180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln
 195 200 205

Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr
 210 215

Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu
 225 230 235 240

Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln
 245 250 255

Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys
 260 265 270

Gly His Ser Thr Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu
 275 280 285

Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile
 290 295 300

Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser
 305 310 315 320

Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly
 325 330 335

Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg
 340 345 350

Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu
 355 360 365

Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His
 370 375 380

Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser
 385 390 395 400

Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys
 405 410 415

Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser
 420 425 430

Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys
 435 440 445

Leu Gln Leu Ala Leu
 450

<210> 52
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 52

ES 2 542 141 T3

Met Gln Asp Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala Ser Gln His
1 5 10 15

Thr Leu Arg Ser Gly Pro Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gln Gly
20 25 30

Val Arg Asp Pro Gly Gly Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala
35 40 45

Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser
50 55 60

Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
65 70 75 80

Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val
85 90 95

Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly
100 105 110

Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Ala Pro
115 120 125

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro
130 135 140

Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe
145 150 155 160

Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg
165 170 175

Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln
180 185 190

Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser
195 200 205

Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly
210 215 220

ES 2 542 141 T3

Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro
 225 230 235 240
 Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu
 245 250 255
 Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr
 260 265 270
 Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro
 275 280 285
 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met
 290 295 300
 Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala
 305 310 315 320
 Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser
 325 330 335
 Thr Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala
 340 345 350
 Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val
 355 360 365
 Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu
 370 375 380
 Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys
 385 390 395 400
 Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr
 405 410 415
 Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe
 420 425 430
 Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val
 435 440 445
 Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp
 450 455 460
 His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser

ES 2 542 141 T3

465 470 475 480
Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu
 485 490 495

Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu
 500 505 510

Ala Leu

<210> 53

<211> 168

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
1 5 10 15

Ile Glu Gly Arg His Met Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
 20 25 30

Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala
 35 40 45

Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met
 50 55 60

His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys
65 70 75 80

Asp Cys Glu Arg Arg Phe Phe Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln
 85 90 95

Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg
 100 105 110

Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr
 115 120 125

Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe
 130 135 140

Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn
145 150 155 160

10 Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu
165

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido WT1 aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (SEC ID N° 2).
2. El péptido WT1 aislado de la reivindicación 1, en el que dicho péptido WT1 aislado se une a una molécula HLA de clase II.
- 10 3. El péptido WT1 aislado de la reivindicación 2, en el que dicha molécula HLA de clase II es una molécula HLA-DRB.
- 15 4. El péptido WT1 aislado de la reivindicación 3, en el que dicho péptido WT1 aislado se une a una segunda molécula HLA-DRB, en el que dicha molécula HLA-DRB de la reivindicación 3 y dicha segunda molécula HLA-DRB están codificadas por alelos HLA-DRB distintos.
- 20 5. Una composición que comprende el péptido WT1 aislado de la reivindicación 2 y un péptido WT1 aislado adicional, en la que dicho péptido WT1 aislado adicional se une a una molécula HLA de clase II adicional.
6. Una composición que comprende:
- a) una célula presentadora de antígeno; y
- (b) un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
- 25 7. La composición de la reivindicación 6, en la que dicha célula presentadora de antígeno presenta dicho péptido sobre una molécula HLA de clase II del mismo y en la que dicha composición comprende además un péptido de unión a la molécula HLA de clase II o un péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I.
- 30 8. Una composición que comprende el péptido WT1 aislado de la reivindicación 4 y un péptido WT1 aislado adicional, en la que dicha molécula HLA de clase II adicional es una tercera molécula HLA-DRB que es diferente de dicha molécula HLA-DRB de la reivindicación 3 y dicha segunda molécula HLA-DRB de la reivindicación 4.
- 35 9. La composición de la reivindicación 8, en la que dicho péptido WT1 aislado adicional se une a una cuarta molécula HLA-DRB, en la que dicha tercera molécula HLA-DRB de la reivindicación 8 y dicha cuarta molécula HLA-DRB están codificadas por alelos HLA-DRB distintos.
- 40 10. Una composición que comprende el péptido WT1 aislado de la reivindicación 1 y un péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I.
11. La composición de la reivindicación 7 o 10, en la que dicha molécula HLA de clase I es una molécula HLA-A o en la que la secuencia de aminoácidos de dicho péptido WT1 de unión a la molécula HLA de clase I comprende una secuencia seleccionada entre las SEC ID N° 5-38.
- 45 12. Una vacuna que comprende:
- (a) el péptido WT1 aislado de la reivindicación 1; y
- (b) un adyuvante o un vehículo.
- 50 13. Una vacuna que comprende:
- (a) la composición de la reivindicación 6; y
- (b) un adyuvante o un vehículo
- 55 14. La vacuna de la reivindicación 12 o 13, en la que dicho adyuvante es QS21, adyuvante incompleto de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, BCG, alumbre, un factor de crecimiento, una citocina, una quimiocina, una interleucina, Montanide ISA 51 o GM-CSF.
- 60 15. La composición de la reivindicación 5, en la que el péptido WT1 aislado consiste en la secuencia de aminoácidos RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (SEC ID N° 2) y el péptido WT1 aislado adicional se selecciona entre SEC ID N° 1, 3 y 4.
- 65 16. Una composición farmacéutica que comprende la vacuna de la reivindicación 12 o la composición de la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de un sujeto con un cáncer que expresa WT1, para su uso en la inducción de la formación y proliferación de células específicas de CTL de un cáncer que expresa WT1 o para su uso en la reducción de una incidencia de un cáncer que expresa WT1, o de su recaída, en un sujeto.

17. Uso de la vacuna de la reivindicación 12 o de la composición de la reivindicación 6 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto con un cáncer que expresa WT1, para la inducción de la formación y proliferación de CTL específicos de células de un cáncer que expresa WT1 o para la reducción de una incidencia de un cáncer que expresa WT1, o de su recaída, en un sujeto.

5
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 16 o el uso de la reivindicación 17, en los que dicho cáncer que expresa WT1 es una leucemia, un tumor desmoplásico de células pequeñas redondas, un cáncer gástrico, un cáncer de colon, un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, un tumor de células germinales, un cáncer de ovario, un cáncer de útero, un cáncer de tiroides, un cáncer de hígado, un cáncer renal, un sarcoma de Kaposi, un sarcoma, un carcinoma hepatocelular, un tumor de Wilms, una leucemia mielógena aguda (AML), un síndrome mielodisplásico (MDS) o un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

10
19. Una composición farmacéutica que comprende un péptido WT1 aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (SEC ID N° 2) para su uso en la inducción de una respuesta inmune anti-mesotelioma en un sujeto, para su uso en el tratamiento de un sujeto con mesotelioma o para su uso en la reducción de una incidencia de mesotelioma o de su recaída en un sujeto.

15
20. Uso de un péptido WT1 aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (SEC ID N° 2) para la preparación de una composición farmacéutica para la inducción de una respuesta inmune anti-mesotelioma en un sujeto, para el tratamiento de un sujeto con mesotelioma o para la reducción de una incidencia de mesotelioma o de su recaída en un sujeto.

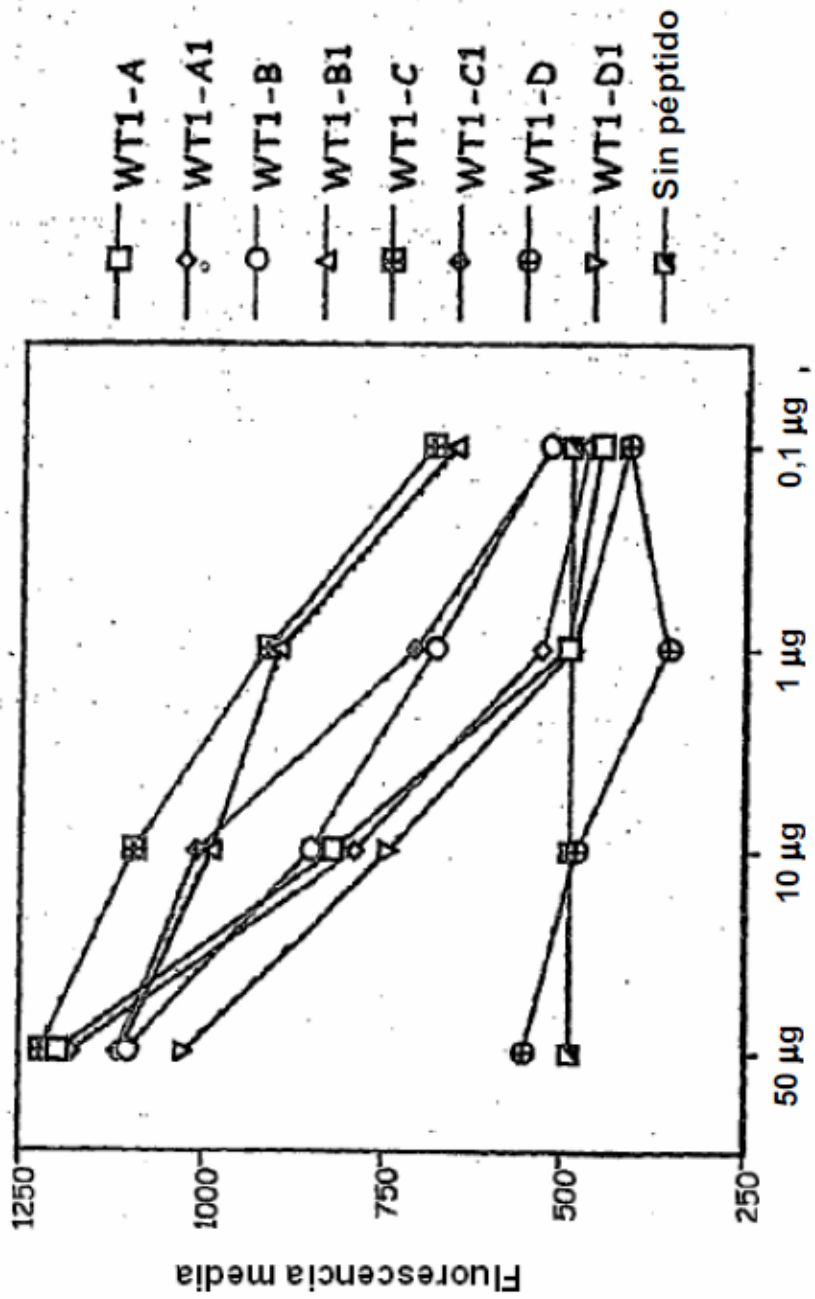


Figura 1A

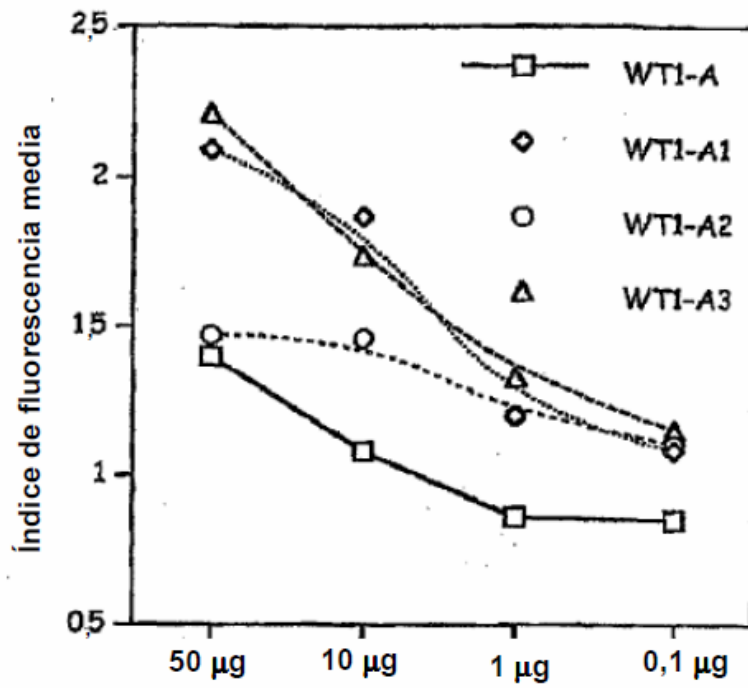


Figura 1B

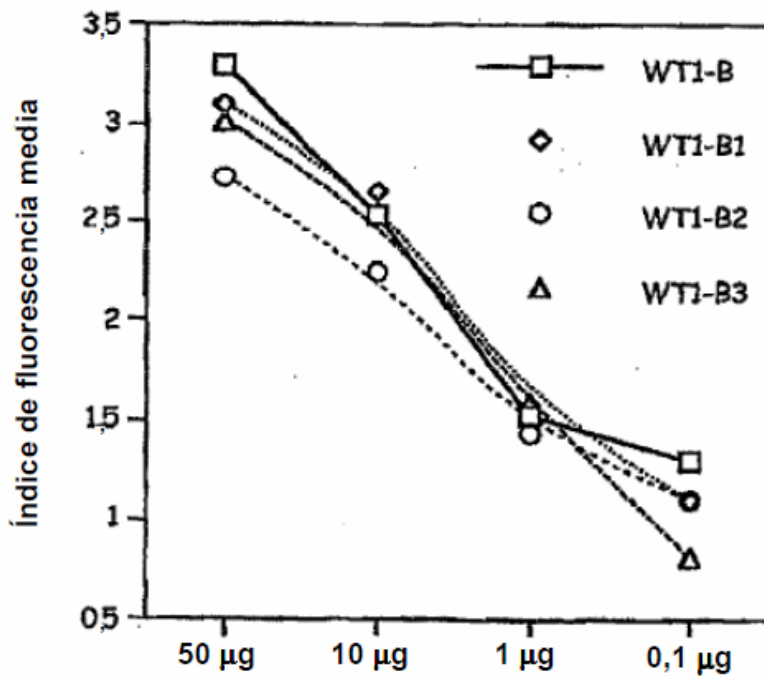


Figura 1C

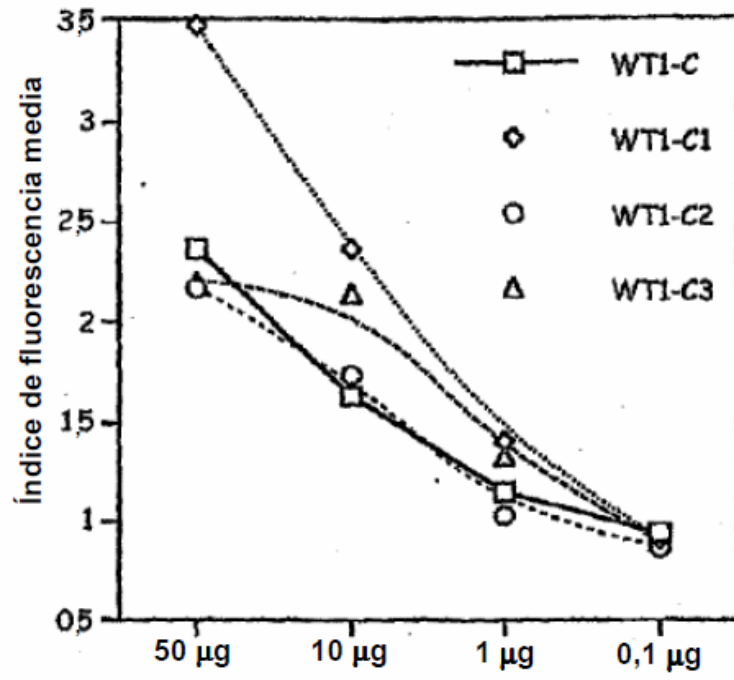


Figura 1D

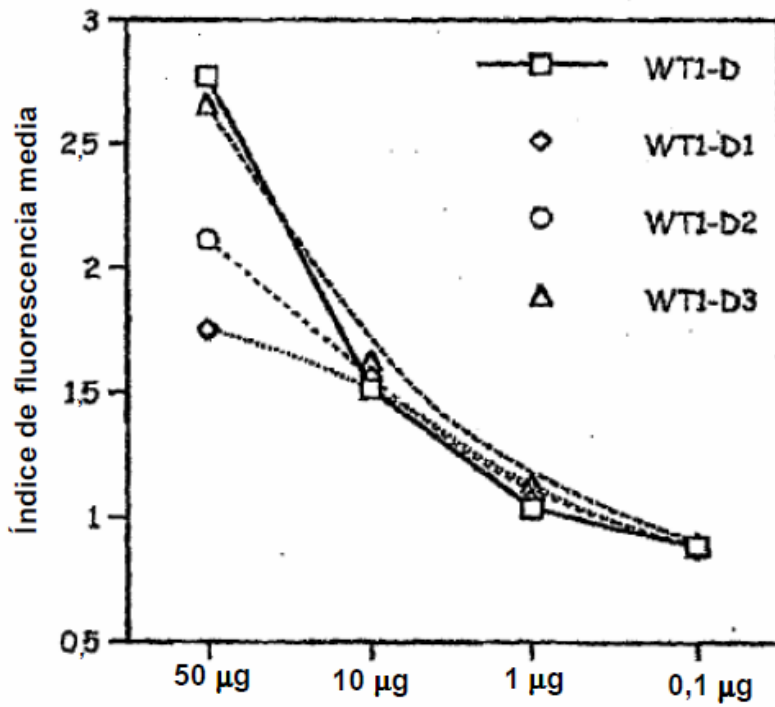


Figura 1E

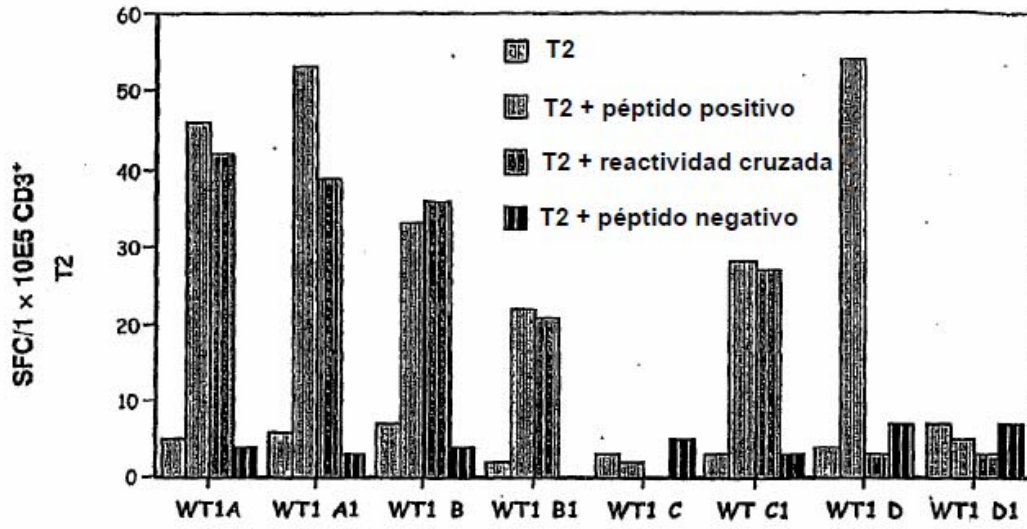


Figura 2A

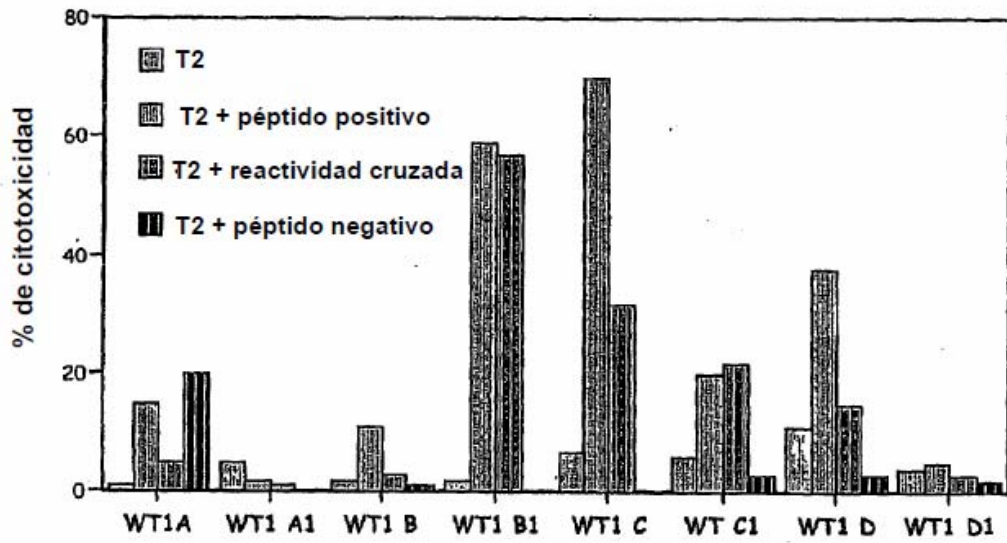


Figura 2B

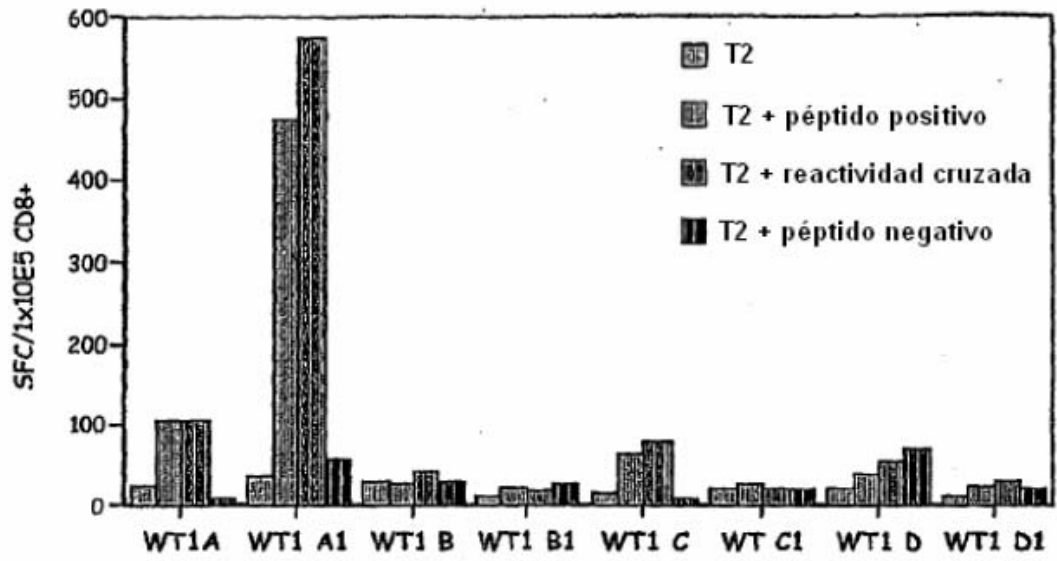


Figura 3A

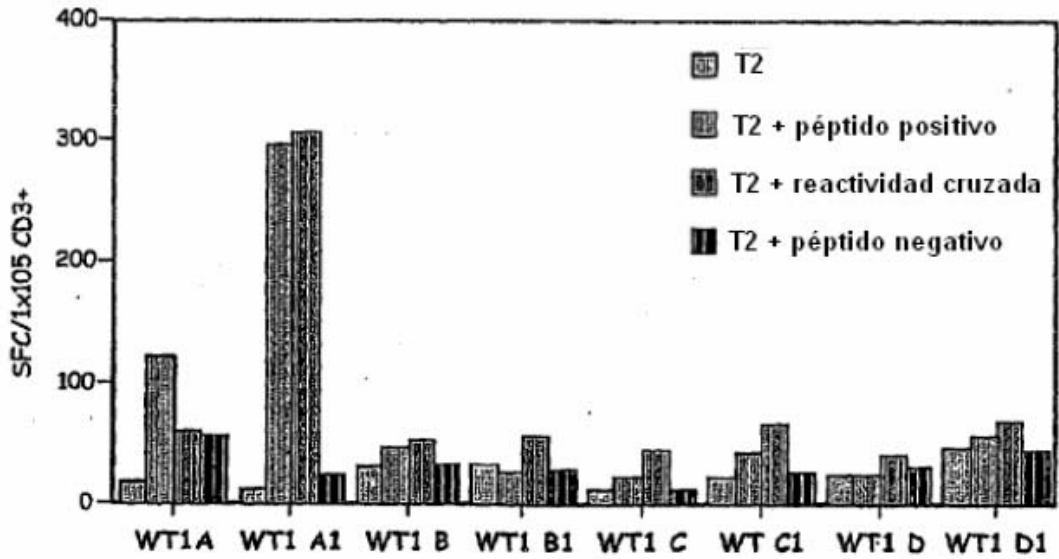


Figura 3B

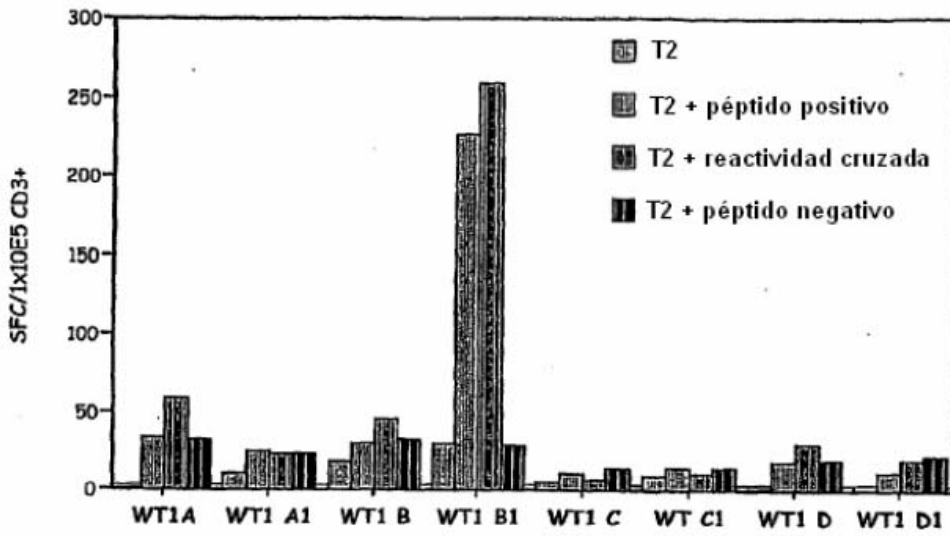


Figura 3C

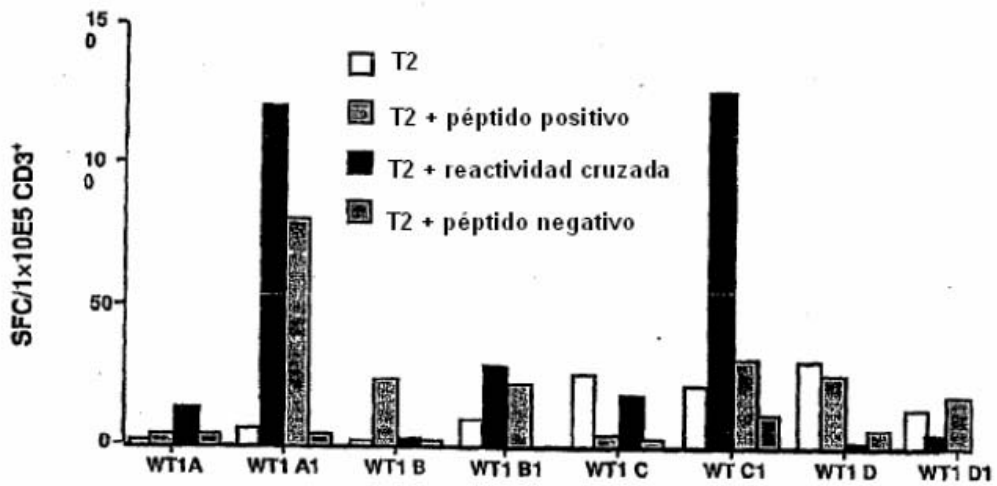


Figura 3D

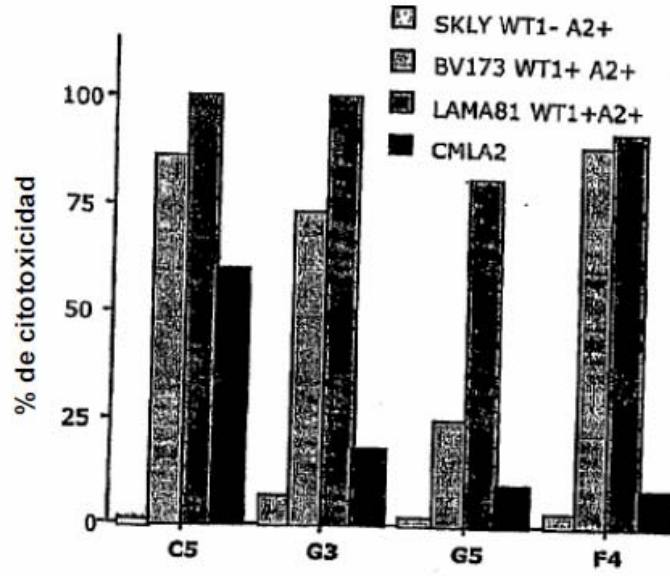


Figura 4A

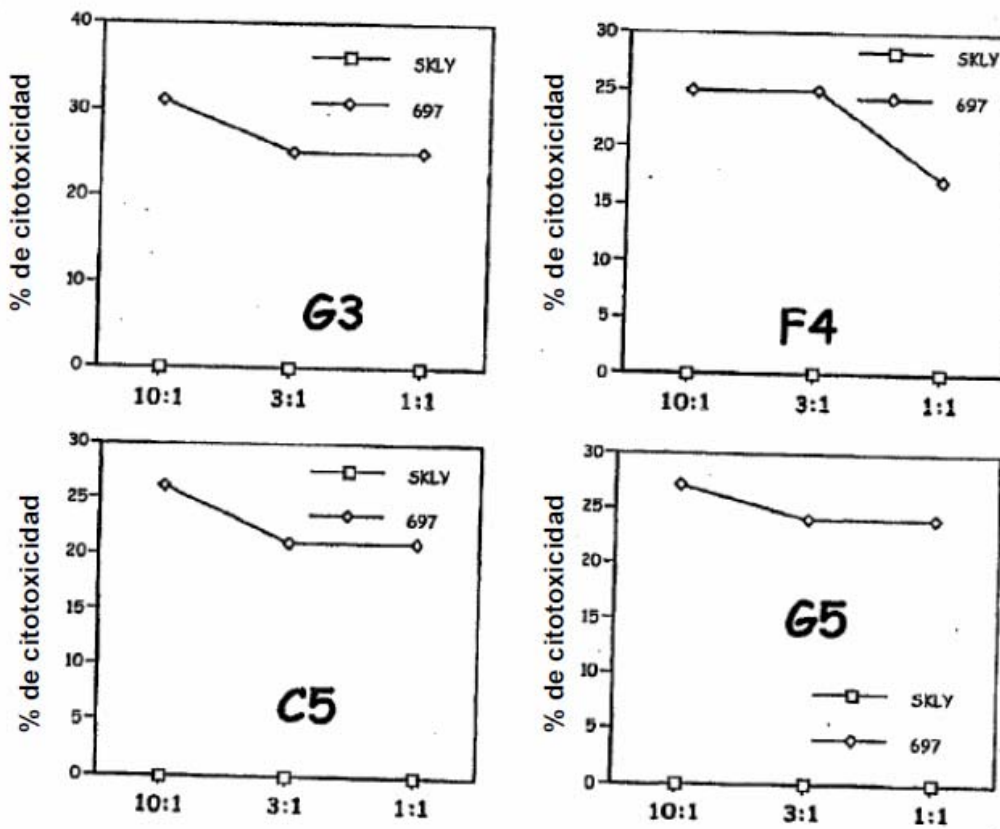


Figura 4B

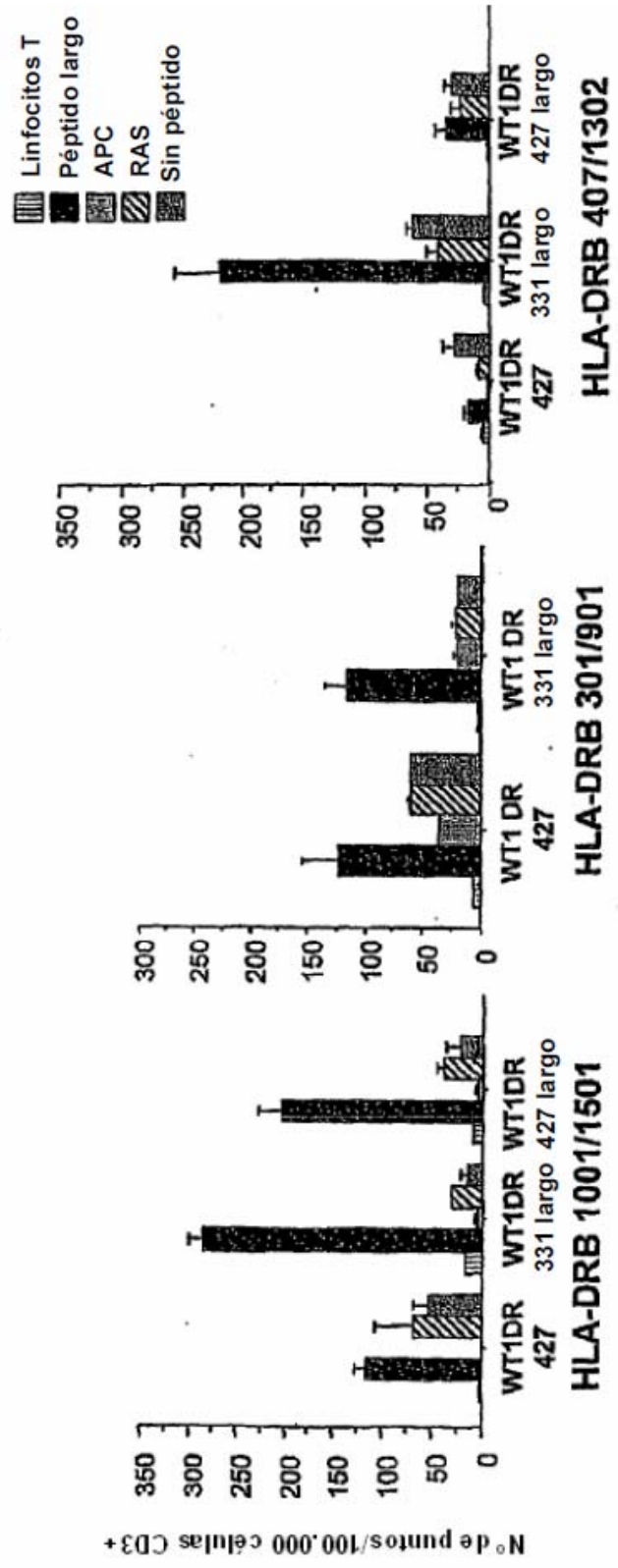


Figura 5, parte 1

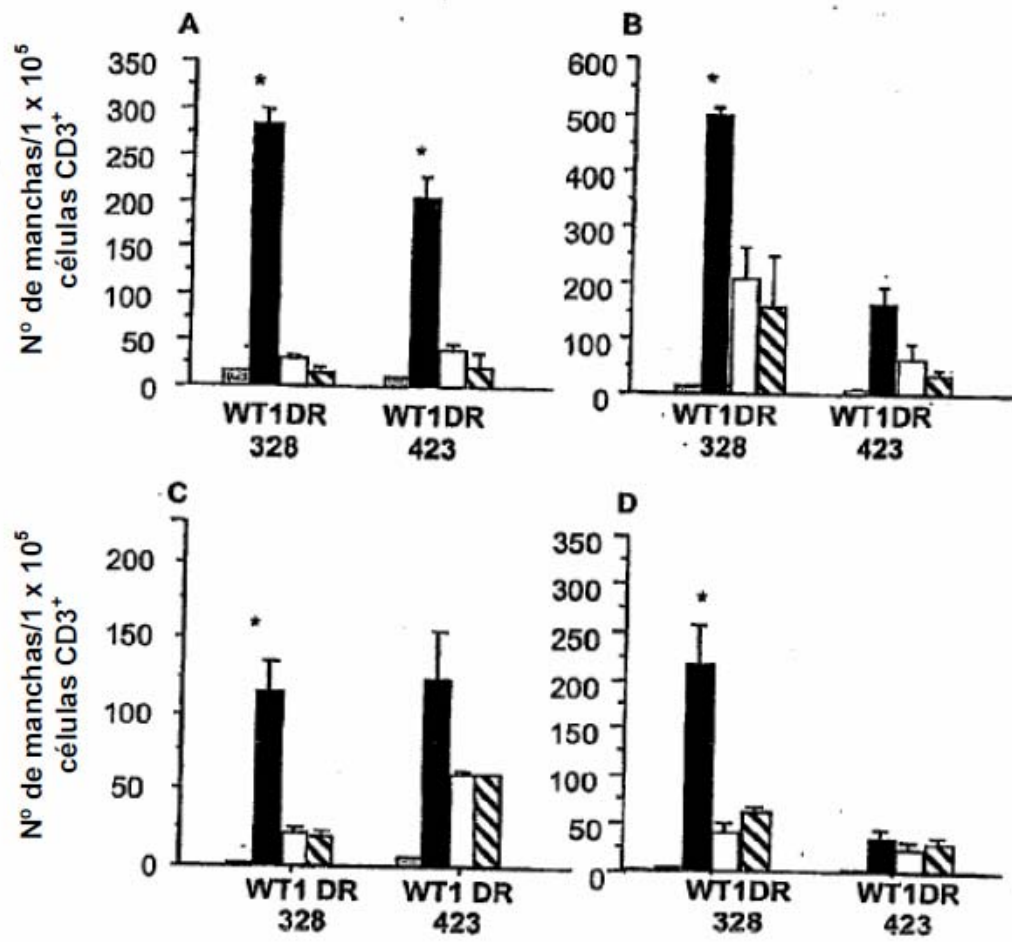


Figura 5, parte 2

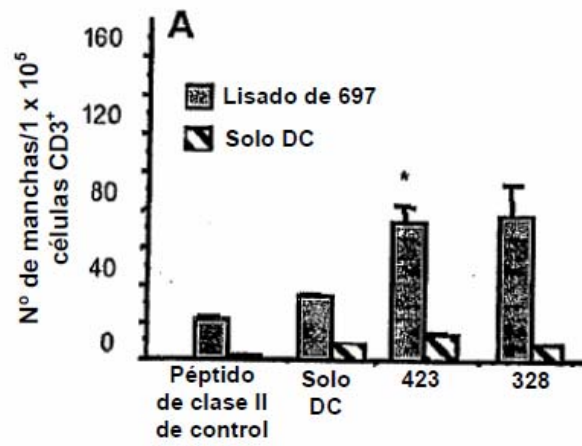


Figura 6A

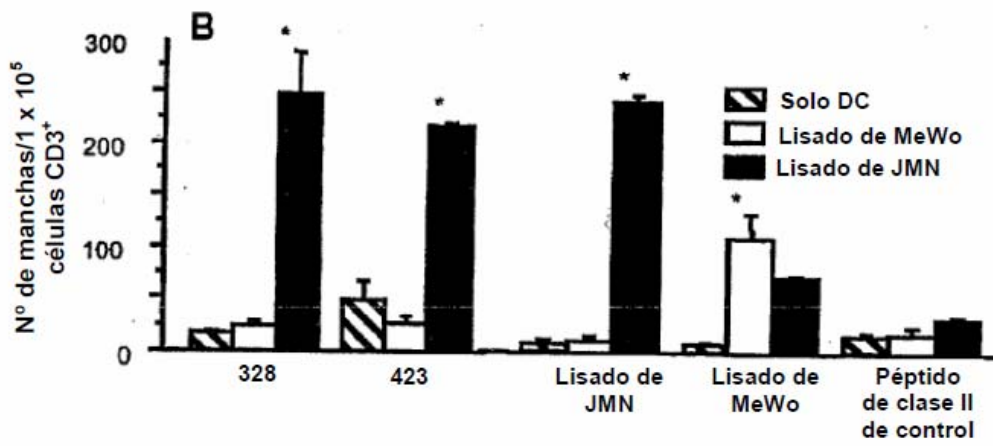


Figura 6B

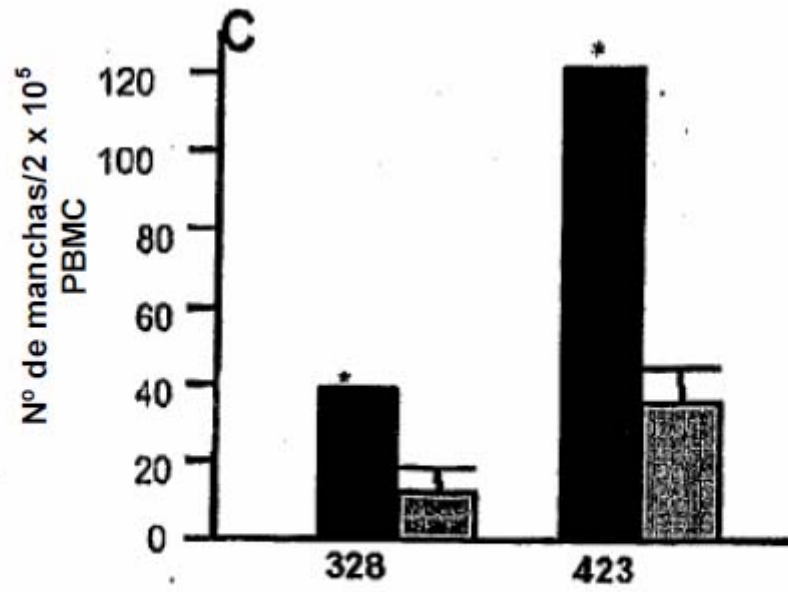


Figura 7

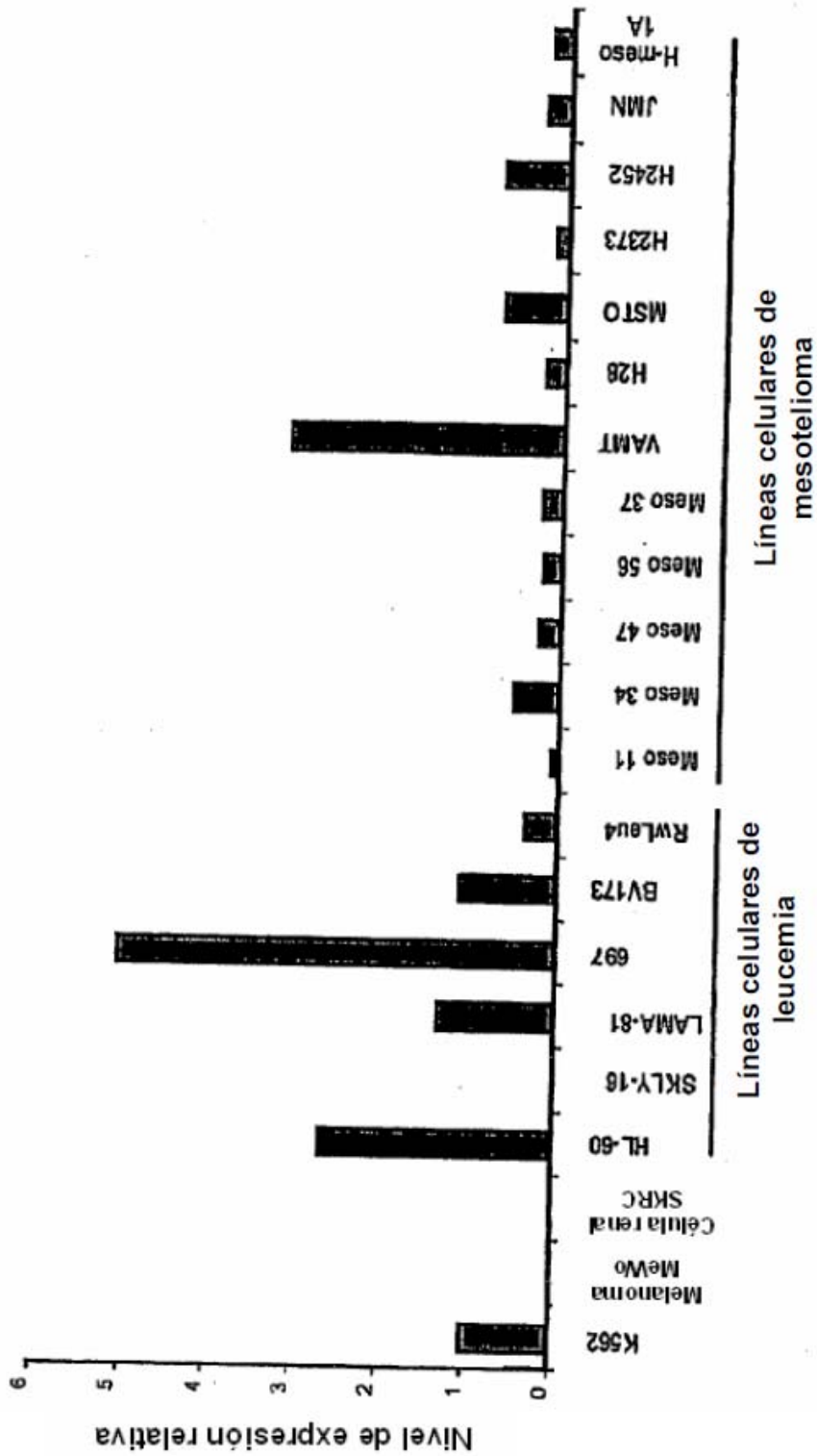


Figura 8